

DEPARTAMENT DE CIRURGIA

INGENIERÍA TISULAR EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR:
ESTUDIO *IN VIVO* DEL PROCESO DE REGENERACIÓN
MEDIANTE *SCAFFOLDS* BIOESTABLES.

FRANCISCO FORRIOL BROCAL

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 28 de maig de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. José Luis Gómez Ribelles
- Dra. Julia Buján Varela
- Dr. José Antonio de Pedro Moro
- Dr. Joan Carles Monllau García
- Dra. María Sancho-Tello Valls

Va ser dirigida per:
Dra. Carmen Carda Batalla

©Copyright: Servei de Publicacions
Francisco Forriol Brocal

Dipòsit legal: V-3486-2011
I.S.B.N.: 978-84-370-7935-6

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115

**INGENIERÍA TISULAR EN EL
CARTÍLAGO ARTICULAR:
ESTUDIO *IN VIVO* DEL PROCESO
DE REGENERACIÓN MEDIANTE
SCAFFOLDS BIOESTABLES**

Tesis presentada por

Francisco Forriol Brocal

Para obtener el título de Doctor por la
Universitat de València
Valencia, 2010

Directora de la tesis

Profesora Dra. Carmen Carda Batalla

Agradecimientos

A la Profesora Doctora Doña Carmen Carda Batalla, Catedrática de Histología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València, por la posibilidad que me ha ofrecido para hacer realidad este proyecto de investigación, por su ilusión y estímulo constantes, incluso en los momentos más difíciles.

Al Profesor Doctor Don Francisco Gomar Sancho, Catedrático de Traumatología y Cirugía Ortopédica de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y tutor de mi doctorado, por sus consejos durante la realización de este trabajo.

Al Doctor Don Enrique Gastaldi Orquin, por su permanente insistencia en que esta ilusión era posible.

A mi compañero y amigo Pablo Gastaldi Rodrigo, por su ayuda inestimable durante las sesiones quirúrgicas y no sólo las experimentales de esta tesis.

A la Profesora Doctora Doña María Sancho-Tello, porque ha sabido responder siempre a mis dudas dándome ánimos en cada momento.

A mi Jefe de Servicio del Hospital Malvarrosa, Don José Juan López López, que siempre supo entender mis necesidades durante la actividad asistencial, para llevar a cabo la fase experimental de este estudio.

A los componentes de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València, y en especial a las veterinarias Doña Ana Díaz Cuevas y la Doctora Doña Inmaculada Noguera Salvá, sin cuya ayuda este trabajo nunca hubiese visto la luz.

Muy especialmente a mi mujer, Dori, y a mis hijos, Alejandro y María, porque sin su comprensión, cariño y estímulo permanentes esta realidad hubiese sido únicamente un sueño.

A todos mis buenos amigos, que siempre han tenido una palabra de aliento y de apoyo.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por las ayudas concedidas al proyecto MAT2007-66759-C03-03, del que forma parte este trabajo.

A mi mujer, Dori
A mis hijos,
Alejandro y María

Índice

ABREVIATURAS	12
INTRODUCCIÓN	17
1. Definición y características del cartílago	18
1.1. El cartílago y sus variedades	18
1.2. El cartílago articular	19
2. Embriología del cartílago articular	21
3. Estructura histológica de las diferentes variedades de cartílago	22
3.1. Cartílago elástico	22
3.2. Fibrocartílago	24
3.3. Cartílago hialino	25
4. Estructura histológica del cartílago articular	27
4.1. Capa superficial o tangencial	28
4.2. Capa de transición o intermedia	29
4.3. Capa profunda	30
4.4. Capa calcificada	31
5. Bioquímica del cartílago articular	33
5.1. Proteoglicanos	34
5.1.1. Grandes proteoglicanos o agrecanos	35
5.1.2. Pequeños proteoglicanos	36
5.2. Ácido hialurónico o hialuronan	37

5.3. Proteínas de enlace y proteínas no colágenas	39
5.4. Colágenos	40
6. Fisiología del cartílago articular	43
6.1. Cargas	44
6.2. Deslizamiento-lubricación	45
7. Metabolismo del cartílago articular	46
7.1. Metabolismo energético	46
7.2. Metabolismo de los proteoglicanos y del colágeno	47
7.3. Factores biomecánicos	49
8. Lesiones del cartílago articular	50
8.1. Etiología	50
8.2. Características descriptivas	52
9. Epidemiología de las lesiones condrales	55
10. Mecanismos biológicos de reparación de las lesiones del cartílago articular	57
11. Técnicas quirúrgicas para la reparación del cartílago articular	59
11.1. Técnicas paliativas	60
11.1.1. Lavado articular	60
11.1.2. Estímulo osteocondral	62
a) Perforaciones del hueso subcondral (Pridie)	63
b) Artroplastia de abrasión	64
c) Microfracturas	66

11.2. Técnicas de reparación y/o de regeneración cartilaginosa	68
11.2.1. Aloinjertos osteocondrales	68
11.2.2. Autoinjertos osteocondrales	69
11.2.3. Injertos de periostio	72
11.2.4. Injertos de pericondrio	74
11.2.5. Cultivo de condrocitos	75
11.2.6. <i>Scaffolds</i>	80
11.2.7. Proteína morfogenética ósea	86
11.2.8. Terapia génica, células madre	87
12. Hipótesis	93
OBJETIVOS	94
MATERIAL Y MÉTODO	97
1. Material	98
1.1. Animal de experimentación	98
1.1.1. Raza	99
1.1.2. Edad, peso y sexo	100
1.2. Quirófano	101
1.3. Instrumental quirúrgico	101
1.4. Obtención de los condrocitos	104
1.5. Síntesis de los <i>scaffolds</i>	105

1.6. Incorporación de los condrocitos a los <i>scaffolds</i>	110
2. Método	113
2.1. Estabulación de los animales	113
2.2. Preparación preoperatoria	113
2.3. Técnica anestésica	115
2.4. Técnica quirúrgica	116
2.5. Postoperatorio	121
2.6. Sacrificio de los animales	122
2.7. Obtención de las piezas	122
2.8. Estudio histológico	126
RESULTADOS	130
1. Estudio histológico	131
1.1. Serie 1	131
1.1.1. Presemebrado de condrocitos	131
1.1.2. Sin presiembra de condrocitos	134
1.2. Serie 2	137
1.2.1. Presemebrado de condrocitos	138
1.2.2. Sin presiembra de condrocitos	141
1.3. Serie 3	145
1.3.1. Presemebrado de condrocitos	145
1.3.2. Sin presiembra de condrocitos	148
1.4. Serie 4	151
1.4.1. Presemebrado de condrocitos	152

1.4.2. Sin presiembra de condrocitos	155
2. Consideraciones generales	158
3. Evolución postquirúrgica e incidencias	159
DISCUSIÓN	163
1. Reparación de las lesiones cartilaginosas mediante ingeniería tisular con <i>scaffolds</i>	164
2. Biomateriales utilizados en ingeniería tisular del cartílago	174
3. Poliacrilato de etilo y otros copolímeros	188
CONCLUSIONES	198
BIBLIOGRAFÍA	201

Abreviaturas

AA	Azul Alcian
ACI	Implante de condrocitos autólogos
AG	Agrecano
AH	Ácido hialurónico
ALO	Aloinjerto osteocondral
BMP	Proteína morfogenética ósea
CA	Cartílago articular
CE	Cartílago elástico
CH	Cartílago hialino
CDMP	Proteína morfogenética derivada del cartílago
CMMs	Células madre mesenquimales
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
CS	Condroitín sulfato
DAB	Diaminobencidina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EA	Acrilato de etilo o etilacrilato

FACIT	<i>Fibril associated collagen with interrupted triple helices</i>
FC	Fibrocartílago
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GAG	Glicosaminoglicano
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación
GP	Glucoproteína
HA	Hidroxiapatita
HAS	Hialuronan sintetasa
HE	Hematoxilina-Eosina
HEA	Acrilato de hidroxietilo o hidroxietilacrilato
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IGF	Factor de crecimiento <i>insuline-like</i>
IL	Interleuquina
IT	Ingeniería tisular
ITS	<i>Insulin, transferrin, sodium selenite</i>
LA	Lavado articular
LS	Líquido sinovial
MAAc	Ácido metacrílico
MACI	<i>Matrix-induced autologous chondrocyte implantation</i>

MEC	Matriz extracelular
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PARP	<i>Proline arginine rich protein</i>
PCL	Policaprolactona
PE	Proteína de enlace
PEA	Poliacrilato de etilo o polietilacrilato
PLA	Ácido poliláctico
PGA	Ácido poliglicólico
PMMA	Polimetacrilato de metilo o polimetilmetacrilato
POC	Poliocetanediol citrato
PTG	Proteoglicano
PTR	<i>Proteoglycan tandem repeat</i>
PVA	Ácido polivinílico
QS	Queratán sulfato
RF	Radiofrecuencia
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Suero bovino fetal
SLRP	<i>Small leucine-rich repeat proteoglycan</i>
TG	Transferencia génica
TGF	Factor de crecimiento tisular

TM	Tricómico de Masson
TNF	Factor de necrosis tisular
TrEGDMA	Dimetacrilato de trietilenglicol
UDP	Uridindifosfato

Introducción

1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL CARTÍLAGO

1.1. EL CARTÍLAGO Y SUS VARIEDADES

El cartílago es una variedad de tejido conjuntivo que está presente en numerosas localizaciones del cuerpo. Se clasifica según su estructura histológica, en tres variantes en el organismo: el cartílago elástico (CE), el fibrocartílago (FC) y el cartílago hialino (CH). En la fase embrionaria existe una cuarta variedad, el cartílago epiteloideo, que deriva del mesénquima y que madurará hacia las otras tres variantes en función de su topografía y su exigencia funcional^{43,193,281}.

En los mamíferos, el CE se encuentra en el pabellón auricular, la trompa auditiva, la pared del conducto auditivo externo, la epiglotis o en la laringe.

El FC forma parte de los discos intervertebrales, se localiza en ciertos cartílagos articulares, en la sínfisis pubiana, en el ligamento redondo de la cabeza femoral y en las zonas de inserción tendinosa de algunos huesos.

La variante hialina es la forma predominante de cartílago y se relaciona con el sistema esquelético, donde se sitúa en las fisis de crecimiento óseas y en las superficies epifisarias libres de los huesos, formando parte de las articulaciones²²³. En el adulto, también se halla en los extremos anteriores de las costillas, en los anillos traqueales y en la laringe. Es la primera de las variantes que encontramos en el embrión madurando a partir del cartílago epiteloideo. El cartílago hialino constituye en estos

momentos preferentemente, el esqueleto embrionario, formando piezas cartilaginosas que posteriormente pasarán a ser de carácter óseo. Pero incluso en estas situaciones, esta variedad de cartílago persiste a nivel de las superficies articulares.

1.2. EL CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago articular (CA) se presenta como un tejido consistente, ligeramente depresible y elástico, de superficie notablemente lisa a simple vista. En el joven se caracteriza por un reflejo blancoazulado, mientras que en las personas de edad avanzada éste es blancoamarillento.

En la periferia de la articulación, se prolonga en una zona de transición con la capa fibrosa de la cápsula sinovial y el periostio epifisario.

La extensión de cartílago en la articulación depende de la amplitud de los movimientos de cada una de ellas. Así, articulaciones con importantes arcos de movilidad como la gleno-humeral o la coxo-femoral, disponen de superficies cartilaginosas amplias.

A su vez, para desempeñar la función de transmisión de las fuerzas de compresión hacia el hueso subcondral, el espesor de cada uno de los cartílagos articulares es variable, siendo mayor en las articulaciones de carga. Por ejemplo, éste oscila entre los 0,5 mm en la cavidad glenoidea de las falanges, hasta los 4 mm en la superficie

articular de las mesetas tibiales. Asimismo, las articulaciones más congruentes disponen de un cartílago de menor espesor que las articulaciones menos congruentes²⁰². Igualmente, podemos encontrar áreas de diferente grosor de cartílago en una misma articulación. En los cóndilos de las cabezas de los metacarpianos observamos esta misma situación; la zona más palmar de las mismas está dotada de mayor espesor cartilaginoso puesto que las cargas que soporta la articulación son mayores en flexión. En las cabezas de los metatarsianos, se da la situación contraria: al ser las cargas mayores en extensión, encontramos mayor espesor cartilaginoso en la zona dorsal de las mismas.

También se han demostrado pequeñas diferencias entre el espesor del cartílago masculino y del femenino, siendo mayor el de los varones⁵⁶.

Por otra parte el CA, al igual que todas las variantes de cartílago, es avascular, careciendo además de linfáticos y nervios. Estas tres características añadidas a la hipocelularidad de este tejido (contiene aproximadamente 100×10^6 células/cm³ de media en el espesor completo del CA maduro⁴¹), hacen que su respuesta ante las agresiones externas o al proceso involutivo determinado por la edad sea limitada.

2. EMBRIOLOGÍA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

El tejido cartilaginoso deriva del mesénquima, desde células precursoras indiferenciadas se produce un proceso de proliferación y diferenciación que dará lugar al cartílago en todas sus variantes.

Así, en las zonas del embrión donde se formará más adelante el cartílago, las células mesenquimales retraen primero sus prolongaciones y se acumulan en densos agregados llamados tejido procondral o centros de condricación. A medida que las células crecen y se diferencian hacia condroblastos, segregan a su alrededor una matriz extracelular (MEC) metacromática.

Progresivamente, al aumentar el material intersticial, las células se separan unas de otras en cavidades cerradas o lagunas, también llamadas condroceles, y poco a poco asumen las características citológicas de las células cartilaginosas maduras o condrocitos. El tejido conjuntivo que rodea a estos cartílagos recién formados se denomina pericondrio y perdurará, salvo en algunas localizaciones específicas como en la superficie del CA. En él se ubican los vasos sanguíneos que nutrirán por difusión al tejido condral.

El crecimiento continuado del cartílago se realiza por dos mecanismos diferentes:

- la división mitótica de los condrocitos junto con la secreción de matriz nueva entre las células hijas, da lugar a

un crecimiento del cartílago desde dentro, denominado crecimiento intersticial o por intususcepción. Los grupos celulares resultantes de este proceso de división se denominan condronas o grupos isogénicos. Según la posición espacial de sus células, las condronas reciben el nombre de lineales, cuando forman una fila, y de coronarias cuando tienen una organización esférica

- a lo largo de la vida embrionaria, las células indiferenciadas de la capa interna o condrogénica del pericondrio se van diferenciando constantemente a condrocitos, segregan en torno a ellas matriz y de este modo van añadiendo nuevas células y matriz sobre la superficie de la masa del cartílago: se trata del crecimiento aposicional.

3. ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LAS DIFERENTES VARIETADES DE CARTÍLAGO

3.1. CARTÍLAGO ELÁSTICO

Macroscópicamente el CE es de color amarillo y más opaco y elástico que el CH. Sus células tienen una forma redondeada, están rodeadas por cápsulas y se distribuyen aisladas o en grupos isogénicos de dos a cuatro células dispuestas linealmente. La matriz condral contiene, junto a fibras de colágeno tipo II, numerosas fibras ramificadas de elastina que forman una red muy densa. En sus aspectos

fundamentales, está formado como el CH pero además posee redes de fibras elásticas que rodean las condronas, atraviesan la matriz interterritorial y establecen contacto con fibras elásticas en el pericondrio²⁷⁸ (Figura 1).



Figura 1: microscopía óptica de una muestra de cartílago elástico, teñido con orceína, en la que se observan condrocitos dispuestos en condronas lineales y rodeados por MEC rica en elastina (aumentos originales 60x).

Si tomamos como ejemplo el cartílago del lóbulo de la oreja, el CE se caracteriza por una transición gradual de los condrocitos: desde numerosos pequeños estratos de células orientadas paralelamente a la superficie del cartílago hasta zonas con células más gruesas y en menor cuantía, dispuestas perpendiculares a la superficie cartilaginosa en

las zonas más profundas. Las zonas periféricas de la MEC presentan mayor cantidad de colágeno que las zonas más centrales. La presencia de uno u otro tipo de colágeno dependerá de la función de cada una de las zonas del CE: la presencia de colágeno tipo II se relaciona con la rigidez del tejido en el que asienta²⁰⁵.

3.2. FIBROCARTÍLAGO

Sus células cartilaginosas encapsuladas están aisladas o en parejas y a veces alineadas en cadenas entre los haces de fibras colágenas gruesas de tipo I que se asocian a una pequeña proporción de otras más finas, de tipo II, y habituales en el cartílago. La sustancia fundamental es apenas apreciable, con excepción de la inmediata vecindad de las células (Figura 2).

El FC tiene una estrecha relación con el tejido conjuntivo de las cápsulas y de los ligamentos articulares. Es una forma transicional gradual entre el cartílago y el tejido conjuntivo denso. En este sentido, tomando el ejemplo del menisco, existe una íntima relación entre sus características, su estructura histológica y la función de protección que realiza. La baja permeabilidad de su MEC es indispensable para disipar la energía y absorber la presión ejercida sobre el CA⁵⁹.

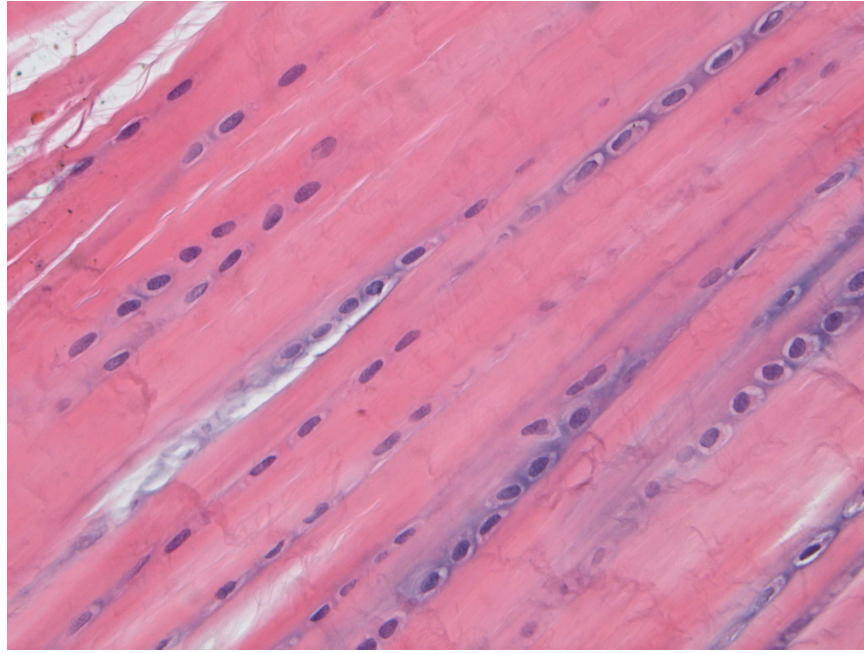


Figura 2: microscopía óptica de una muestra de fibrocartilago teñido con HE, en la que se observan condrocitos dispuestos en parejas o pequeñas cadenas entre haces gruesos de colágena (aumentos originales 40x).

3.3. CARTÍLAGO HIALINO

Se trata de la variante más numerosa de este tipo de tejido. Macroscópicamente es un cartílago blanco nacarado que presenta características estructurales que lo diferencian de las otras variedades de cartílago: sus condrocitos tienden a formar pequeños grupos isogénicos frecuentemente coronarios, y su matriz contiene fundamentalmente colágeno tipo II (Figura 3).

Por lo que se refiere a los condrocitos, presentan un núcleo redondo u oval que contiene uno o varios nucleolos; su aparato de Golgi se encuentra bien desarrollado; el

citoplasma que lo rodea contiene mitocondrias alargadas y también cantidades variables de glucógeno. Cuando se está formando MEC en el cartílago en crecimiento o regeneración, el citoplasma se hace más basófilo y el aparato de Golgi se hace extraordinariamente grande y se acompaña de vacuolas de tamaño variable, que en ocasiones contienen gránulos o filamentos. Unas vacuolas parecidas se encuentran también en la superficie celular, donde parecen estar descargando su contenido en la matriz de alrededor⁵⁷.

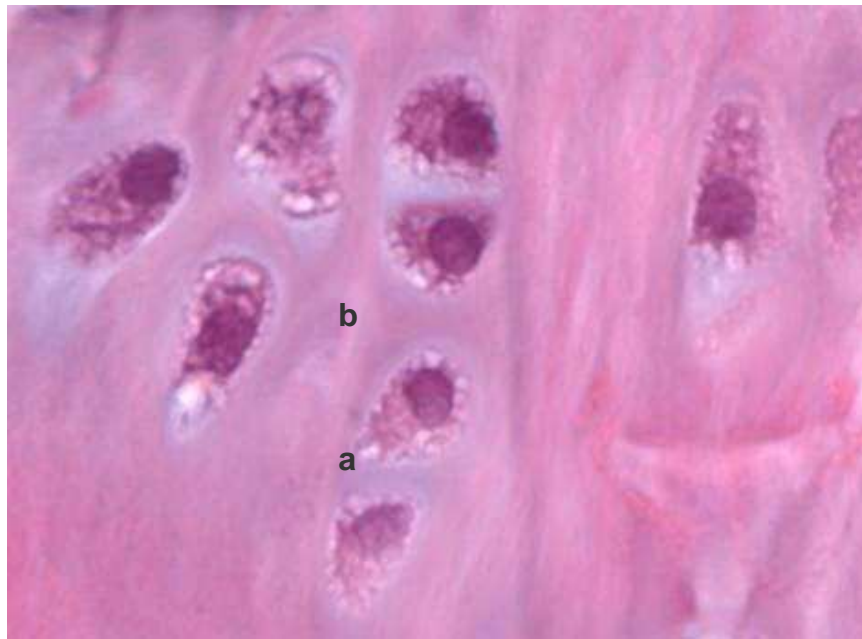


Figura 3: detalle a microscopía óptica de una muestra de cartílago hialino. Los condrocitos se disponen formando grupos isogénicos coronarios. La matriz capsular (a) envuelve a cada grupo isogénico; ésta a su vez queda rodeada por la matriz interterritorial (b) (tinción HE, aumentos originales 60x).

La MEC del CH está constituida por una importante cuantía de proteoglicanos (PTGs) que se asocian al colágeno tipo II. Estas moléculas colagénicas fibrosas están constituidas por un único tipo de cadena $\alpha 1(\text{II})$. La organización molecular de la MEC es idónea para asegurar las funciones del CH en las articulaciones: el armazón fibrilar de colágeno determina y mantiene la forma del tejido y resiste a las fuerzas de tracción, mientras que los agregados de PTGs que ocupan los intersticios proporcionan un gel viscoso hidratado que absorbe las fuerzas de compresión.

Desde el punto de vista de su localización respecto a cada grupo isogénico de condrocitos, se distinguen dos áreas en la MEC: la matriz capsular o territorial es la que rodea a cada grupo isogénico y la matriz intercapsular o interterritorial se localiza entre los grupos celulares.

4. ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

El CA es una variante especial de CH, ya que contiene los mismos componentes celulares y matriciales, pero con un patrón estructural diferente según su topografía. Desde la superficie hasta el hueso subcondral se distinguen cuatro capas: una capa superficial o tangencial, una capa de

transición, una capa profunda o radiada y, por último, una capa calcificada (Figuras 4 y 5).

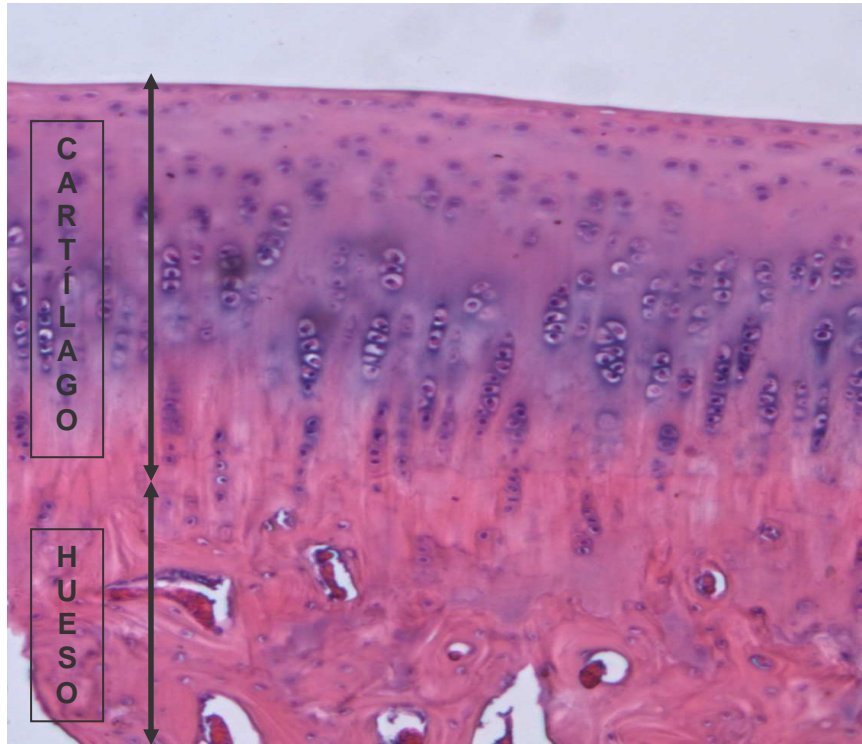


Figura 4: estructura histológica del complejo osteocondral. Cartílago articular tapizando la superficie libre y el tejido óseo subyacente (tinción de HE, aumentos originales 40x).

4.1. CAPA SUPERFICIAL O TANGENCIAL

Es una capa delgada, que ocupa el 3% del espesor del CH. Los condrocitos están separados unos de otros, son aplanados y ovalados y con eje mayor horizontal respecto a la superficie libre. Solamente poseen prolongaciones celulares en la cara inferior y profunda. Las células más superficiales siempre están separadas del borde libre del

cartílago por una fina capa de fibras de colágeno de disposición horizontal.

En la MEC, las fibras colagénicas son finas y unidas en haces paralelos entre sí y con respecto a la superficie, dejando poco espacio a la sustancia interfibrilar. En un plano paralelo a la superficie, la mayoría de estas fibras se orienta en el sentido de los movimientos articulares predominantes.

El colágeno más abundante es el de tipo II, aunque también se describen “colágenos menores” como el IX o el XI. En la capa más superficial, aquella de fibras más horizontales, algunos autores como Peyron y Stanescu²⁰² han comunicado la presencia de colágeno de tipo I. Los grandes PTGs, conocidos como agrecanos, se encuentran en escasa proporción, apareciendo también PTGs pequeños (decorina, biglicanos, fibromodulina) y glucoproteínas (GPs).

4.2. CAPA DE TRANSICIÓN O INTERMEDIA

Ocupa cerca del 5% del espesor del CH. Los condrocitos que la forman son más redondeados y tienen prolongaciones celulares en todo su contorno. Aparecen aislados y sin comunicación visible entre sí.

En la MEC las fibras colágenas son finas cerca de las células y más gruesas lejos de ellas. La mayoría de estas fibras adoptan una dirección oblicua respecto a la superficie del cartílago. Su sustancia interfibrilar es rica en PTGs.

4.3. CAPA PROFUNDA O RADIADA

Constituye la capa de mayor espesor, significa el 90% del CA. Sus condrocitos son voluminosos, redondeados y sus orgánulos intracelulares desarrollados indican un anabolismo activo, sobre todo en la parte superior de esta capa.

Algunas células se agrupan en pares, sin que se observen imágenes de mitosis. En su parte baja, ciertos condrocitos se alinean en hileras verticales y radiadas, disposición que se relaciona con la participación de esta porción del CA en el crecimiento del núcleo fisario de crecimiento óseo. En ella, destaca la presencia de colágeno tipo II y de un alto contenido en PTGs.

En esta capa se describen las formaciones que estructuran la MEC: las condronas lineales. Cada condrona está formada por varios condrocitos, cada uno de ellos unido desde su superficie a un glicocáliz pericelular envuelto por una cápsula fibrilar pericelular²⁰⁴.

Cada célula o grupo de células está rodeado de cerca por una especie de cesto de fibras. En el caso de un grupo celular, el cesto emite tabiques que aíslan más o menos cada célula. Este dispositivo se prolonga a menudo en un trazo fibroso, a veces más claro en su parte central (se denomina por eso “chimenea”) y permite describir en la MEC, tres zonas:

- a) la zona pericelular inmediatamente adyacente al condrocito
- b) la zona territorial que incluye sobre todo el cesto fibroso
- c) la zona interterritorial más alejada de las condronas.

4.4. CAPA CALCIFICADA

Ocupa el 2-3% del grosor del CA. Se caracteriza por la presencia de depósitos de hidroxapatita (HA) y de acúmulos cálcicos pegados a las fibras colágenas, que a su vez, están agrupadas en haces gruesos predominantemente de disposición vertical.

Sus condrocitos adoptan una disposición en columnas también verticales, entre las fibras. A su alrededor, aparecen fibras de colágeno tipo X, característico de la zona hipertrófica del cartílago.

El límite entre la capa profunda y la capa calcificada está marcado por un frente de calcificación o *tidemark*, línea ondulada en la que cesan las precipitaciones cálcicas. Este frente tendría una tendencia a progresar hacia la parte más superficial del CA, que sería frenada por una actividad inhibidora permanente de los condrocitos de la porción inferior de la capa profunda o radiada²⁰².

Por su parte, la zona de unión entre la capa calcificada y el hueso subcondral tiene un perfil muy irregular con numerosas interdigitaciones. Esta disposición

contribuye a la solidez entre el cartílago y el hueso, ya que no hay ningún sistema fibroso que pase de uno a otro. La línea de unión entre ambas zonas, está perforada por algunos canales vasculares que dan paso a capilares provenientes de las cavidades de la médula ósea subyacente (Figura 5).

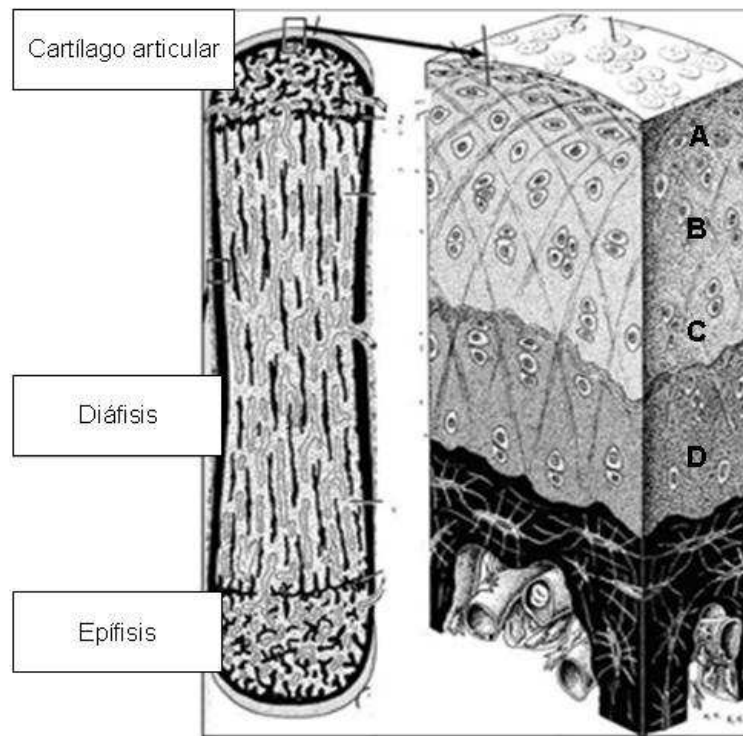


Figura 5: esquema del complejo osteocondral con sus diferentes zonas o capas en relación con un hueso largo. A) Capa superficial o tangencial. B) Capa de transición o intermedia. C) Capa profunda o radiada. D) Capa calcificada.

5. BIOQUÍMICA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

El CA es un tejido conjuntivo especializado con relativamente pocas células en una MEC abundante (los condrocitos ocupan menos del 3% del volumen total del tejido). Estos condrocitos desempeñan un papel fundamental en la formación y conservación de la MEC. A su vez, ésta asegura las cualidades mecánicas del tejido y también interviene en el estado de diferenciación y actividad del cartílago.

La composición química del CA varía de una a otra articulación, en distintas zonas de una misma articulación (con independencia de que se trate o no de una zona de carga) y de acuerdo con la edad. Asimismo, esta composición es diferente entre las diferentes capas del CA, al igual que lo es entre los compartimentos pericelular, territorial e interterritorial del mismo. Así, por ejemplo, el contenido de colágeno es mayor en la superficie, menor en la zona media, para incrementarse de nuevo en la zona profunda.

La composición bioquímica media aproximada del CA normal del adulto, es la siguiente: 66-79% de agua, 48-62% de colágeno, 14-23% de glicosaminoglicanos (GAGs), 8-15% de proteínas y menos del 1% de los siguientes componentes: hialuronato, ácido siálico, lípidos, lisozima y glucoproteínas¹⁵⁷.

5.1. PROTEOGLICANOS

Los PTGs son proteínas con una columna vertebral o eje de la que irradian, en una configuración parecida a un cepillo limpia-tubos, los GAGs. Los principales GAGs de la matriz cartilaginosa son el condroitín sulfato (CS) y el queratán sulfato (QS). En un extremo de la proteína axial hay un segmento polipeptídico relativamente libre de cadenas laterales de GAGs, llamada zona de unión con el ácido hialurónico (AH). Las moléculas de PTGs están unidas a este extremo por medio de una proteína de enlace (PE) a moléculas muy largas de AH. Los complejos de PTGs así constituidos, ocupan los intersticios de la red de fibrillas colágenas.

El CA contiene varias clases de PTGs:

- a) PTGs grandes o agreganos (AGs), que forman agregados por asociación con el AH
- b) PTGs grandes menos caracterizados, que no se asocian al AH
- c) Varias poblaciones de PTGs pequeños: la decorina (se denomina así porque “decora” las fibras de colágeno a las cuales se asocia), el biglican, el lumican y la fibromodulina
- d) Los PTGs asociados a la membrana de los condrocitos o que forman parte de la misma

e) Fragmentos de PTGs grandes que se acumulan con el paso de los años en la matriz y que permanecen unidos al AH.

5.1.1. GRANDES PTGs O AGRECANOS

Los AGs son moléculas de gran tamaño, que se hallan en el CA en forma de enormes agregados. Alrededor del 80-90% de su masa la conforman los carbohidratos, principalmente cadenas de CS pero también QS y oligosacáridos, unidos a la proteína central.

La región N-terminal de la proteína contiene dos dominios globulares G1 y G2 separados por un segmento alargado IGD (*interglobular domain*). La región alargada más extensa sirve de enganche a las cadenas de CS y a la mayoría de las cadenas de QS, culminando en un dominio globular carboxiterminal G3.

Las cadenas de CS están formadas por unidades de disacáridos que se repiten. Contienen un solo tipo de ácido urónico, el ácido glucurónico y un residuo de N-acetil-galactosamina. El QS está formado por unidades repetidas de N-acetil-lactosamina. El contenido de los AGs en QS aumenta con la edad y alcanza entre el 20% y el 25% de los GAGs en el CA del adulto.

En cuanto a la localización del QS en los AGs, éste se encuentra sobre todo en la región rica en QS de la proteína central. Hay una cantidad reducida de cadenas de

QS, diseminada en la región rica en CS y hasta en las regiones G1 y G2.

Los oligosacáridos unidos a la proteína central son de dos tipos: los que están unidos por el nitrógeno y los que lo están por el oxígeno.

5.1.2. PEQUEÑOS PROTEOGLICANOS

Se describen cuatro pequeños proteoglicanos o SLRPs (de *small leucine-rich repeat proteoglycans*): la decorina, el biglican, la fibromodulina y el lumican.

La decorina y el biglican pueden ser clasificados también como PTGs dermatán sulfato, mientras que la fibromodulina y el lumican son PTGs queratán sulfato.

La función de estos pequeños PTGs depende de su proteína central y de sus cadenas de GAGs. Así, su proteína central permite a los SLRPs interactuar con el colágeno fibrilar para formar el armazón del tejido. Además, limitan el acceso de las colagenasas a los sitios de división de cada una de las moléculas de colágeno. Mientras que la interacción de la decorina, la fibromodulina y el lumican con las moléculas de colágeno está universalmente aceptada, no sucede lo mismo en el caso del biglican. *In vitro*, la interacción del biglican depende de las condiciones de su entorno. La fibromodulina y el lumican interactúan con la misma región de la molécula de colágeno, que es distinta de la que utiliza la decorina.

Aparte de las interacciones con el colágeno, estos pequeños PTGs interaccionan con muchas otras macromoléculas, que incluyen los colágenos tipos VI, XII y XIV; la fibronectina y la elastina; y factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento tisular (TGF) beta y el factor de necrosis tisular (TNF) alfa. Asimismo, las cadenas de GAGs también interaccionan con numerosos factores de crecimiento, permitiendo a los SLRPs proporcionar un lugar para el acúmulo de éstos en la matriz MEC del CA. De esta manera, los pequeños PTGs ayudan a modular el metabolismo de los condrocitos regulando el acceso de los factores de crecimiento a las células.

5.2. ÁCIDO HIALURÓNICO O HIALURONAN

El AH (su sal sódica o hialuronan) es el constituyente principal del líquido sinovial (LS) y le confiere la mayoría de sus propiedades. Es un polisacárido lineal formado por diez mil a doce mil dobletes de ácido glucurónico y de N-acetilglucosamina. Característicamente, sus moléculas adoptan un doble comportamiento viscoso y elástico.

Los condrocitos disponen de receptores de membrana CD44 para hialuronan; de esta relación, entre otros factores, parece que dependen los procesos anabólicos y catabólicos del CA¹²⁸.

Los mamíferos poseen tres genes de hialuronan sintetasa (HAS), denominados HAS 1, HAS 2 y HAS 3, cada uno de los cuales reside en una localización cromosómica diferente. Una vez sintetizado, el hialuronan se deposita directamente en el espacio extracelular, y se sitúa como una capa alrededor de los condrocitos.

Mientras que cada una de las tres HASs produce hialuronan de idéntica composición, existen diferencias en la longitud de la cadena del producto y en la facilidad con que se desprende de la superficie celular.

La concentración y tamaño del hialuronan en el LS, disminuye con el paso de los años (un promedio de 3,8 mg/ml en el adulto joven y de 2,5 mg/ml en la persona de edad avanzada). La disminución de su tamaño depende más de la degradación que de la menor síntesis, siendo las hialuronidasas o los radicales libres sus principales causantes²²³.

En este orden de ideas, el hialuronan parece ser esencial en la lubricación del deslizamiento de la membrana sinovial sobre sí misma o sobre el cartílago. En el contacto entre dos cartílagos, se conoce la existencia *in vivo* de una capa de hialuronan altamente concentrado. Además del efecto de protección mecánica del cartílago, esta capa también podría conformar una matriz de mantenimiento de compuestos glucoproteicos y/o

formaciones lipídicas microlaminares con acción lubricante propia.

5.3. PROTEÍNAS DE ENLACE Y PROTEÍNAS NO COLÁGENAS

Las proteínas de enlace (PEs) o *link proteins* tienen una estructura análoga a la de la región G1 de los agreganos; dispone de los dominios A, B1 y B2. El dominio A es el responsable de la interacción con a región G1 de los AGs, mientras que el dominio B interactúa con el AH.

Las PEs del CA desempeñan diversas funciones en los agregados de PTGs. Por su capacidad para interactuar tanto con el AH como con el dominio G1 de los AGs, estabiliza los agregados de PTGs, previniendo su disociación en condiciones fisiológicas. En segundo lugar, participan en el fenómeno denominado de “agregación diferida”: los AGs de nueva síntesis tienen una escasa capacidad para interactuar con el AH y requieren cambios en la conformación de su dominio G1 mediados por las PEs, para promover la formación de agregados. En tercer lugar, junto con el dominio G1 de los AGs, las PEs forman una superficie proteica que recubre la superficie del AH. De esta manera, protegen al AH de degradarse bajo la acción, entre otros, de las hialuronidasas y de los radicales libres.

Además de las PEs, se describen varias glucoproteínas no colágenas en el CA. Entre ellas, destacan las siguientes:

a) la proteína COMP o *cartilage oligomeric matrix protein* se localiza sobre todo alrededor de los condrocitos. Se especula sobre su posible acción antiangiogénica en el CA

b) la condrocalcina es un polipéptido carboxiterminal de colágeno tipo II. Se une a los cristales de HA. Aunque está presente en varios tipos de cartílagos, es más abundante en el CA

c) la ancorina II es una proteína que se sitúa en la superficie de los condrocitos. Es homóloga con las proteínas intracelulares que fijan el calcio el hueso. Se fija sobre el colágeno tipo II, participando en las interacciones entre los condrocitos y la MEC. Se le supone un papel como mecanorreceptor en el CA

d) la PARP o *proline arginine rich protein* es poco abundante en el CA. Su función es desconocida

e) la fibronectina presente en el CA, se sabe diferente de la detectable en el plasma sanguíneo

f) la tenascina ha sido identificada únicamente en el cartílago embrionario.

5.4. COLÁGENOS

Los colágenos se definen como macromoléculas estructurales de la MEC, que en su conformación, incluyen

uno o varios dominios con una forma característica en triple hélice.

Se describen varios tipos de colágeno, numerados con cifras romanas según el orden de su descubrimiento (del tipo I al tipo XVI). El CA contiene diversos tipos de colágeno. Entre ellos, el principal es el colágeno tipo II, que se encuentra en todos los CH (en menor proporción en los otros tipos de cartílago), en el núcleo pulposo del disco intervertebral, en el cuerpo vítreo del ojo, en el estroma embrionario de la córnea y en varios órganos del embrión.

Aunque el tipo II es el colágeno principal del CH en general, y por lo tanto del CA, el colágeno tipo XI también está presente en el mismo. La cantidad de colágeno tipo IX en el CA disminuye con la edad; porcentualmente, el cartílago fetal posee el 10% de colágeno tipo IX mientras que el CA del adulto está compuesto por el 1% de este colágeno.

A diferencia del colágeno tipo II (colágeno fibrilar), el tipo IX (al igual que los tipos XII y XIV) pertenece a un grupo de colágenos denominado FACIT (de *fibril associated collagen with interrupted triple-helices*). Los diferentes miembros de este grupo podrían competir por los mismos sitios en la superficie de las fibrillas tipo II, confiriéndoles otras propiedades.

El colágeno tipo XI pertenece al grupo de colágenos fibrilares y es un componente cuantitativamente menor del

CA (relación 1/30 con el colágeno tipo II). Las finas fibrillas de colágeno tipo XI formarían el centro de las fibras de colágeno tipo II.

El colágeno tipo VI se encuentra en pequeñas cantidades en el CA. La distribución predominante de este colágeno alrededor de los condrocitos, sugiere que pueda tener una función de unión de las estructuras circundantes a las células cartilaginosas.

El colágeno tipo X (colágeno de cadena corta, al igual que el colágeno tipo VIII) es sintetizado por las células hipertróficas en la zona de calcificación del cartílago de crecimiento, en zonas de osificación secundaria, en el callo óseo de fractura, en los osteofitos y en las zonas de reparación del cartílago artrósico. En el CA articular normal se encuentra en la zona calcificada. El tamaño de la molécula es aproximadamente la mitad del de los colágenos fibrilares. En la microscopía electrónica, el colágeno tipo X puede aparecer en dos formas: como una trama de filamentos alrededor de los condrocitos (Figura 6) o formando parte de la MEC, asociado a las fibras de colágeno de los tipos II, IX y XI.

El colágeno tipo III está presente en el CA normal y en el degenerativo. Se localiza unido al colágeno tipo II como un componente menor pero habitual. En el cartílago artrósico, este colágeno tiende a concentrarse en la capa superficial y en la parte superior de las capas intermedias,

siendo sintetizado por los condrocitos en ausencia de expresión del colágeno tipo I y sobre todo cuando la MEC se encuentra dañada⁵⁴.

El colágeno tipo I está presente sobre todo en el hueso. En el CA lo hace en su superficie y en escasa cantidad.



Figura 6: microscopía electrónica de un condrocito rodeado de fibras de colágeno (aumentos originales 2500x).

6. FISIOLÓGÍA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

El CA cumple dos funciones distintas. Por una parte, transmite las cargas mecánicas de un segmento del

miembro al siguiente, amortiguándolas en el tiempo y en el espacio. Por otra parte, permite el deslizamiento entre dos superficies articulares en condiciones óptimas, durante la carga.

6.1. CARGAS

El CA es un tejido semiduro depresible por efecto de la compresión, que recupera su forma inicial inmediatamente después de cesar dicha fuerza. Estas propiedades dependen de sus principales componentes bioquímicos: PTGs, AH, GAGs y agua.

En un primer momento, las cargas moderadas aplicadas sobre el CA, provocan una deformidad reversible sobre éste, sin daño tisular. Si se ejerce una carga considerable, la organización del entramado fibroso del cartílago se rompe y promueve la hiperhidratación de los PTGs, iniciando la primera etapa de la degradación del tejido.

La resistencia del CA a la compresión está condicionada por su permeabilidad (y por lo tanto, por su concentración en PTGs), que regula el desplazamiento de los fluidos de una zona a otra. Así, cuanto más elevada es la concentración de PTGs, la permeabilidad es más débil y el tejido cartilaginoso más resistente a la compresión. Parece pues lógico que la tolerancia a las cargas del CA dependa fundamentalmente de la hidrofilia de los PTGs y que la

destrucción enzimática de los PTGs acrecienta la deformabilidad del CA.

6.2. DESLIZAMIENTO - LUBRIFICACIÓN

El escaso coeficiente de fricción (relación entre la fuerza necesaria para desplazar una sobre otra dos superficies en contacto y la fuerza que se aplica a esas superficies entre sí) de las articulaciones, depende en gran medida, de las características físicas tanto del LS como del CA.

El LS proviene de la membrana sinovial. Está formado por un trasudado plasmático originado en los capilares fenestrados de la sinovial. No contiene más que pequeñas moléculas de plasma, a las que se añaden AH y algunas GPs secretadas por las células sinoviales, principalmente los sinoviocitos B.

Entre las GPs del LS, se ha aislado una lubricina que se adhiere sobre cada una de las superficies cartilaginosas opuestas. Las mantiene aisladas entre ellas gracias a una fuerza de repulsión intermolecular recíproca, capaz de resistir a altas presiones: es el mecanismo de la lubricación límite²⁰².

Por último, en la capacidad de deslizamiento articular intervienen algunas características del cartílago mismo. Éste es poroso para el agua y los solutos de bajo peso molecular. Expulsados de las regiones sometidas a una carga, emigran

hacia zonas vecinas y trasudan hacia la superficie por debajo y por delante del área de presión. Por detrás de la misma, se reabsorben. Este proceso se denomina lubricación rezumante.

7. METABOLISMO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

7.1. METABOLISMO ENERGÉTICO

El CA es el único tejido conectivo avascular en el que el aporte de glucosa y de oxígeno está significativamente disminuido. La glucosa es un importante recurso metabólico para la diferenciación de los condrocitos durante el crecimiento post-natal y para la homeostasis del CA del adulto. Se trata de un precursor estructural para la síntesis de los GAGs de la MEC. Las concentraciones de glucosa en el CA pueden oscilar dependiendo de la edad, de la actividad física o de algunas variantes endocrinológicas.

Los condrocitos son células glucolíticas (metabolizan la glucosa en lactato por glucólisis anaerobia) y están capacitados para ajustar el metabolismo celular según las concentraciones de glucosa y de oxígeno en la MEC (la concentración de oxígeno en la superficie del CA, en condiciones normales, oscila entre 20 y 80 mmHg). En consecuencia, tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones de bajas presiones de oxígeno y déficit de nutrientes. Así, pueden expresar diferentes isoformas de la

familia GLUT/SLC2A de transportadores de glucosa según la presión de oxígeno, el metabolismo hormonal o la presencia de citoquinas pro-inflamatorias¹⁸².

No obstante, con el oxígeno del que dispongan, las células cartilagosas también pueden utilizar la vía oxidativa para producir energía, gracias fundamentalmente a sus deshidrogenasas mitocondriales.

Una tercera vía utilizada por los condrocitos para degradar la glucosa es la vía de los pentosafosfatos.

Asimismo, en estudios *in vitro* se ha demostrado que el CA requiere aminoácidos para su crecimiento y como fuente de energía. Es el caso de la glutamina, considerada necesaria como donante de grupos amino para la síntesis de los GAGs²⁰².

7.2. METABOLISMO DE LOS PROTEOGLICANOS Y DEL COLÁGENO

La síntesis de los agreganos comprende varias etapas: la formación de la proteína central, de los dos tipos de oligosacáridos, de las cadenas de CS y de su secuencia de enlace con la proteína, y del QS. Después de la separación por clivaje de un pequeño péptido señal, el precursor de la proteína central se sitúa en el retículo endoplásmico rugoso y es sustituido por los oligosacáridos ricos en manosa y unidos por un nitrógeno. El precursor de la proteína central pasa entonces a los compartimentos del

aparato de Golgi, donde se completa, mediante adición de oligosacáridos O-ligados y de cadenas de QS y CS.

En la polimerización de los CS intervienen una serie de intermediarios uridindifosfato (UDP) producidos a partir de la glucosa por dos vías metabólicas. La primera se encarga de la conversión de la glucosa-1-fosfato en uridindifosfato-N-acetil-galactosamina. La segunda vía metabólica transforma la glucosa-1-fosfato en UDP-glucosa que, a su vez, puede transformarse en UDP-ácido glucurónico, UDP-galactosa o UDP-xilosa. Una serie de seis glucosiltransferasas, concretamente la xilosiltransferasa, las galactosiltransferasas I y II, la glucuroniltransferasa I, la N-acetilgalactosamil-transferasa y la glucuroniltransferasa II, interviene en la construcción de cadenas de condroitina y de su segmento de enlace con la proteína central.

Los datos más interesantes sobre la síntesis y el catabolismo de estas moléculas de PTGs se han obtenido a partir de muestras de CA en condiciones de equilibrio metabólico (la síntesis y secreción de las moléculas por los condrocitos se igualan con el catabolismo y las pérdidas, lo que hace que el contenido en PTGs del tejido permanezca constante). Tales procesos en el CA normal en estado de equilibrio, están regulados por los condrocitos; sin embargo, esta homeostasis puede romperse por la intervención de diversos factores mecánicos o bioquímicos.

En esos estudios, se ha demostrado que la primera etapa del catabolismo de los agregados de PTGs se hace por medio del clivaje de los agrecanos ubicados en el dominio que une las regiones globulares G1 y G2 de la parte aminoterminal de la proteína central. El lugar concreto del clivaje se sitúa entre un residuo glutamato y un residuo alanina. Esta actividad catabólica se le atribuye a la enzima agrecanasa. Otras proteínas, incluidas las metaloproteasas, actúan en la región interglobular G1 y G2, y cortan la proteína en distintos sitios, produciendo péptidos con secuencias N-terminales diferentes. Esta situación hace pensar que, en condiciones normales, su papel en el catabolismo de los PTGs es reducido o nulo y que la agrecanasa es la enzima principal en estos procesos.

7.3. FACTORES BIOMECÁNICOS

Las cargas aplicadas sobre las articulaciones y los movimientos de las mismas, están relacionadas con el metabolismo del CA. Esta relación se ha podido comprobar tanto *in vivo* como *in vitro*. Little y colaboradores demostraron que el ejercicio agotador en caballos, condicionaba una alteración en la síntesis de PTGs en las zonas de elevado stress de contacto en las articulaciones de las patas del animal. Estas anomalías metabólicas persistían incluso dieciséis semanas después de cesar el ejercicio, pudiendo tener efectos deletéreos en las

propiedades biomecánicas del tejido cartilaginoso¹⁴⁷. Asimismo, la inmovilización completa de un miembro provoca adelgazamiento del CA, disminución de su contenido en PTGs y disminución del contenido en agua del tejido cartilaginoso. La reanudación del apoyo normal del miembro y de los ejercicios moderados, llevan al restablecimiento del contenido en PTGs²²⁴.

Igualmente, estudios *in vitro* con discos de cartílago en cultivo sometidos a fuerzas mecánicas, han demostrado que la síntesis de GAGs y la incorporación de aminoácidos al CA, son estimuladas por fuerzas intermitentes de compresión^{138,276}.

8. LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

8.1. ETIOLOGÍA

Las lesiones del CA se producen habitualmente por alguno de los siguientes mecanismos²⁸⁴:

- Traumatismo articular
- Degeneración articular crónica (sobrecarga mecánica)
- Anomalías del hueso subcondral (necrosis avascular, osteocondritis disecante).

Las lesiones traumáticas se establecen mediante un impacto directo o merced a la aplicación de fuerzas de cizallamiento sobre la superficie articular durante un mecanismo de acción indirecto. Esta segunda situación se

produce, por ejemplo, en algunas lesiones agudas del ligamento cruzado anterior de la rodilla, durante las cuales, se describen fuerzas de cizallamiento entre la zona posterior de la meseta tibial y el cóndilo femoral externo, sobre el que se ocasiona una contusión ósea.

Las lesiones degenerativas del CA pueden desencadenarse sin factores predisponentes, acompañando al proceso involutivo fisiológico del resto de los tejidos del organismo. Sin embargo, se conocen diferentes situaciones que favorecen la degeneración del CA. Entre estas últimas, destacan la extirpación quirúrgica de tejido meniscal (fundamentalmente en la rodilla) o las alteraciones en la alineación de las extremidades (una deformidad en varo o en valgo de la rodilla constituye el inicio de una degeneración del compartimento interno o del externo de la misma, respectivamente).

Teniendo en cuenta que el hueso subcondral constituye el soporte estructural del CA, la alteración de la integridad del primero desencadena, en muchos casos, un colapso del segundo. En el caso en que ambas situaciones se produzcan en gran parte de la superficie de la articulación, puede verse alterada con el tiempo la integridad estructural de la misma, condicionando así un proceso degenerativo articular.

8.2. CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS

Las lesiones del CA se describen según los siguientes parámetros: localización, grado, tamaño y morfología.

Las fuerzas reactivas que se producen sobre el CA (de compresión o de cizallamiento) son diferentes según el área de la articulación que se considere. En este sentido, dependiendo de la situación (entre otros factores) de la lesión cartilaginosa desencadenada, se establecen los criterios o indicaciones para su tratamiento. En general, las lesiones situadas en las denominadas zonas de carga de las articulaciones de las extremidades inferiores, requieren técnicas para su tratamiento que permitan obtener cartílago *hyaline-like* e incluso CH.

Para establecer el grado de las lesiones condrales, cualquier clasificación al respecto considera como criterio básico, la profundidad de las mismas. Así, se distinguen las afectaciones condrales (en el espesor del cartílago) de las osteocondrales (que abarcan todo el espesor cartilaginoso y en mayor o menor medida el hueso subcondral) (Figura 7). Esta valoración, hoy en día, suele realizarse mediante técnicas artroscópicas. Aunque actualmente se sigue avanzando en el diagnóstico preciso del grado de estas lesiones mediante resonancia nuclear magnética ²⁰⁶, habitualmente se establece según la clasificación original de

Outerbridge o utilizando la más reciente de la *International Cartilage Repair Society (ICRS)* (Figura 8).

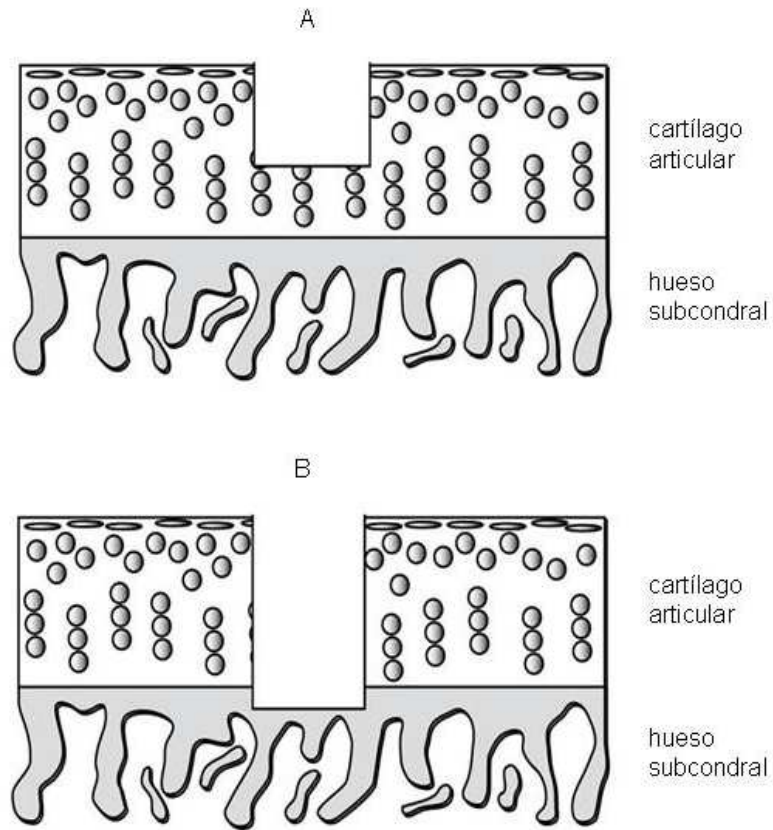


FIGURA 7: tipos de lesiones según la profundidad de las mismas. En el esquema superior (A), se aprecia una lesión cartilaginosa de espesor parcial. En el esquema inferior (B), aparece una lesión cartilaginosa de espesor total, con afectación del hueso subcondral (modificado de Redman SN et al.).

Grado	Outerbridge	Outerbridge modificada	ICRS
0	Cartílago normal	Cartílago intacto	Cartílago intacto
I	Cartílago blando y edematoso	Cartílago blando con superficie intacta	Lesión superficial (fisuras o grietas)
II	Fragmentación o fisura en un área menor de media pulgada de diámetro	Ulceración superficial, fisuras con afectación de menos del 50% de la profundidad del cartílago	Lesión de menos de la mitad del espesor del cartílago articular
III	Fragmentación o fisuras en un área mayor de media pulgada de diámetro	Úlcera profunda o fisura condral con afectación mayor del 50% del espesor del cartílago, sin llegar al hueso subcondral	Lesión de más de la mitad del espesor del cartílago articular
IV	Hueso subcondral expuesto	Lesión de espesor completa con exposición del hueso subcondral	Lesión cartilaginosa con extensión al hueso subcondral

Figura 8: esquema para la clasificación de las lesiones del cartílago articular (modificado de Williams RJ et al.).

Igualmente gracias a las técnicas artroscópicas, se lleva a cabo la medición del tamaño del defecto cartilaginoso en milímetros cuadrados. En este caso, la superposición de ciertos instrumentos sobre la lesión, nos permite calcular la dimensión o extensión de ésta.

Por último, para caracterizar completamente estas lesiones, se analiza su morfología. Podemos detectar desde lesiones con aspecto de fisura condral (normalmente relacionadas con traumatismos) hasta afectaciones de morfología menos lineal y con bordes irregulares (habitualmente en procesos degenerativos).

9. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS LESIONES CONDRALES

La prevalencia tanto de las lesiones cartilaginosas degenerativas como de las traumáticas se considera elevada. Respecto a las lesiones degenerativas, ésta varía según el método utilizado para su valoración. La mayoría de los estudios epidemiológicos basan sus resultados en los análisis radiológicos de las articulaciones. Hunter considera que alrededor del 6% de los adultos de treinta o más años de edad presentan signos degenerativos en las radiografías simples de rodilla⁹⁸. Arden afirma que la osteoartritis es la enfermedad articular más frecuente en el mundo y que el 80% de la población mayor de setenta y cinco años, presenta cambios degenerativos articulares radiológicos. En

Estados Unidos significa la segunda causa de limitación laboral tras la cardiopatía isquémica, en varones mayores de cincuenta años⁷. Desde el punto de vista económico, el impacto que supone esta enfermedad en este país es de aproximadamente sesenta billones de dólares al año²⁶.

Por su parte, las lesiones cartilagosas post-traumáticas o por patologías de hueso subcondral (como en el caso de la osteocondritis disecante o de la osteonecrosis) se detectan en más del 10-12% de la población ²³⁰. Widuchowski en un estudio de más de cinco mil artroscopias de rodilla, encuentra lesiones cartilagosas en el 57% de los casos. De éstos, aproximadamente el 5% corresponden a lesiones grado 3 y 4 de Outerbridge, y las zonas más afectadas son el cóndilo femoral medial y la rótula ²⁸².

La alta prevalencia de las lesiones cartilagosas así como los continuos estudios sobre su tratamiento, quedan reflejados en el gran volumen de publicaciones relacionadas con el tema. El buscador bibliográfico *Pubmed* selecciona casi tres mil artículos entre los años 1963 y 2009 con los criterios de búsqueda "*articular cartilage injuries and treatment*" y veinticuatro mil artículos entre los años 1947 y 2009, con los criterios de búsqueda "*osteoarthritis and treatment*".

Sea cual fuere la etiología de la afectación cartilaginosa, el CA dispone de mecanismos propios de reparación que únicamente son efectivos en un porcentaje

reducido de los casos dependiendo de factores como la edad de la persona (en personas más jóvenes la probabilidad de reparación espontánea es mayor) ²²², la articulación afectada (las lesiones en articulaciones de carga normalmente son reparadas de forma espontánea por un tejido fibrocartilaginoso menos apto para soportar cargas y con más opciones de degenerar, respecto a articulaciones no sometidas a carga)¹³⁷. Así, la mayoría de las lesiones condrales con expresión clínica, necesitan procedimientos quirúrgicos de reparación, como expondremos más adelante.

10. MECANISMOS BIOLÓGICOS DE REPARACIÓN DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

El CA posee una capacidad de reparación y/o de regeneración muy limitada, debido en gran parte, a su condición de tejido avascular. Las células progenitoras de la sangre o de la médula ósea, e incluso los propios condrocitos, encuentran dificultades para migrar hacia las zonas dañadas¹²¹. Ciertas lesiones por encima de un tamaño crítico disponen de una reducida capacidad de curación intrínseca. Algunos trabajos experimentales han demostrado que las lesiones condrales u osteocondrales pueden tener capacidad de curación espontánea. Namba confirma esta hipótesis creando pequeñas lesiones

subcondrales en fetos de cordero¹⁸⁴. Shapiro obtiene una reparación parcial intrínseca de defectos de espesor completo y tamaño menor de 3 mm en conejos²³⁴. Sin embargo, defectos osteocondrales de tamaño mayor de 6 mm en un modelo experimental en cabras, raramente tienden a la curación espontánea e incluso evolucionan hacia una degeneración del CA más allá de la lesión inicial, según los resultados obtenidos por Jackson¹⁰⁵.

En las lesiones cartilaginosas superficiales, los condrocitos pueden activarse y proliferar para remodelar la superficie. Se obtiene habitualmente un tejido cartilaginoso cicatricial mixto con fibrocartílago y cartílago hialino. En las lesiones condrales de espesor parcial, los defectos no llegan a afectar al hueso subcondral. La reparación es de mala calidad y la escasa proliferación de condrocitos no suele ocupar las áreas dañadas⁴⁶.

Los defectos osteocondrales o algunos condrales de espesor completo, afectan al hueso subcondral. La capacidad de reparación intrínseca del tejido es mucho mayor en estos casos. La zona del defecto se rellena de sangre (hematoma) procedente del lecho subcondral, formándose un coágulo de fibrina junto con plaquetas y células sanguíneas de las series roja y blanca. Este coágulo sanguíneo puede rellenar defectos menores 2-3 mm de diámetro, pero en los de mayor tamaño, el hueco no queda completamente ocupado¹²¹. Las células pluripotenciales

mesenquimales, procedentes tanto de la circulación como de la médula ósea subcondral, invaden el coágulo de fibrina y pueden iniciar la reparación ósea y cartilaginosa. El coágulo de fibrina se transforma progresivamente en tejido fibroblástico con condrocitos. En este neot Tejido, el colágeno que predomina inicialmente es el de tipo I, creándose un fibrocartilago. La proporción de colágeno de tipo II aumenta a continuación durante unos veinticuatro meses, hasta llegar a predominar. En este momento el cartilago que se obtiene es parecido al CH, sin llegar a reproducir todas sus características, puesto que siempre persiste cierto contenido en colágeno tipo I. Transcurridos estos veinticuatro meses, el tejido cartilaginoso reparativo empieza a degradarse¹⁸⁷.

11. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS PARA LA REPARACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

El objetivo del tratamiento de las lesiones del CA es doble. Por un lado se pretende hacer disminuir o desaparecer los síntomas que producen, y por otro, prevenir una posible evolución hacia la degeneración de la zona lesionada y/o de las adyacentes.

Estas lesiones pueden dividirse en dos grupos, según asienten en una o en ambas superficies cartilaginosas de la articulación. Los casos en los que se afecta una única superficie articular, suelen producirse a consecuencia de un

traumatismo o de una distrofia en el contexto de una osteocondritis. Sin embargo, las lesiones de tipo degenerativo habitualmente asientan en ambas superficies articulares, conformando las llamadas “lesiones en espejo”.

El tratamiento de estas lesiones está en constante evolución en los últimos años. En este sentido, las técnicas para su reparación se han clasificado en dos grupos: las que consiguen una cicatrización de la lesión a expensas de un FC o de un cartílago mixto (fundamentalmente FC con escasa presencia de CH) o “técnicas paliativas” y las que se denominan “regenerativas”, ya que pretenden conseguir una reparación con cartílago de tipo hialino.

11.1. TÉCNICAS PALIATIVAS

11.1.1. LAVADO ARTICULAR

El mecanismo de acción del lavado articular (LA) en el contexto de una lesión cartilaginosa permanece incierto. Algunos autores^{9,47,63} asignan a esta técnica un papel de “eliminación mecánica” de las citoquinas (interleuquina (IL) 1 y TNF α , fundamentalmente) y de las metaloproteasas de la articulación, así como de los productos de degradación del CA, de los pequeños fragmentos cartilagosos libres o de los cristales de pirofosfato de calcio que irritan la membrana sinovial. En las fases precoces de la degeneración articular, la eliminación de dichas enzimas permite a los condrocitos

regular sus actividades biológicas. Otros mecanismos como la distensión capsular se han propuesto para explicar el efecto beneficioso sintomático del LA. La renovación del líquido sinovial podría mejorar la elasticidad del CH cambiando las relaciones entre los PTGs y el sodio y así, favorecer un aumento de la permeabilidad del CA⁴⁶. En cualquier caso, en las situaciones en las que desaparece el CA y queda expuesto el hueso subcondral, el beneficio de esta técnica es mínimo (se establece que el tiempo de mejoría es desde algún mes hasta un año).

Técnicamente, el LA puede realizarse de dos maneras. En las articulaciones de fácil acceso como la rodilla, el hombro, el codo o el tobillo, puede utilizarse el “lavado con aguja” bajo anestesia local⁸. Para ello, se utiliza un sistema de introducción de suero fisiológico estéril por una aguja colocada en un punto de la articulación y otro sistema de aspiración continua por una segunda aguja, situada en un punto articular diferente. En todas las articulaciones, podemos recurrir al LA artroscópico. Aunque pueda realizarse bajo anestesia local, suele utilizarse por su comodidad la anestesia loco-regional. Este tipo de LA permite además realizar gestos quirúrgicos asociados como una condrectomía de los *flaps* cartilagosos inestables, una meniscectomía o una sinovectomía.

Los gestos asociados al LA sobre el tejido cartilaginoso (como por ejemplo, las condroplastias o los

desbridamientos cartilagosos) pueden realizarse mecánicamente (fresa motorizada, pinzas artroscópicas,...) o mediante radiofrecuencia (RF). La RF para el tratamiento de las lesiones condrales adquiere importancia a finales de los noventa⁹⁵. Autores como Vangness o Yetkinler describen dos tipos de RF: la térmica y la ablativa^{265,298}. En el primer caso se utiliza RF monopolar y en el segundo RF bipolar. Se consigue una retracción del tejido articular sobre el que se aplica, intensidad y temperatura dependiente (se objetivan daños en el condrocito a partir de 45° C).

En definitiva, la utilización conjunta de los procedimientos mecánicos y de RF para el desbridamiento cartilaginoso, es la que aporta mejores resultados. La eliminación del cartílago fibrilado o desestructurado puede realizarse en gran parte con una fresa o un sinoviotomo motorizados, utilizando la RF para regularizar los bordes de la lesión condral o para lesiones más superficiales.

11.1.2. ESTÍMULO OSTEOCONDRALE

El objetivo de las diferentes técnicas de estímulo osteocondral es conseguir una reparación fibrocartilaginosa de la lesión exponiendo el hueso subcondral. Las células mesenquimatosas indiferenciadas se multiplican y pueden, en función de factores locales y de factores mecánicos, diferenciarse en tejido cartilaginoso o tejido óseo. Sin embargo, el cartílago generado es FC constituido de

colágeno tipo II frágil, y por lo tanto, diferente del CH fisiológico. Estas técnicas se describieron inicialmente para el tratamiento de las pérdidas de sustancia cartilagosas post-traumáticas; posteriormente, se han utilizado para tratar las condropatías degenerativas.

a) Perforaciones del hueso subcondral (Pridie)

Pridie describe en 1956 su técnica de perforación del hueso subcondral utilizando una aguja de Kirschner. Estas perforaciones se llevan a cabo bajo visión artroscópica de forma motorizada, una vez delimitada la lesión cartilaginosa. Algunos autores como Gudas⁷⁹, plantean esta técnica hasta que se establezcan las indicaciones definitivas de los tratamientos con injertos osteocondrales. Se describen dificultades para su realización ya que la incidencia de la aguja debe de ser perpendicular al plano de la lesión. Por ello, para alcanzar algunas zonas posteriores de los cóndilos femorales o de las superficies tibiales, algunas áreas de la cabeza femoral o de la superficie articular del astrágalo, se han tenido que diseñar instrumentales especiales. En superficies articulares como la de la rótula, por su extensión y por su difícil accesibilidad, es difícil utilizar esta técnica.

Los resultados obtenidos con la técnica de Pridie en animales⁶⁴, demuestran que el estímulo del hueso subcondral logra generar un tejido cartilaginoso en el que

predomina el colágeno tipo I durante las tres primeras semanas; a partir de la sexta a la octava semana, el colágeno tipo II adquiere progresivamente importancia y sigue aumentando hasta aproximadamente el año. Sin embargo, el colágeno tipo I se mantiene formando parte del tejido reparativo incluso más allá del año, por lo que éste prácticamente nunca se parece al cartílago articular normal.

La profundidad de las perforaciones es otro punto controvertido en la literatura. En este sentido, se demuestra que el estímulo de la generación de tejido cartilaginoso reparativo únicamente se consigue si las perforaciones son superficiales manteniendo intacta la cortical²¹⁰.

Aunque es una técnica que actualmente se sigue utilizando con frecuencia, las perforaciones de Pridie están siendo sustituidas cada vez con más por las microfracturas²⁴⁹.

b) Artroplastia de abrasión

Esta técnica es defendida desde 1979 por Johnson^{112,113}. Consiste en realizar perforaciones equidistantes de escasa profundidad en el hueso subcondral expuesto, con una fresa motorizada y bajo visión artroscópica (Figura 9). El sangrado resultante forma un coágulo en la zona, invadido progresivamente por células mesenquimales pluripotenciales y condrocitos. El tejido que se obtiene es también un FC con un porcentaje bajo en

colágeno de tipo II. Este autor plantea la técnica como paliativa en el tratamiento de las lesiones degenerativas del CA. Mediante *second look* artroscópico, confirma la presencia de fibrocartílago en la zona tratada durante los siguientes años a la cirugía. No obstante, plantea la necesidad de asociarla a procedimientos de ingeniería genética para conseguir una mejor calidad del tejido reparativo.

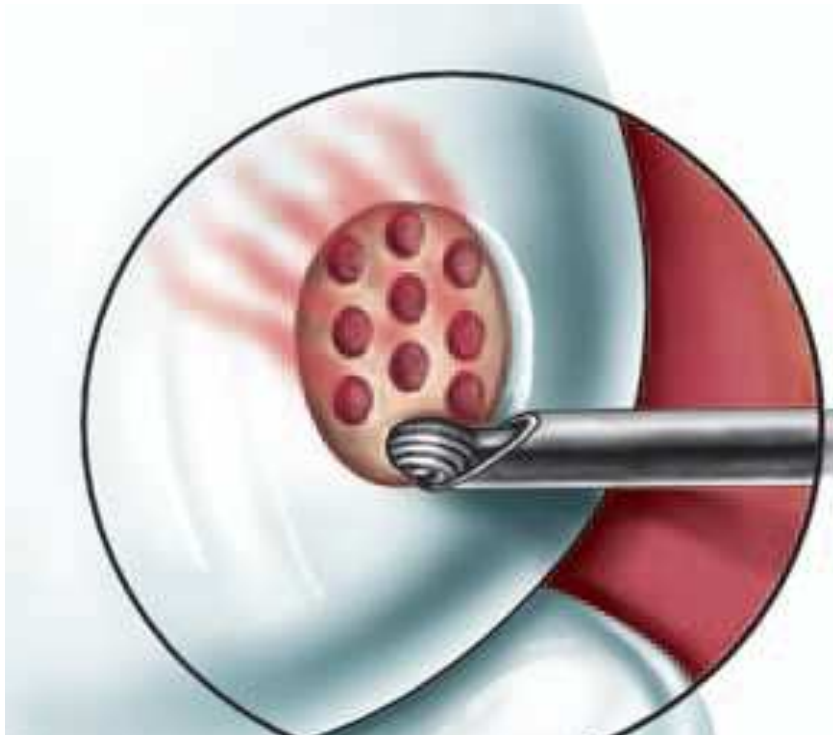


Figura 9: visión de los orificios equidistantes realizados con fresa motorizada y distribuidos en el lecho de la lesión condral durante la artroplastia de abrasión. Véase como se representa el sangrado desde el hueso subcondral (tomado de Djian P, Versier G).

Diferentes estudios demuestran que la artroplastia de abrasión es un tratamiento válido en las lesiones condrales degenerativas, desde el momento en que acelera el proceso de reparación del CA. Sin embargo, los resultados se mantienen en un plazo aproximado de cinco años tras la cirugía^{2,168}. Otros autores como Menche, demuestran que el tejido de reparación que se consigue con esta técnica tiene una vida media menor que el obtenido con las técnicas de perforación del hueso subcondral¹⁷⁰.

c) Microfracturas

Se trata de un procedimiento descrito por Steadman en 1994²⁴². Se inicia delimitando los bordes de la lesión condral mediante una cucharilla o fresa motorizada llegando en profundidad hasta el hueso subcondral. La lámina subcondral debe de ser perforada cada 2-3 mm consiguiendo una profundidad de 3-4 mm. Las perforaciones se realizan con un punzón para intentar evitar cualquier lesión térmica del hueso subcondral (Figura 10). Las tunelizaciones realizadas en este último, permiten la llegada de células madre mesenquimales, factores de crecimiento y otras proteínas desde la médula ósea, para iniciar la formación del tejido cicatricial²⁴³. El tratamiento rehabilitador (descarga de la extremidad con movilización activa y pasiva precoces) de la articulación es fundamental, ya que promueve la aparición de un entorno alrededor de la lesión,

que también favorece la diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales a células *cartilage-like*.

Los resultados obtenidos son en general buenos, con un mantenimiento de la mejoría clínica del 75% de los pacientes a los siete años de evolución. Desde el punto de vista histológico, las biopsias del tejido de reparación demuestran la presencia de una mezcla de FC y CH, con condrocitos viables.

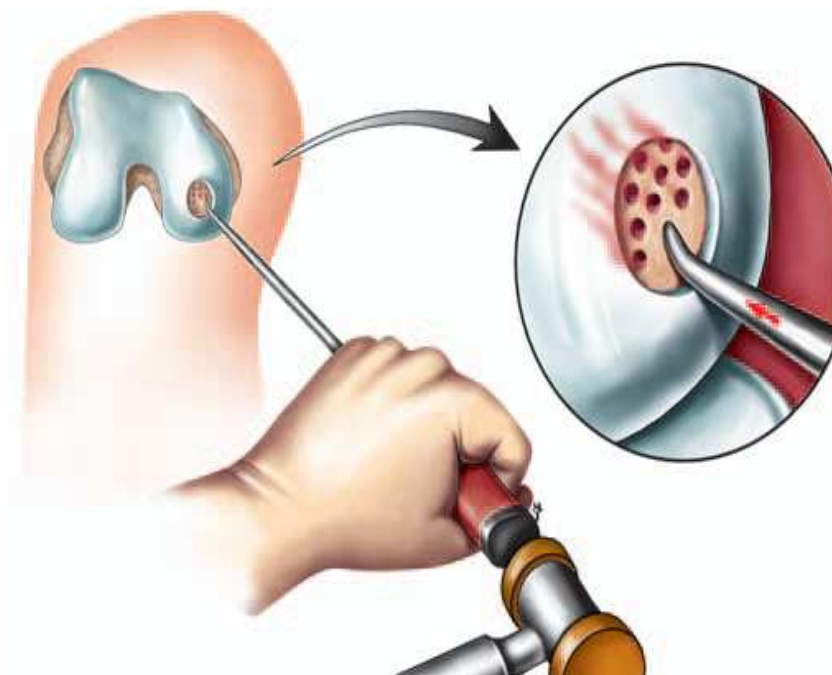


FIGURA 10: técnica de microfracturas mediante artroscopia. En la imagen de la derecha se aprecia el detalle de la misma con los orificios y el sangrado desde el fondo procedente del hueso subcondral (tomado de Djian P, Versier G).

Existen varios criterios conocidos que favorecen una reparación cartilaginosa satisfactoria: índice de masa corporal bajo, edad menor de treinta años en el momento de la cirugía y tiempo de evolución de los síntomas menor de veinte meses^{179,180}.

11.2. TÉCNICAS DE REPARACIÓN Y/O DE REGENERACIÓN CARTILAGINOSA

11.2.1. ALOINJERTOS OSTEOCONDRALES

La primera indicación de los aloinjertos osteocondrales (ALOs) se remonta a principios del siglo XX. La técnica consistía en la extracción de un fragmento osteocondral de cadáver y su colocación en el lecho sangrante de la lesión cartilaginosa del receptor. En la actualidad, los ALOs se utilizan habitualmente incluso en injertos más pequeños que antes o en forma de mosaicoplastia. Sin embargo, el hecho de que en numerosas ocasiones el ALO se congele tras su extracción del donante, hace que la viabilidad de los condrocitos sea menor. Williams demuestra efectividad tanto desde el punto de vista estructural como funcional en la reconstrucción de defectos condrales u osteocondrales, utilizando ALOs mantenidos en hipotermia (sin congelación) entre diecisiete y veintidós días tras su explante²⁸⁶. Por su parte, Kim considera que la muerte celular programada o apoptosis

está implicada en gran medida en la muerte de los condrocitos en relación con los ALOs¹²².

Se trata de un procedimiento con numerosas ventajas entre las que destacan la ausencia de morbilidad en la zona donante, los tiempos quirúrgicos menores, la disponibilidad de tejido en casos de lesiones cartilaginosas amplias y la ausencia de reacciones inmunológicas clínicamente significativas. Por el contrario, también presenta inconvenientes: riesgo de transmisión de enfermedades, necesidad de realizar una artrotomía en muchos casos, incremento de los costes y tiempo de incorporación del injerto a la zona receptora mayor que en los autoinjertos²⁸.

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 transplantes osteocondrales para reconstrucciones masivas³⁵.

11.2.2. AUTOINJERTOS OSTEOCONDRALES

Yamashita publica en 1985 el primer caso de injerto autólogo osteocondral en una rodilla humana²⁹⁴. Se trata de un caso de osteocondritis disecante en zona de carga del cóndilo femoral medial de una rodilla. El injerto se extrae del mismo cóndilo femoral en una zona exenta de cargas. A los seis meses de la intervención, el aspecto macroscópico del

cartílago es normal y no se detectan signos histológicos de degeneración.

Hangody a principios de los años noventa, desarrolla esta técnica utilizando el sistema de mosaicoplastia⁸⁷. Los buenos resultados clínicos obtenidos a largo plazo hacen que esta técnica sea una alternativa a considerar para el tratamiento de lesiones pequeñas y medianas, condrales u osteocondrales, en zonas de carga de las articulaciones⁸⁸.

El tamaño ideal del defecto a tratar oscila entre 1 y 4 cm², 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 límite superior para la realización de este procedimiento. Para conseguir un resultado óptimo es aconsejable corregir cualquier anomalía asociada en la articulación (alineación anómala de la extremidad, inestabilidades o lesiones de otras estructuras de la articulación tratada). 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 CH transplantado y la integración de éste con el cartílago circundante, así como la formación de hueso esponjoso con FC en la superficie articular de la zona donante²⁵¹.

Entre los inconvenientes que se le atribuyen a la utilización de este procedimiento se describe la morbilidad

sobre la zona donante, que no está relacionada ni con el número de cilindros obtenidos ni con el tamaño de éstos. Sin embargo, se considera que los buenos resultados clínicos dependen de un índice de masa corporal del paciente bajo¹⁹⁶.

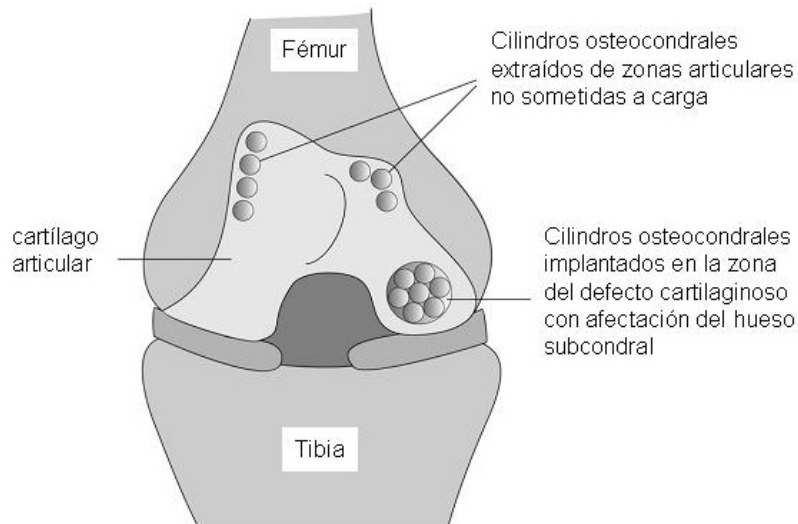


FIGURA 11: fases del autoinjerto osteocondral mediante mosaicoplastia. El procedimiento suele realizarse por vía artroscópica, cuando el tamaño del defecto condral es pequeño y afecta a zonas articulares accesibles. Cuando la lesión es amplia y/o asienta en una zona de la articulación de difícil acceso artroscópico, la mosaicoplastia se realiza mediante artrotomía (modificado de Redman S.N. et al.).

En la realización de esta técnica se diferencian varias fases. Inicialmente, se desbrida la lesión cartilaginosa para delimitar sus bordes. A continuación, se mide el área de defecto condral a rellenar. Se extraen los injertos

osteocondrales necesarios de una zona de la articulación que no soporte carga, decidiendo el diámetro de cada uno de ellos. Preparamos el lecho donde introduciremos cada cilindro osteocondral. El diámetro del lecho cilíndrico creado suele ser un milímetro menor respecto al del injerto extraído, para asegurar la estabilidad del implante una vez colocado. En las zonas entre cada uno de los cilindros, suelen realizarse microfracturas con el objetivo de conseguir la formación de un FC entre las superficies del CH de cada uno de los implantes (Figura 11).

11.2.3. INJERTOS DE PERIOSTIO

El injerto perióstico es una técnica conocida desde 1940 (Figura 12). El periostio reúne las tres características esenciales requeridas en la ingeniería tisular (IT) del CA: es una fuente de células, actúa como un *scaffold* reteniendo o liberando a estas células y origina numerosos factores de crecimiento locales que regulan a los condrocitos para la condrogénesis. Entre estos factores de crecimiento destacan los siguientes: beta-1, *insuline-like* 1, factor 5 de diferenciación, proteína morfogenética ósea (BMP) 2, integrinas, y los receptores para dichas moléculas¹⁹⁰.

Estas posibilidades reparativas del periostio quedan contrarrestadas por varios inconvenientes: la posibilidad de calcificación del cartílago a medio plazo a consecuencia probablemente, del colágeno tipo X; la rápida disminución

de la densidad de células progenitoras en la zona con la edad⁴⁶; el potencial artrógeno (disminución del número de células y de los PTGs del cartílago) de las suturas aplicadas para unir el periostio al CA como demuestra Hunziker, que propone como alternativa los adhesivos biológicos¹⁰⁰. Estas complicaciones inherentes a la técnica han hecho que algunos autores como Minas la hayan abandonado¹⁷⁷.

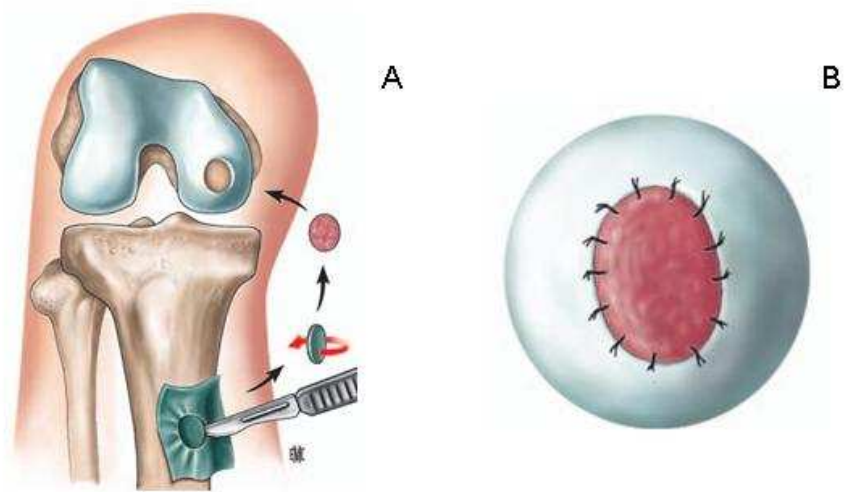


FIGURA 12: técnica quirúrgica del injerto de periostio. Una vez delimitada la lesión cartilaginosa, extraemos periostio de igual forma y tamaño de una zona próxima a la articulación (en el caso de las lesiones de la rodilla, el periostio suele tomarse de la cara anterior de la tibia) (A). Finalmente se sutura el tejido obtenido a los bordes de la lesión condral (B) (tomado de Djian P, Versier G).

11.2.4. INJERTOS DE PERICONDRIO

Homminga introduce en 1990 el injerto de pericondrio en la práctica clínica. En 1989, utiliza esta técnica en un estudio experimental en conejos. Crea una lesión condral en la rodilla del animal que cubre con pericondrio costal y mantiene con adhesivo de fibrina. Obtiene CH macroscópica e histológicamente, en la mayoría de los conejos⁹⁴.

Al igual que en el caso de los injertos periósticos, en los de pericondrio también existe el riesgo de osificación endocondral que puede desarrollarse desde el primer mes de postoperatorio, además de las posibilidades de delaminación del cartílago, de arrancamiento del implante o de crecimiento de un tejido conjuntivo en lugar de CH.

Desde el punto de vista clínico, Bruns obtiene resultados satisfactorios a largo plazo e histológicamente confirma en todos los casos biopsiados cartílago *hyaline-like*. Para mejorar estos datos, propone una corrección sistemática de las alteraciones articulares asociadas (inestabilidades, desaxaciones,...). 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 celular²². Se trataría de un fenómeno mecánico inducido desde los bordes cartilaginosos de la lesión, que contribuye escasamente a la

reducción del tamaño de los grandes defectos osteocondrales.

11.2.5. CULTIVO DE CONDROCITOS

El implante de condrocitos autólogos (ACI) se ha desarrollado desde 1987. Brittberg en 1994 publica los primeros resultados de esta técnica (primera generación de ACI) en veintitrés pacientes, con datos satisfactorios tanto clínica como histológicamente (obtiene CH)¹⁸.

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 III, y PTGs. 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 (Figura 13).

El TGF- β 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 cartilaginoso¹⁶¹. Estas mismas células controlarían la composición y estructura de la MEC gracias al mantenimiento del balance entre las actividades anabólicas y catabólicas²⁰.

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 CH en el defecto osteocondral¹⁷⁶.

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 CA 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 sano¹⁰⁰.

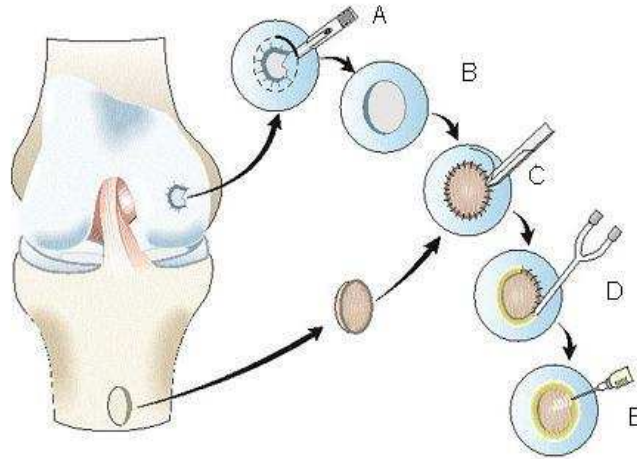
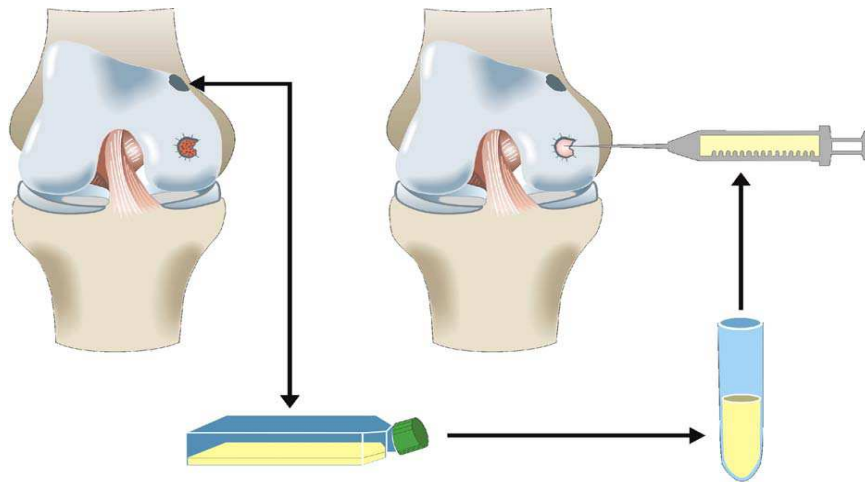


FIGURA 13: técnica de ACI. Esquema general de la técnica (imagen superior). Detalle de las fases (imagen inferior): A) Desbridamiento del defecto cartilaginoso; B) Preparación del defecto cartilaginoso; C) Extracción y sutura del fragmento de periostio a los bordes de la lesión condral; D) Sellado de los bordes con adhesivo de fibrina; E) Implante de los condrocitos que quedan alojados en el área del defecto (modificado de Marlovits S et al.).

Para evitar estas contrariedades, se plantea una segunda generación de ACI, que utiliza una membrana de colágeno bicapa en lugar del fragmento de periostio para sellar la lesión condral (Figura 14). Respecto a la primera generación de ACI, 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 CA intacto, lo que supone un inconveniente, como hemos mencionado anteriormente.

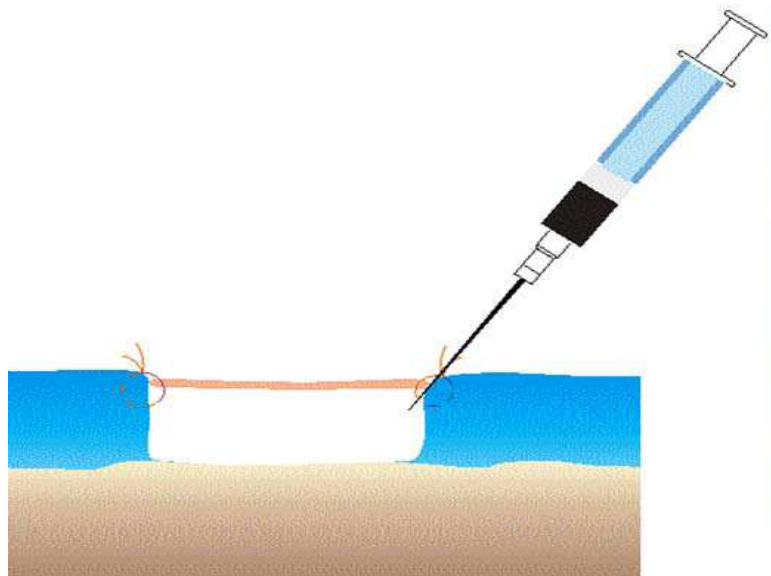


Figura 14: técnica de la segunda generación de ACI. La introducción de los condrocitos en el lecho de la lesión se sigue realizando una vez colocado el tejido de recubrimiento del defecto condral (tomado de Marlovits S et al.).

Los sucesivos avances tecnológicos han llevado a la tercera generación de ACI, en la que se utilizan biomateriales sembrados de condrocitos como transportadores y *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 cartilaginosa 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 (Figura 15).



FIGURA 15: ACI de tercera generación. Nótese la ausencia de sutura del material introducido en el interior de la lesión condral. El tejido implantado rellena la totalidad del defecto cartilaginosa (tomado de Marlovits S et al.).

Tras los primeros resultados publicados por Brittberg y con la experiencia de más de veinte mil casos en todo el mundo²⁷², el ACI se considera una opción terapéutica de primera elección en pacientes con elevados requerimientos funcionales y con lesiones de gran tamaño (mayores de 2 cm²), y en los casos de fracasos de las técnicas de estímulo subcondral en lesiones de cualquier tamaño¹⁷⁸. En la rodilla, los mejores resultados se logran en las lesiones post-traumáticas y en la osteocondritis disecante, incluso en el deportista joven¹⁷³. En cualquier caso, el éxito de este procedimiento, al igual que el de los anteriormente expuestos, pasa por la corrección de las alteraciones articulares o de los ejes de carga, asociadas a la lesión cartilaginosa⁶⁸.

11.2.6. 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).

Algunas sustancias naturales son adecuadas como transportadoras celulares en el andamiaje para la ingeniería tisular del cartílago. Entre éstas, destacan la fibrina, la agarosa, el alginato, el colágeno, el quitosano o el ácido hialurónico^{107,36,41}. 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 tamaño⁴¹.

La fibrina es el componente más abundante de los coágulos sanguíneos. Puede utilizarse como adherente para otros cartílagos sintetizados mediante ingeniería tisular, en el relleno de defectos condrales, como *scaffold* propiamente dicho o como factor de crecimiento. Sus aplicaciones son limitadas teniendo en cuenta sus menores propiedades mecánicas, la posibilidad de provocar respuestas inmunes o inflamatorias y las dificultades para atraer células

huésped^{199,1}. La agarosa y el alginato poseen mejores características de resistencia mecánica que la fibrina. Sin embargo, no son lo suficientemente resistentes para absorber las fuerzas de fricción durante la movilidad articular en los animales de experimentación grandes y el organismo no las llega a reabsorber satisfactoriamente²¹⁵.

Algunos componentes propios del CA como el colágeno, son los más biocompatibles y los menos inmunogénicos. Las esponjas de colágeno se han utilizado en numerosos estudios junto con condrocitos y células madre mesenquimales para formar cartílago tanto *in vitro* como *in vivo*^{257,65}. Sin embargo, el colágeno únicamente puede extraerse de organismos vivos, lo que encarece su utilización y conlleva un potencial riesgo de transmisión de enfermedades por priones, sobre todo en los colágenos de origen bovino. Además, los condrocitos humanos cultivados en contacto con tantas proteínas de origen animal, pueden expresar moléculas inductoras de una respuesta inmune, poniendo así en peligro la viabilidad del tejido implantado²⁹³. El AH es un componente del líquido sinovial de las articulaciones y de la MEC del cartílago, que también se ha utilizado para la ingeniería tisular del cartílago⁷⁶. Otras sustancias ajenas a los tejidos articulares como el polisacárido quitosano, desencadenan una respuesta inflamatoria teóricamente escasa. Se ha logrado sintetizar

en forma de líquido inyectable que se transforma en gel a temperatura corporal³³.

Los *scaffolds* poliméricos sintéticos poseen las ventajas de la fiabilidad del origen de los polímeros y de la reproducibilidad de su síntesis mediante IT. Los polímeros más utilizados son los poli- α -hidroxi ésteres, especialmente el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA). Están aprobados para su uso clínico y presentan mejores características mecánicas que las sustancias naturales, lo que los hace mucho más fáciles para colocar en el defecto cartilaginoso y más resistentes a las fuerzas de fricción durante los movimientos articulares. Los copolímeros de estas dos sustancias consiguen disminuir la tasa de degradación del implante. Este hecho es importante, ya que el tiempo de permanencia del polímero implantado debe de ser suficiente para conseguir el objetivo del soporte tridimensional y no ser excesivo para no alterar la regeneración tisular¹⁴⁸.

Además del contenido del *scaffold*, el diseño de la arquitectura del mismo puede condicionar su colonización celular⁸⁹. Teniendo en cuenta que la MEC del CA normal se distribuye de forma poco homogénea, con los condrocitos cerca de la unión osteocondral y las fibras de colágeno a lo largo de la superficie articular, la arquitectura del andamiaje deberá ser como la del tejido cartilaginoso para favorecer el crecimiento de los condrocitos presembrados⁴¹.

El éxito clínico de la mosaicoplastia con injertos osteocondrales ha hecho que se plantee la idea de generar compuestos osteocondrales bifásicos (hueso-cartílago) mediante IT 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 cartílago huésped y la fracción cartilaginosa del *scaffold*^{228,109}.

Los condrocitos u otras células de inducción condrogénica presembrados en las matrices biosintéticas, deben ser capaces de formar MEC para constituir el neocartílago. Para facilitar la viabilidad celular de los condrocitos en la estructura sintetizada, se han diseñado biorreactores que aseguran factores físicos, químicos y biológicos en el entorno de los condrocitos²⁷⁹. Entre estos factores destacan la fricción a consecuencia de la movilidad

en la superficie articular, el estrés en compresión, la presión de oxígeno, la fuerza hidrostática y, por último, la estimulación mecánica dinámica^{97,120,280}.

Las células madre mesenquimales (CMMs) de la médula ósea pueden ejercer algunas de las funciones de las células cartilaginosas en los casos de condrocitos autólogos insuficientes. Para ello, se requieren una serie de factores que favorezcan que las primeras adquieran una actividad condrogénica. Para promover esta condrogénesis se añaden diferentes citoquinas y factores de crecimiento a los medios de cultivo celulares. Entre estas sustancias destacan varias isoformas de TGF- β , la activina, la proteína osteogénica 1, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) 2, el IGF-1, la prolactina, la IL 1- β , el Cyr-61, la hormona del crecimiento, el factor de crecimiento y diferenciación (GDF) 5, la BMP-2 y la BMP-4¹²⁰. Otros factores químicos no proteicos como las prostaglandinas D2 y F2 α ¹⁰⁶; las prostaglandinas E1 y E2¹³¹; la hormona tiroidea¹¹; la 1.25 hidroxí-vitamina D²⁵⁹; el ácido ascórbico^{85,3}; la dexametasona²¹¹; el etanol^{134,93}; la estaurosporina¹³³; el dibutilil cAMP^{218,219}; la concavalina A²⁸⁸ y, por último, el vanadato¹¹⁸ han demostrado inducir la condrogénesis. Estos compuestos químicos son menos lábiles y tiene una vida media mayor que los factores proteicos, favoreciendo así los cultivos *in vitro* durante varias semanas.

11.2.7. PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA

Las BMPs son factores de crecimiento multifuncionales pertenecientes a la superfamilia de los TGF- β . Desde su descubrimiento por Urist en 1965²⁶², numerosas investigaciones han demostrado que se trata de moléculas que inducen al genoma a iniciar la formación de un área morfogénica⁷⁴. Las BMPs activan la osificación endocondral y la condrogénesis; tienen además la posibilidad de estimular la diferenciación de las células mesenquimales en células de extirpe osteoblástico. Respecto a su acción específica sobre los condrocitos, estas proteínas favorecen su maduración y la síntesis de colágeno tipo II y tipo X³¹. El efecto de las BMPs sobre la condrogénesis parece estar mediado por los genes Sox 9 y Runx 2. La interacción entre ambos determina si la diferenciación de los condrocitos produce hacia la formación del CA o, por el contrario, hacia una maduración hipertrófica previa a la osificación endocondral⁶⁹. Sin embargo, las señales que marcan la morfogénesis de las articulaciones durante el desarrollo embrionario, no solamente dependen de las BMPs sino también de las proteínas morfogénicas derivadas del cartílago (CDMPs).

Una vez formado el CA, su homeostasis requiere un balance entre las sustancias anabólicas como las BMPs y las CDMPs y las citoquinas catabólicas como la IL-1, la IL-17 y el TNF α ²¹⁶.

Las BMPs, a su vez, se dividen en tres subfamilias: BMP-2 (o BMP-2a) y BMP-4 (o BMP-2b); BMP-3 y BMP-3b (o GDF-10); BMPs 5, 6, 7 (o proteína osteogénica 1) y 8 (o proteína osteogénica 2). Dentro de las CDMPs, se distinguen tres tipos: CDMP-1 o GDF-5, CDMP-2 o GDF-6 y CDMP-3 o GDF-7. Entre todas estas proteínas, las que se han descrito como condrogénicas son la GDF-5, la GDF-6, la BMP-2 y la BMP-4²¹⁶. Las CDMPs 1 y 2 estimulan la síntesis de agreganos del cartílago. La BMP-2 favorece la expresión condrogénica y en particular la del colágeno tipo IIb^{169,62}. La BMP-4 contribuye al proceso de reparación de las lesiones cartilaginosas, estimulando la síntesis de colágeno tipo II y agreganos¹⁷⁴. Algunos autores como Chubinskaya y Yamane^{42,292}, atribuyen a la BMP-7 la capacidad de estimular a los condrocitos para la síntesis de colágeno tipo II, con el consiguiente potencial reparador de las lesiones condrales.

Estas propiedades de las distintas proteínas morfogenéticas se han aplicado a la ingeniería tisular del cartílago, sintetizándose por ejemplo *scaffolds* bifásicos con BMP-2, que han demostrado potencial condrogénico en ratas²⁹⁰.

11.2.8. TERAPIA GÉNICA, CÉLULAS MADRE

Evans propone en 1995 la aplicación de la transferencia génica (TG) al CA para el tratamiento de los

problemas degenerativos articulares⁵². La terapia génica es una técnica basada en la alteración de la información de los genes celulares para que la célula afectada sintetice la sustancia deseada¹⁶³ (Figura 16).

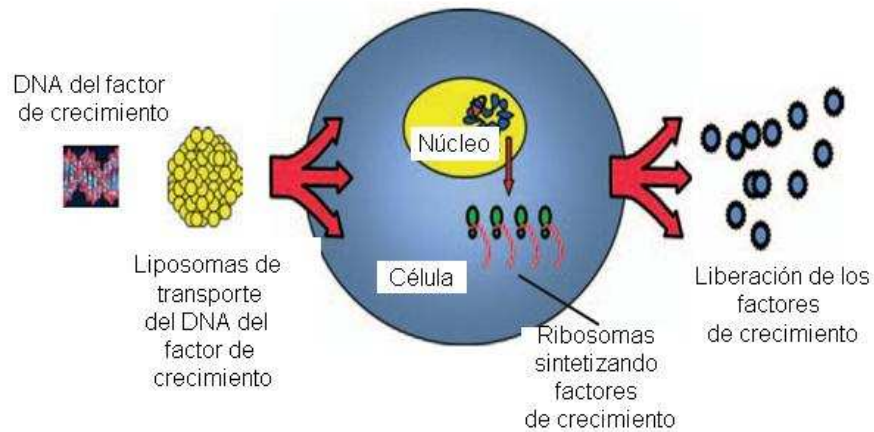


FIGURA 16: esquema del mecanismo de transferencia génica para la síntesis de factores de crecimiento (modificado de Martinek V).

La reparación de las lesiones del CA puede conseguirse utilizando moléculas reguladoras de las células que aumenten sus actividades reparativas, que disminuyan sus actividades de degradación o ambas posibilidades a la vez. Algunas de estas moléculas son el IGF-1; el FGF-2; las BMPs 2, 4 y 7; y el antagonista para el receptor de la IL-1. Se trata pues de transferir los genes que codifican estas moléculas al CA²⁵⁸. Así por ejemplo, la administración combinada de un factor anabólico como el IGF-1 con un

inhibidor de la acción inflamatoria de las citoquinas (por ejemplo la IL-1Ra) puede conseguir controlar la degradación de la MEC a la vez que restaura parcialmente la lesión de ésta^{90,188}.

Para la transferencia del material genético al interior de los condrocitos pueden utilizarse vectores virales o vectores no virales. Los vectores virales como los retrovirus, los adenovirus, los virus adeno asociados y los herpes virus, se caracterizan por una mayor eficiencia en la transferencia génica²²¹. Los sistemas de TG no virales, como los liposomas, el DNA puro o los ligandos de DNA, son en general más sencillos de sintetizar y tienen una toxicidad e inmunogenicidad menores. Sin embargo, su eficacia es menor por la baja tasa de infección celular que con su utilización se consigue⁵².

La TG en el cartílago y en el hueso subcondral es posible mediante un procedimiento tanto *ex vivo* como *in vivo*. Los vectores pueden infectarse directamente en el tejido (*in vivo*) o pueden extraerse las células cartilaginosas lesionadas, manipularlas genéticamente *in vitro* y reimplantarlas en el lugar de la lesión (*ex vivo*). Mientras que el método directo es técnicamente menos exigente, la TG indirecta es más segura, ya que la manipulación genética se realiza en condiciones controladas fuera del organismo.

Diversos estudios *in vitro* demuestran que mediante este método, los condrocitos son capaces de aumentar la

biosíntesis de la MEC y de mantener el fenotipo condrocítico, especialmente la síntesis de colágeno tipo II^{6,183,154}. En los estudios *in vivo* se depositan los genes en el interior de la articulación mediante diferentes tipos de células o de vectores y de manera directa (inyección intra-articular) o indirecta (mediante matrices o *scaffolds*). Tomita inyecta genes del antígeno SVT (*SV 40 large T antigen*) en rodillas de ratas y demuestra mediante inmunohistoquímica la expresión de éstos en los condrocitos, sin cambios patológicos en el cartílago²⁵⁶. Mason utiliza vectores retrovirales para introducir genes de la BMP-7 mediante soportes tridimensionales en rodillas de conejos, obteniendo regeneración completa del CA¹⁶⁶.

Sin embargo, la terapia génica no está exenta de riesgos. Mientras que es mayor el beneficio de su utilización en el tratamiento de las distrofias musculares malignas (entre otras enfermedades) respecto a los riesgos que el mismo entraña, algunos autores consideran que en el caso del tratamiento de las lesiones del CA no son aceptables estos riesgos (mutagénesis, malignización, toxicidad o alteración de la regulación del crecimiento celular) relacionados con la sobreexpresión de los factores de crecimiento celulares³⁴.

A pesar de los avances obtenidos en la reparación de las lesiones del CA mediante las técnicas de transferencia de genes, los estudios actuales sobre la materia pretenden

lograr sintetizar CA cuya estructura sea igual a la del CH y que éste tenga una vida media alta. Para ello, se requieren sistemas de vectores más sofisticados que controlen la expresión de los genes incorporados a las células condrales²⁴⁶. En este sentido, se han descrito diferentes elementos específicos reguladores del CA como por ejemplo, los inductores de la proteína derivada del cartílago sensible al ácido retinoico (CD-RAP)²⁸⁹, del procolágeno tipo II $\alpha 1$ (COL2A1)^{139,300} o del gen de los agrecanos^{263,264}.

Asimismo, la utilización de células madre mesenquimales constituye una alternativa para el tratamiento de las lesiones del CA. Se trata de células pluripotenciales con capacidad para reparar tejidos mesenquimales como el hueso, los ligamentos, la grasa, el músculo y el cartílago²⁴⁵. Estas células pueden obtenerse de diferentes tejidos: de la médula ósea²⁰⁷, del hueso trabecular²²⁵, del tejido adiposo¹⁸¹ o del periostio¹⁹⁰.

Para aprovechar el potencial de las células madre en la ingeniería tisular del CA, se ha analizado el entorno ideal para estimular la condrogénesis. Para ello, se han utilizado factores de crecimiento como el TGF- $\beta 1$, el TGF- $\beta 2$, el TGF- $\beta 3$ y la BMP-2²⁴⁶. De éste análisis surge la aplicación de las CMMs para el tratamiento de defectos condrales de espesor completo en humanos. Por ejemplo, Kuroda utiliza *scaffolds* de colágeno en los que aplica células madre procedentes de la médula ósea autóloga de la cresta iliaca.

Aplicados en el lecho de la lesión condral de espesor completo, obtiene histológicamente FC¹³⁶. Otros autores como Wakitani, consiguen los mismos resultados con este método en lesiones cartilaginosas del CA de la rótula²⁷³. El hecho de que en los primeros casos en los que se utiliza esta técnica el tejido resultante sea FC, hace que sea necesario recurrir a otros factores que junto con las CMMs, logren obtener CH estable sin osificación, fibrinogénesis o inflamación^{99,261}. Con esta idea y para intentar conseguir un tejido cartilaginoso reparativo de características, estabilidad y durabilidad suficientes, diferentes estudios utilizan la TG aplicada a las CMMs^{83,135,194,58,167,247}.

En cualquier caso, en la actualidad, tanto en los estudios *in vitro* como *in vivo*, no se ha logrado obtener CA de reparación de características tanto histológicas como biomecánicas comparables al CH de la articulación. Los diferentes obstáculos existentes para lograr dicho objetivo son principalmente la degradación de MEC, la integración o la diferenciación insuficientes de los condrocitos, la inestabilidad de las células o tejidos transferidos y la relativa eficacia de la transferencia génica de los diferentes factores condrogénicos, anti-inflamatorios y anti-oxidativos. Como la mayoría de estos factores tienen una vida media corta, autores como Steinert plantean la posibilidad de administrar de manera repetida estas sustancias en la articulación o de lograr vectores de TG más sofisticados, que aseguren la

reparación integral de las lesiones cartilaginosas articulares^{245,246}.

12.- HIPÓTESIS

El cartílago articular no posee mecanismos propios de reparación cuando resulta lesionado. Las alternativas de tratamiento utilizadas hasta ahora no han permitido obtener un tejido cartilaginoso de reparación de características iguales a las del cartílago intacto.

En el presente estudio planteamos una experiencia basada en la siguiente hipótesis: tras producir una lesión en la superficie del complejo articular osteocondral en un modelo animal, las técnicas de ingeniería tisular nos van a permitir obtener un neocartílago adecuado. Concretamente utilizando andamiajes porosos tridimensionales bioestables basados en acrilato de etilo, poliacrilato de etilo, ácido metacrílico y acrilato de hidroxietilo, éstos serán capaces de inducir una respuesta biológica favorable que permita alcanzar un complejo articular osteocondral satisfactorio desde el punto de vista estructural y funcional.

Objetivos

El cartílago articular se caracteriza por ser un tejido avascular. Las vías de las que dispone para su alimentación son la absorción de nutrientes desde el líquido sinovial y el aporte celular a sus capas más profundas desde la vascularización del hueso subcondral. Por otra parte, es conocida la escasa capacidad divisional de sus células.

En consecuencia, las lesiones cartilaginosas en sus diferentes grados, tienen una escasa capacidad intrínseca de regeneración. Se han descrito en la literatura numerosas técnicas para la reparación de los defectos que en este cartílago se producen, tanto de tipo post-traumático como de tipo degenerativo. Aunque cualquiera de ellos conlleva ventajas e inconvenientes, la ingeniería tisular con biomateriales en el tratamiento de las lesiones cartilaginosas parece aumentar las primeras y minimizar los segundos.

Los objetivos que nos hemos planteado en el presente trabajo son:

1. Comprobar que la ingeniería tisular con soportes tridimensionales sintetizados con los biomateriales testados en este estudio, es una técnica apropiada para el tratamiento de las lesiones inducidas en la superficie del complejo osteocondral.
2. Analizar la respuesta biológica de los biomateriales más rígidos y/o hidrófobos.

3. Estudiar la respuesta biológica de los biomateriales más elásticos y/o hidrófilos.
4. Identificar entre los biomateriales utilizados, el que genera un complejo osteocartilaginoso de características estructurales más parecidas al patrón histológico normal.
5. Conocer la influencia de la presenciencia de condrocitos en los andamiajes de los biomateriales empleados, sobre el tipo y calidad de tejido regenerativo obtenido a los tres meses de su implante.
6. Valorar la naturaleza del tejido resultante de la utilización de matrices sin siembra de condrocitos previa.
7. Comprobar la estabilidad de los *scaffolds* utilizados, dentro del defecto creado.

Material y método

1. MATERIAL

1.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de este trabajo hemos utilizado conejos. Los animales se han obtenido de la granja de mejora genética San Bernardo de Tulebra. Hemos escogido este animal de experimentación, por los siguientes motivos:

- el crecimiento proporcional al del hombre
- la similitud de la anatomía de la rodilla con la humana
- el coste del animal respecto a otros animales de experimentación
- la facilidad para su estabulación, por el espacio relativamente reducido requerido y por los menores costes para su mantenimiento
- el número elevado de trabajos publicados sobre regeneración del cartílago articular en este animal, lo que nos permite establecer paralelismos y comparaciones con nuestro estudio.

El protocolo de estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Valencia según las leyes 86/609/EEC y 214/1997, y el decreto 164/1998 de la Generalitat Valenciana.

Cada biomaterial o asociación de biomateriales valorados se ha testado en cuatro conejos.

De estos cuatro animales, dos corresponden a muestras sin presiembra de condrocitos y dos lo hacen a

muestras con presiembra de los mismos. El número total de animales intervenidos es de dieciocho, pero dos han sido descartados por *exitus* precoz (a los quince días, por patología digestiva) que los invalida para el estudio de la regeneración cartilaginosa; sin embargo se ha analizado igualmente la rodilla de dichos animales comprobando la correcta posición del *scaffold* en el área lesional labrada en el cartílago articular.

1.1.1. RAZA

Una vez elegido el animal de experimentación, hemos decidido recurrir a la raza Neozelandesa por su facilidad de obtención, su manejabilidad durante las diferentes fases del estudio experimental y su tamaño.

Aunque el pelaje más típico de esta raza de conejo es el blanco, también los hay de color rojizo o negro.

El conejo de raza New Zealand escogido para nuestro estudio, se caracteriza por su pelaje suave blanco y sus ojos rojizos (Figura 17). La cabeza es redondeada y el cuello corto. El peso que alcanza un conejo adulto oscila entre los 4000 y los 5000 g, con un tamaño medio de 60 cm de largo. Su producción es básicamente cárnica, pero sus características lo hacen ideal para la cirugía experimental del aparato locomotor. Se trata de una raza dócil a la vez que fuerte, lo cual nos facilita su manejo tanto en el pre como en el postoperatorio.



Figura 17: conejo de raza New Zealand de tres meses de edad.

1.1.2. EDAD, PESO Y SEXO

Hemos escogido conejos machos de doce semanas de edad y 1800 g de peso. El volumen de los animales nos permite estabularlos en jaulas suficientemente amplias para su crecimiento en condiciones, hasta el sacrificio. Por otra parte, el tamaño relativamente reducido de los conejos a esta edad, favorece su manejo tanto en la inducción anestésica como durante la cirugía. Sin embargo, las proporciones de la rodilla del animal son suficientes para poder realizar la cirugía prevista sin riesgos considerables (fracturas, imposibilidad para crear el defecto condral por falta de espacio en el surco intercondíleo femoral,...).

1.2. QUIRÓFANO

Todas las cirugías se han llevado a cabo en el quirófano de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

1.3. INSTRUMENTAL QUIRÚRGICO

El instrumental quirúrgico elegido para realizar las intervenciones es el de cirugía de la mano. Consideramos que el tamaño de los componentes de este instrumental, es proporcional al tamaño del campo quirúrgico sobre el que vamos a trabajar. Hemos utilizado, tal como se muestra (parcialmente) en las figuras 18 y 19, los siguientes elementos:

- dos hojas de bisturí del número 11, una para la incisión cutánea y otra para el resto de la disección hasta el plano articular
- dos pinzas de disección de *Adson*, con y sin dientes
- dos pinzas de *Allis*, para tracción de los tejidos blandos
- una tijera de disección de *Metzemaum recta*
- dos separadores de *Seen-Green* pequeños
- dos pinzas mosquito, una recta y otra curva para el clampaje de los vasos
- un separador automático de *Alm* para facilitar la visión de la superficie articular

- un instrumento de toma de biopsia de dermatología o *punch* de 3 mm de diámetro, para la creación del defecto en la superficie articular
- y un porta agujas de *Mayo-Hegar* para la sutura de la artrotomía y de la incisión cutánea.

Además, tras el sacrificio de los animales, se utiliza una sierra de marquetería para la amputación de la rodilla y un instrumental de mosaicoplastia (trocar) de 10 mm de diámetro (Arthrex) para la obtención más sencilla del cilindro osteocartilaginoso (en cuyo centro se halla el implante), que procesamos para su posterior estudio histológico.

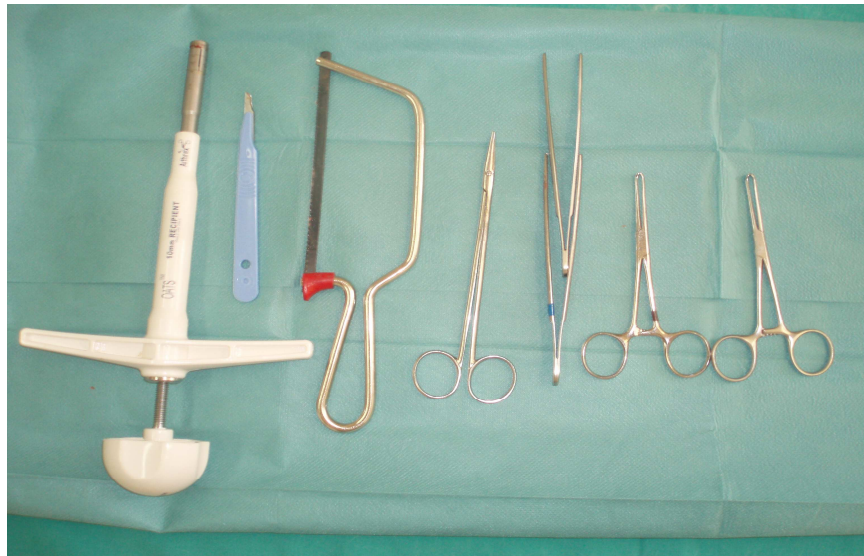


Figura 18: material utilizado para la cirugía, la posterior amputación de la extremidad y la obtención del cilindro osteocartilaginoso, mediante el instrumento que aparece a la izquierda de la imagen.

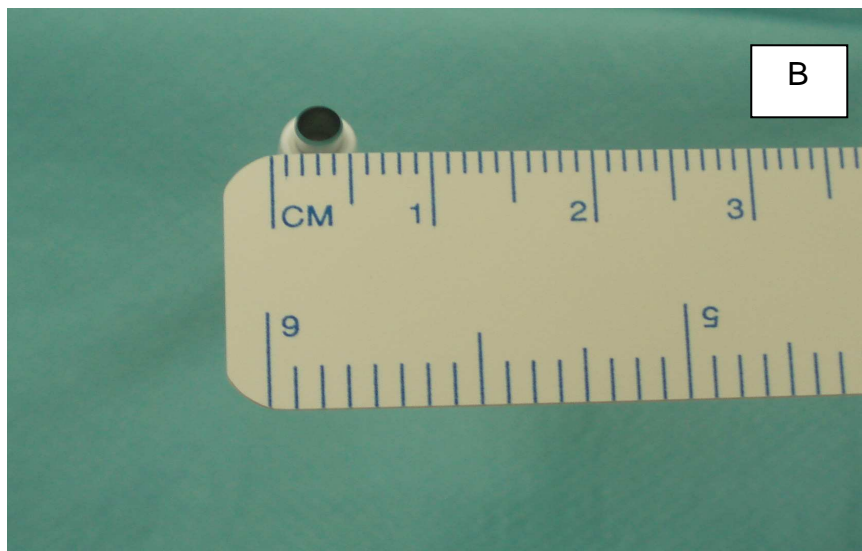


Figura 19: detalle del *punch* utilizado para la creación del defecto en la superficie articular de la rodilla del conejo (A). El diámetro del instrumento en su extremo de corte es de 3 mm, según se aprecia en la figura B.

1.4. OBTENCIÓN DE LOS CONDROCITOS

Como paso previo al estudio *in vivo* consistente en el implante de los *scaffolds* (también denominados discos) diseñados en las lesiones articulares creadas en los conejos, sacrificamos un animal del que obtenemos cartílago de la rodilla, para llevar a cabo un primer cultivo de condrocitos.

Los diferentes fragmentos de cartílago extirpados, se lavan con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Life Technologies) suplementado [100 U de penicilina, 100 µg de estreptomicina (Biological Industries) y 0,4 % de fungizona (Gibco)]. Los enzimas de digestión del cartílago se preparan con este medio. Para el aislamiento de los condrocitos, incubamos los fragmentos de cartílago con 0,5 mg/ml de hialuronidasa en un baño de agitación con agua a 37°C durante treinta minutos. A continuación se retira la hialuronidasa y se añade 1 mg/ml de pronasa (Merck, VWR International SL). Tras sesenta minutos de lavado en un baño de agitación a 37°C, se lavan las piezas de cartílago con DMEM suplementado. Una vez extraídas del medio, continuamos la digestión enzimática de las piezas añadiendo 0,5 mg/ml de colagenasa-IA (Sigma-Aldrich) en un baño de agitación con agua a 37°C durante una noche. La suspensión celular resultante se filtra con un filtro de nylon de poro de 70µm de tamaño (BD Biosciencias) para eliminar los detritus celulares. Centrifugamos las células y

las lavamos con DMEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (Invitrogen SA). Finalmente, las células se depositan en frascos de cultivo tisular para el cultivo inmediato de los condrocitos (Figura 20) o su conservación en nitrógeno líquido con DMEM que contiene un 20% de SBF y un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) hasta su utilización.

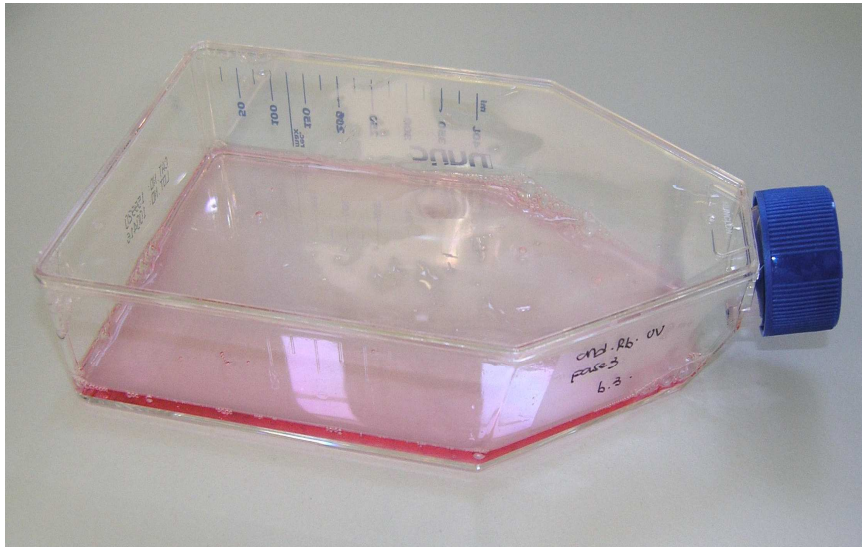


Figura 20: frasco utilizado para el cultivo de condrocitos.

1.5. SÍNTESIS DE LOS SCAFFOLDS

La elección de los biomateriales y la síntesis a partir de ellos de soportes macroporosos, se ha llevado a cabo junto con el grupo de investigación del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad Politécnica de Valencia.

Los *scaffolds* se obtienen a partir de redes poliméricas de poliacrilato de etilo (PEA), o redes de copolímeros de acrilato de etilo y acrilato de hidroxietilo (EA-co-HEA), o copolímeros de acrilato de etilo y ácido metacrílico (EA-co-MAAc). Como monómeros, utilizamos el acrilato de etilo (EA) (Aldrich, 99%) y el acrilato de hidroxietilo (HEA) (Aldrich, 96%). El dimetacrilato de trietilenglicol (TrEGDMA) (Aldrich, 98% puro) se utiliza como entrecruzador o *cross-linker* (crea enlaces permanentes entre las cadenas de polímero para formar la red tridimensional) y se emplea benzoína (Scharlau) como iniciador fotosensible de la polimerización.

Estas matrices se han preparado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular utilizando una plantilla de la estructura porosa (el negativo de la matriz) hecha a partir de microesferas de polimetacrilato de metilo, PMMA (Colacryl DP 300, Lucite International). El diámetro medio de las microesferas es de noventa micras. Se sintetizan las plantillas bajo presión a temperaturas por encima de la temperatura de transición vítrea del PMMA, según el procedimiento descrito por Brígido¹⁷. Introducimos las microesferas en un molde formado por dos placas de cristal separadas por un anillo de goma. El molde se coloca en una prensa caliente a 170°C, temperatura a la que el comportamiento del PMMA es el de una goma (deformable); se aplica una presión suficiente para deformarlas y

adherirlas unas a otras, creando una placa consistente de aproximadamente 2 mm de espesor. Los puntos de interconexión entre las microesferas forman las “gargantas de los poros” en el *scaffold*; de esta manera, la interconectividad entre los poros es controlada gracias a la presión aplicada durante la formación de la plantilla.

Las plantillas se sumergen en una disolución de los co-monómeros en las proporciones adecuadas para obtener la composición deseada de la red polimérica, conteniendo un 5% del entrecruzador TrEGDMA y un 1% de benzoína; posteriormente se polimerizan bajo luz ultravioleta a temperatura ambiente. Tras la polimerización, las plantillas se disuelven con acetona durante aproximadamente 48 horas mediante un extractor de Soxhlet. En este punto, introducimos los *scaffolds* en un recipiente de vidrio con acetona y se cambia lentamente el disolvente por agua para conseguir una contracción uniforme de los soportes macroporosos. Se cortan réplicas de los andamiajes de 3 mm de diámetro por 1 mm de espesor (Figura 21), que se lavan con una mezcla de agua/etanol durante 6 horas en un extractor de Soxhlet. Finalmente, secamos los andamiajes a vacío durante veinticuatro horas a temperatura ambiente y posteriormente durante otras veinticuatro horas a 50°C. Tanto las muestras utilizadas en los cultivos celulares como las que se implantan en los animales, se esterilizan con una dosis de 25 kGy de radiación gamma.

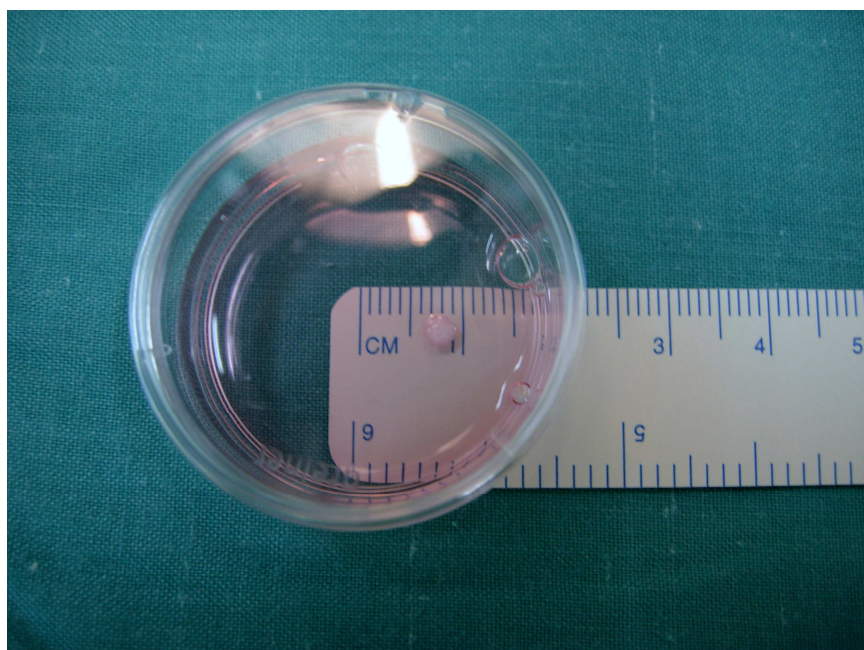


Figura 21: *scaffold* de 3 mm de diámetro introducido en medio de cultivo.

Hemos preparado cuatro grupos de *scaffolds*: el primero está constituido por aquellos en cuya composición tenemos P(EA-co-MAAc) en proporción 90/10; en el segundo grupo los soportes están compuestos por P(EA-co-HEA) en porcentaje 90/10; la composición química del tercer grupo de matrices es P(EA-co-HEA) en igual proporción (50/50) y el último tipo de andamiajes, los que constituyen el grupo 4, contienen PEA puro (Tabla 1). Todos los discos tienen el mismo diámetro y espesor. A cada grupo de *scaffolds* le corresponde una serie quirúrgica con la misma numeración, como expondremos más adelante.

Grupo	EA	MAAc	HEA	PEA
1	90	10	-	-
2	90	-	10	-
3	50	-	50	-
4	-	-	-	100

Tabla 1: composición de los *scaffolds* por grupos. Las cifras detallan la proporción de cada monómero (o polímero en el caso del PEA) según el grupo de *scaffolds* que consideremos. En la casilla de los monómeros (o del polímero PEA) que no forman parte de esta composición, aparece un guión.

Respecto a su afinidad por el agua, el implante de PEA es hidrófobo, los compuestos por P(EA-co-HEA) 90/10 y por P(EA-co-MAAc) 90/10 son levemente hidrofílicos y el P(EA-co-HEA) 50/50 es un hidrogel cuyo contenido en agua en equilibrio en inmersión en agua líquida es del 18.1 %²⁹.

La porosidad de los *scaffolds* se valora a partir del peso de las muestras secas respecto al de las muestras cuyos poros se rellenan con agua. Para asegurarnos de que el agua penetra en todos los poros (incluso en los discos con polímeros más hidrofóbicos), la muestra seca se introduce en un contenedor de cristal en el que se hace el vacío y a continuación se inyecta el agua²³³. La fracción de volumen de poros en las matrices es de $0,75 \pm 0,03$ en todas las muestras implantadas.

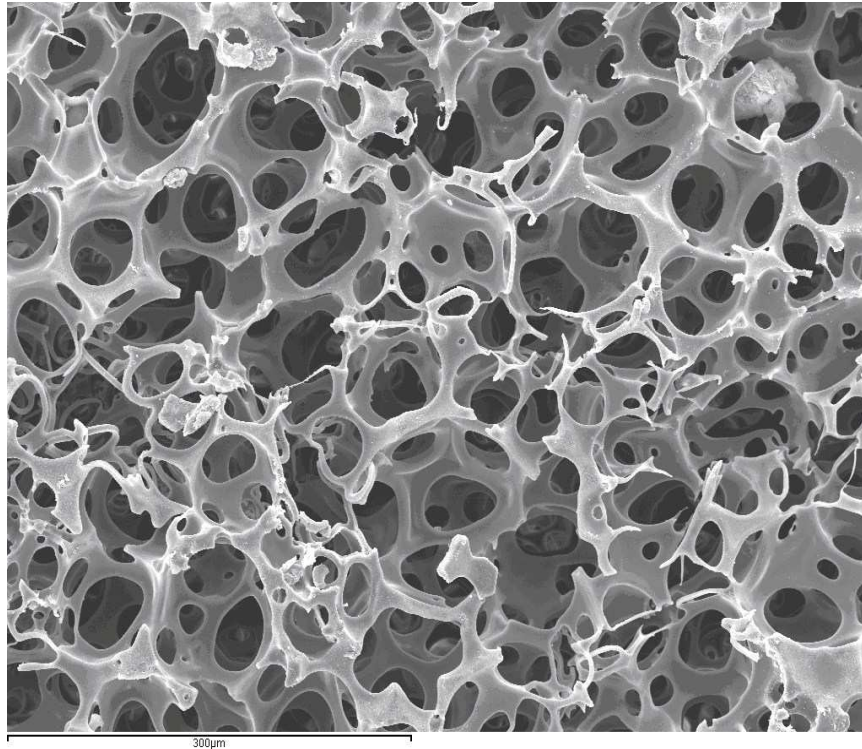


Figura 22: imagen de microscopía electrónica de barrido de un *scaffold* de estructura porosa (barra de aumentos 300 micras).

La morfología de los andamiajes se examina con un microscopio electrónico de barrido criogénico (cryoSEM) (JEOL JSM 5410) equipado con una criounidad (Oxford CT 1500). Utilizamos una tensión de aceleración de 15 kV (Figura 22).

1.6. INCORPORACIÓN DE LOS CONDROCITOS A LOS *SCAFFOLDS*

El procedimiento para generar los *scaffolds* con condrocitos (CC) es el siguiente: colocamos los discos

sintetizados en una placa de cultivo enriquecido con poliestireno (Nunc A/S) y los humedecemos con una solución salina balanceada de Hank's (Sigma-Aldrich). Tras retirar la solución de Hank's, les inyectamos la suspensión celular (10^6 células viables en 20 μ l de medio) para que las células ocupen su estructura porosa.



Figura 23: procesamiento de los *scaffolds* con presiembra de condrocitos.

Tras una hora de incubación, los ponemos en un recipiente nuevo, al que añadimos medio de cultivo hasta cubrir el material. Transcurridos tres días, reemplazamos el medio de cultivo por DMEM suplementado con 1% ITS (de *Insulin, Transferrin, Sodium selenite*) (BD Biosciences) y 50

µg/ml de ascórbico. Los *scaffolds* permanecen en este nuevo medio durante tres días (Figura 23), antes de ser implantados en los conejos.

Biomaterial	Serie	Biomaterial	Serie
EA90 MAAc10	S1-CC-1	EA90 MAAc10	S1-SC-1
EA90 MAAc10	S1-CC-2	EA90 MAAc10	S1-SC-2 *
EA90 HEA10	S2-CC-1	EA90 MAAc10	S1-SC-3
EA90 HEA10	S2-CC-2	EA90 HEA10	S2-SC-1
EA50 HEA50	S3-CC-1	EA90 HEA10	S2-SC-2
EA50 HEA50	S3-CC-2	EA50 HEA50	S3-SC-1
PEA100	S4-CC-1	EA50 HEA50	S3-SC-2
PEA100	S4-CC-2	PEA100	S4-SC-1
		PEA100	S4-SC-2 *
		PEA100	S4-SC-3

Tabla 2: distribución de biomateriales en *scaffolds* con presiembra de condrocitos (CC), según la serie y el animal intervenido y sin presiembra de condrocitos (SC), según la serie y el animal intervenido (* *exitus*).

Cada serie quirúrgica, de la 1 a la 4, está constituida por dos sub-series, según se presiembren los soportes con condrocitos (CC) o no se presiembren y se implanten directamente en el animal (SC) (Tabla 2).

2. MÉTODO

2.1. ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES

La estabulación de los conejos se lleva a cabo según las directrices del Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre de 2005 sobre “Protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”.

Para la satisfactoria adaptación de los animales a su nuevo medio, previamente a la cirugía, se les estabula durante setenta y dos horas en jaulas individuales de dimensiones 2200 cm² de superficie del suelo por 40 cm de altura, permitiéndoles desplazarse en su interior.

La alimentación es a base de pienso específico de mantenimiento (Harlan) y agua, suministrados *ad libitum*.

Cada jaula queda identificada con el número y la serie del animal correspondiente. La misma identificación se hace constar en la cara interna de la oreja de cada conejo.

2.2. PREPARACIÓN PREOPERATORIA

Media hora antes de la intervención quirúrgica, se le administra como sedación a cada conejo, una dosis intramuscular de ketamina (15 mg/kg) (Pfizer) y medetomidina (0,1 mg/kg) (Pfizer); y como profilaxis antibiótica, cefazolina (20 mg/kg) (Normon) por la misma vía de administración. Como medida de seguridad, se realiza una venoclisis de la vena auricular, con infusión de suero

fisiológico de mantenimiento, que se retira al concluir la intervención.

Posteriormente, le rasuramos la rodilla derecha y se pincela con una solución de povidona yodada al 10%.

Colocamos al animal en decúbito supino, sujetando ambas patas posteriores con una cincha a la mesa de quirófano. La zona operatoria se envuelve con un paño perforado estéril, quedando ésta aislada del resto de la piel del conejo y preparada para la cirugía (Figura 24).

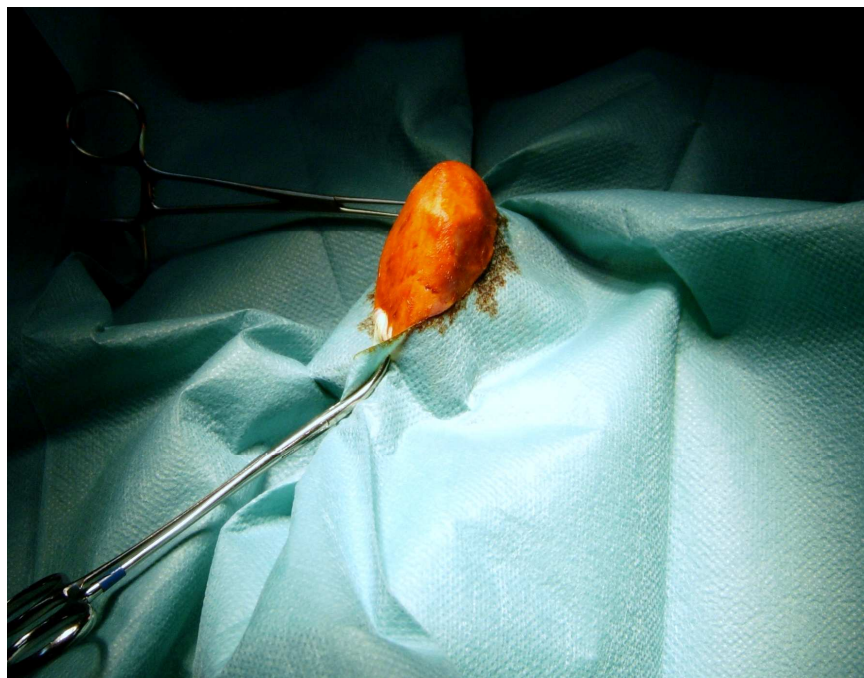


Figura 24: campo quirúrgico preparado para la intervención. El animal está colocado en decúbito supino con la rodilla en flexión para delimitar mejor los contornos anatómicos del tendón cuadriceps, la rótula y el tendón rotuliano.

2.3. TÉCNICA ANESTÉSICA

Los procedimientos de anestesia son llevados a cabo por el equipo de veterinarias de la Unidad Central de Investigación.

Tras la sedación inicial, se realiza una anestesia inhalatoria de mantenimiento con isofluorano (Abbott Laboratories) al 1,5 % con mascarilla (Figura 25). Durante el acto operatorio y por vía intramuscular, se le administra al animal el antiinflamatorio ketoprofen (1 mg/kg) (Sanofi-Aventis).



Figura 25: aplicación de una mascarilla al animal para la anestesia inhalatoria de mantenimiento durante la intervención quirúrgica.

2.4. TÉCNICA QUIRÚRGICA

Todas las intervenciones son realizadas por el mismo cirujano (F.F.B.) y el mismo ayudante (P.G.R.), bajo las máximas condiciones de asepsia.

Con la rodilla en flexión, identificamos los contornos anatómicos del tendón cuadriceps, de la rótula y del tendón rotuliano. Se lleva a cabo una incisión parapatelar medial de unos 20 mm de longitud, con los siguientes límites en el eje cráneo-caudal: 5 mm proximal al borde interno de la rótula y la inserción del tendón rotuliano en la tibia. Con el transcurrir de las cirugías, hemos logrado reducir el tamaño de la incisión a expensas de la zona distal (longitud total aproximada de 17 mm).

Separado el fino tejido celular subcutáneo del animal, se aprecia por transparencia la arteria geniculada superomedial. Al ser una fuente conocida de sangrado, inicialmente procedimos a su clampaje con pinzas de hemostasia. Posteriormente, hemos sustituido dicho gesto quirúrgico y utilizamos un punto hemostático con Dexon 3/0 (Braun Dexon), consiguiendo un resultado más seguro y una técnica más limpia (Figura 26).

En este momento, se procede a la artrotomía medial que conseguimos sea más larga que la incisión cutánea, separando hacia proximal y distal cada uno de los extremos de la herida cutánea. Se produce de manera inconstante, un pequeño sangrado venoso en la grasa de Hoffa que

controlamos con una pinza de hemostasia mantenida durante diez a quince segundos, retirándose posteriormente para facilitar la visión de la superficie articular.

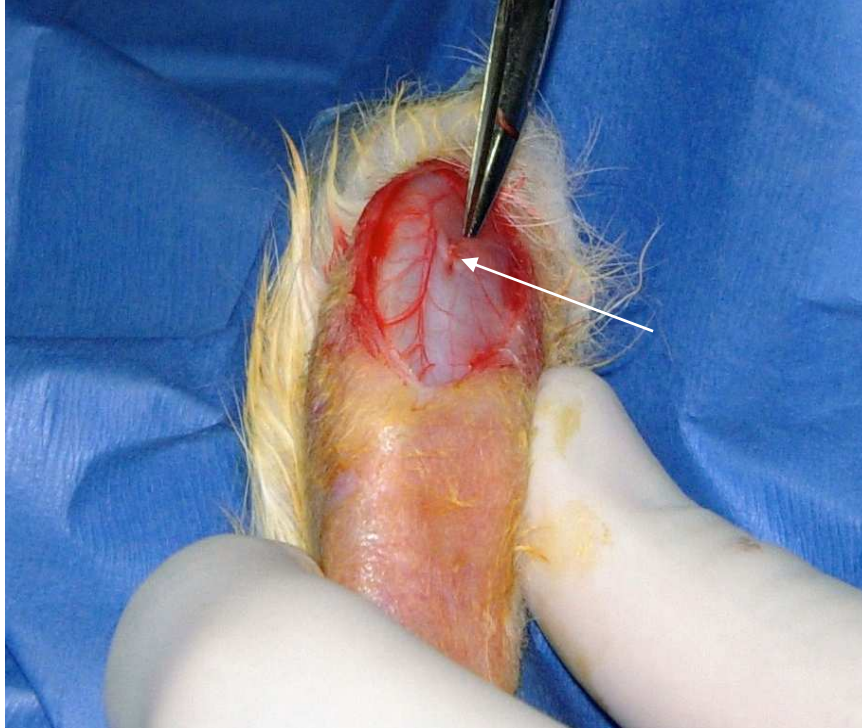


Figura 26: abordaje parapatelar medial. En el plano subcutáneo, se aprecia la red venosa superficial. La arteria geniculada supero-medial es visible por transparencia. La flecha indica el punto hemostático que aplicamos de forma preventiva para evitar el sangrado durante la operación.

Una vez asegurada la hemostasia y con la rodilla en extensión, luxamos externamente el aparato extensor mediante una presión suave en sentido medio-lateral.

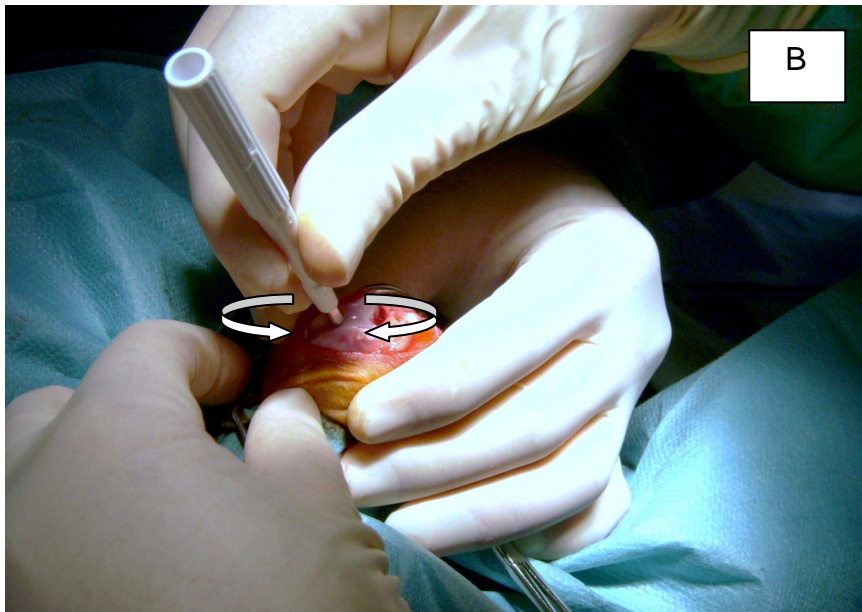
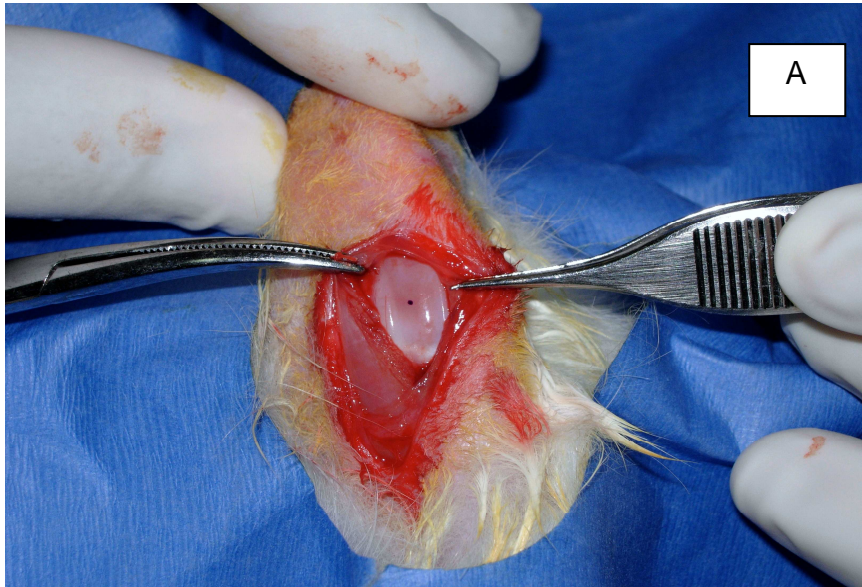
En un punto central de confluencia de los ejes cráneo-caudal y latero-medial de la tróclea femoral (Figura

27-A), utilizando un sistema de toma de biopsia de dermatología (*punch*) desechable de 3 mm de diámetro y mediante finos movimientos giratorios, creamos un defecto condral con una profundidad hasta el inicio del plano subcondral (Figura 27-B). Este defecto circular (Figura 27-C) lo rellenamos con el *scaffold* correspondiente de las mismas dimensiones (Figura 27-D), variando su naturaleza química en cada una de las series.

Comprobamos la estabilidad del implante de dos maneras:

- realizando una presión suave sobre los bordes del mismo con la punta de una pinza mosquito
- y sometiendo a la rodilla a varios ciclos de flexo-extensión con el aparato extensor reducido y objetivando que el andamiaje permanece en su lecho al volver a luxar el aparato extensor.

El cierre de la artrotomía se hace con una sutura continua de Dexon 3/0 (Braun Dexon); previamente al mismo, comprobamos la hemostasia del campo (fundamentalmente de las arterias geniculadas y del plexo venoso de la grasa de Hoffa). La sutura cutánea es intradérmica y también con Dexon 3/0 (Braun Dexon). Por último, para mejorar la asepsia de la herida, aplicamos sobre la misma el apósito adhesivo en aerosol Nobecután (Inibsa) (Figura 27-E).



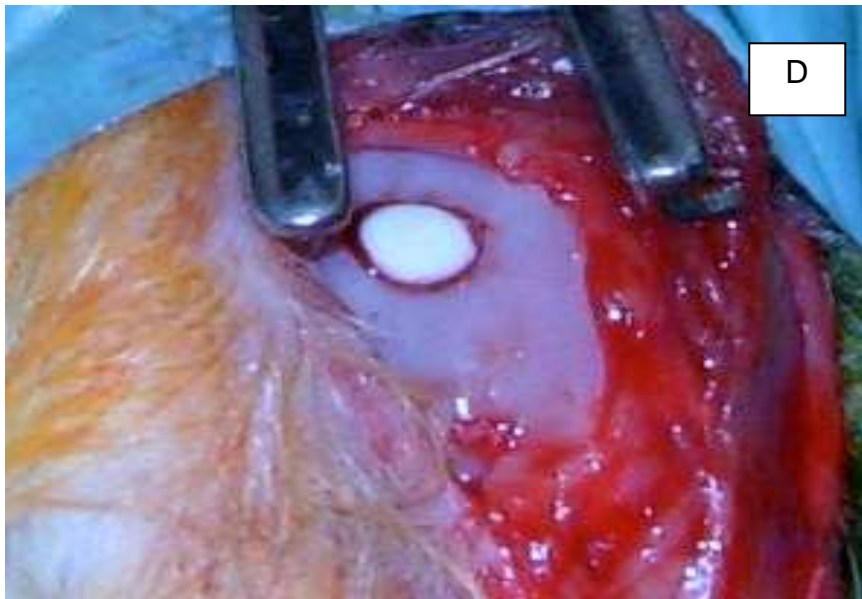
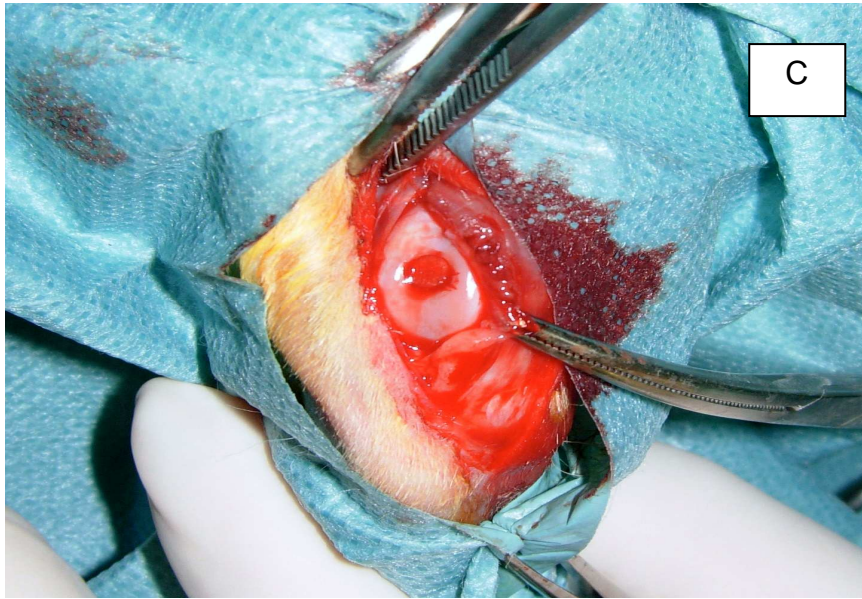




Figura 27: fases de la cirugía. Artrotomía medial, luxación del aparato extensor y localización del punto para realizar el defecto condral (A); realización del defecto con *punch* mediante movimientos rotatorios (flechas) (B); defecto condral de 3 mm de diámetro (C); *scaffold* introducido en el defecto condral (D); sutura intradérmica y limpieza del campo quirúrgico (E).

2.5. POSTOPERATORIO

Una vez finalizada la intervención quirúrgica, colocamos al animal en un contenedor con una manta eléctrica de calor y posteriormente es trasladado a su jaula.

Para asegurar la analgesia postoperatoria, pautamos a cada animal meloxicam (0,3-0,6 mg/kg) (Boehringer Ingelheim) cada veinticuatro horas, vía oral, durante los tres días siguientes a la intervención.

Se cura la herida quirúrgica a diario hasta que el crecimiento del pelo del animal lo impide, comprobando posibles cambios del aspecto de la misma (signos inflamatorios, dehiscencias de sutura,...).

2.6. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

El protocolo utilizado para el sacrificio de los animales se inicia con la misma pauta de sedación del preoperatorio [ketamina (Pfizer) y medetomidina (Pfizer)], procediéndose a la eutanasia con una sobredosis de 500 mg de tiopental sódico intravenoso (Braun). Estos fármacos se administran previa venoclisis de la vena auricular del conejo.

2.7. OBTENCIÓN DE LAS PIEZAS

Para facilitar la obtención de las piezas y su posterior estudio histológico, desarticulamos la extremidad inferior desde la cadera. Seccionamos el músculo cuádriceps, rebatiendo a continuación el aparato extensor en sentido distal (Figura 28-A) o bien externamente sin sección muscular previa (Figura 28-B). De esta manera, queda bien expuesta la superficie de la tróclea femoral. Posteriormente, mediante un trocar de mosaicoplastia de 10 mm de diámetro (Arthrex), creamos un cilindro perfecto en cuyo centro se encuentra la zona del implante (Figura 29-A). Esta pieza cilíndrica (Figura 29-B), se introduce en formol tamponado al 10% para iniciar su procesado.

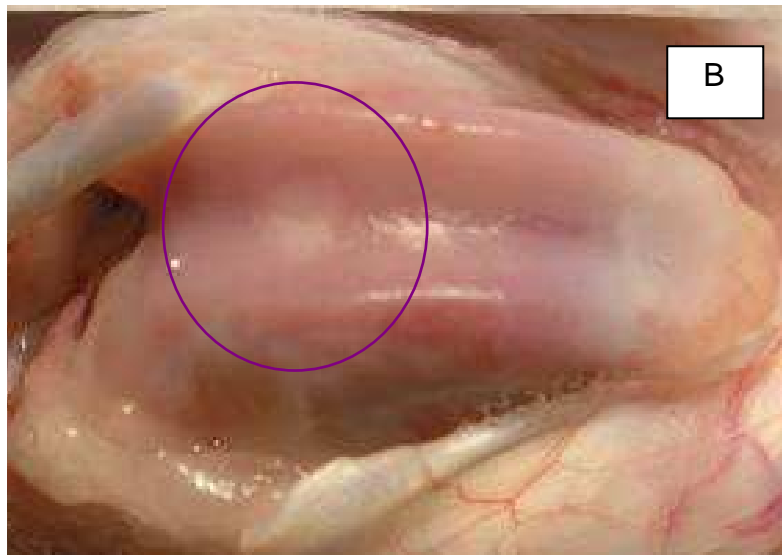
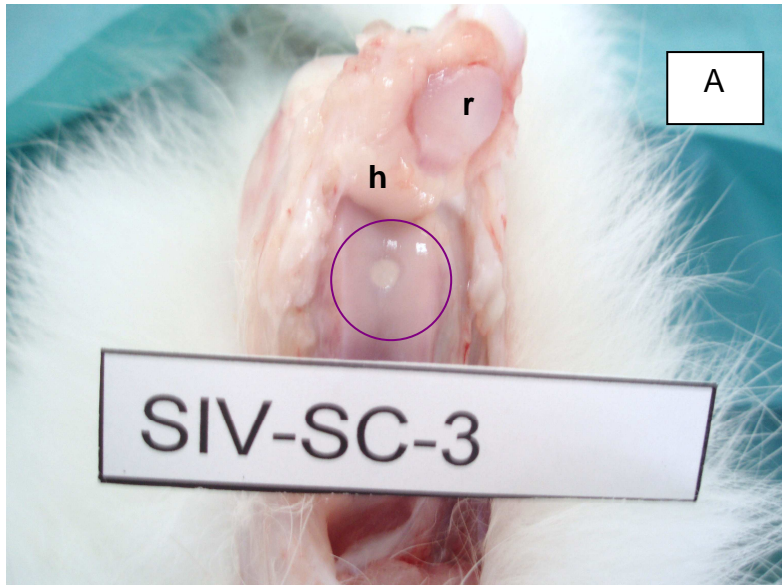


Figura 28: aspecto de la rodilla del conejo a los 3 meses de la intervención. El aparato extensor se ha rebatido distalmente, para exponer la superficie articular del fémur; rótula (r) y grasa de Hoffa (h) (A). En el interior del círculo se identifica el implante integrado respecto al cartílago de alrededor (B).

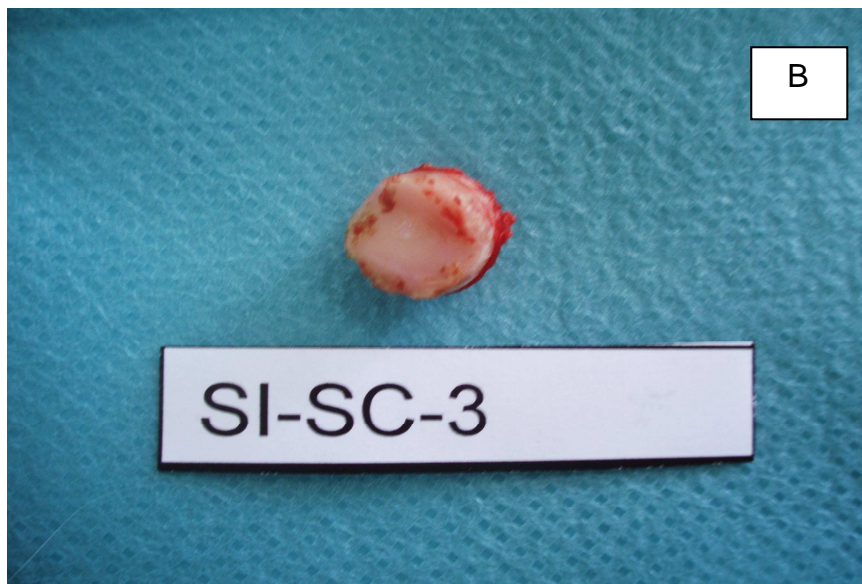


Figura 29: superficie articular en la que se ha marcado los límites del cilindro con el instrumental de mosaicoplastia (flecha) (A). El cilindro osteocartilaginoso es extraído para el inicio de su procesamiento histológico (B).

Tras la fijación en formol durante cinco días, se introducen las muestras en una solución decalcificante a temperatura ambiente (Osteosoft, Merck) durante cinco semanas. Transcurrido este tiempo, las muestras de tejido osteocartilaginoso se incluyen en parafina y se realizan secciones seriadas de 5-7 micras de espesor con microtomo (Leica) (Figura 30), para su posterior estudio microscópico.

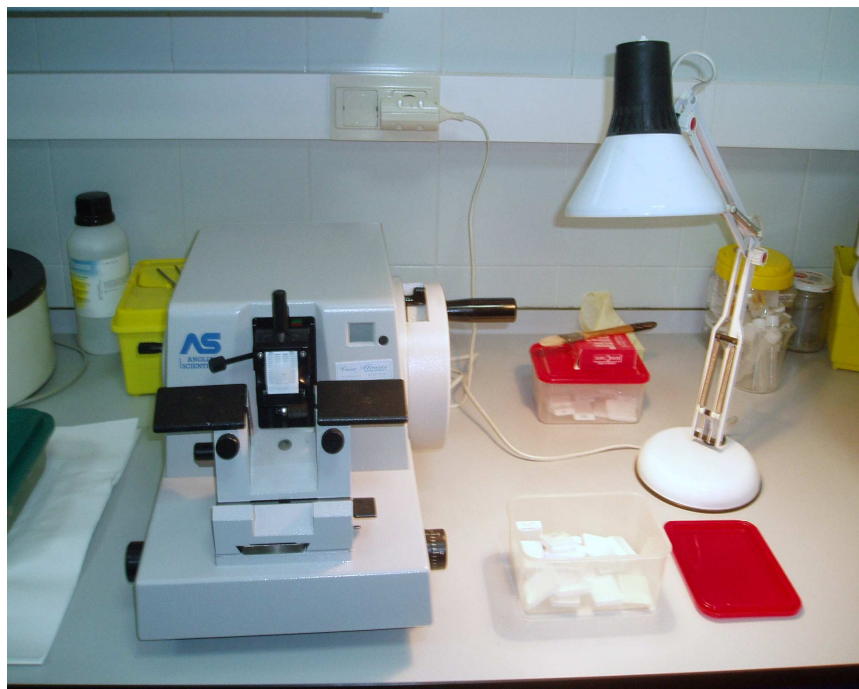


Figura 30: microtomo utilizado para las secciones de los bloques de parafina en los que se han incluido las muestras de tejido osteocartilaginoso, para su posterior estudio histológico.

2.8.- ESTUDIO HISTOLÓGICO

El análisis de la arquitectura general del complejo osteoarticular lo llevamos a cabo mediante el estudio microscópico de las muestras procesadas, realizando cortes seriados y tiñéndolas con tinciones básicas en el estudio histológico, como son la Hematoxilina-Eosina (HE), el tricrómico de Masson (TM), el Azul Alcian (AA) y con técnicas específicas de inmunohistoquímica. Posteriormente observamos dicho material al microscopio óptico (Leica DM 4000 B) y realizamos las series fotográficas oportunas (cámara fotográfica Leica DFC 420) para constatar los resultados obtenidos.

La tinción de HE nos permite apreciar el aspecto normal del CA, con células alojadas en el interior de lagunas, que son planas en superficie y paralelas al borde libre, mientras que a mayor profundidad aparecen redondeadas y dispuestas en hileras perpendiculares a la superficie. Las lagunas están rodeadas de matriz territorial basófila (teñida intensamente de color morado) de grosor variable dependiendo de la actividad celular, mientras que la matriz interterritorial es menos basófila (de coloración más rosácea). En profundidad, esta tinción nos ofrece la posibilidad de observar el tejido óseo esponjoso, con sus células alojadas en pequeñas lagunas que resaltan sobre la matriz laminar, intensamente teñida de rosa. A su vez, nos

permite comprobar la rica vascularización del tejido óseo mientras que los vasos están ausentes en el cartilaginoso.

La tinción de TM (fucsina ácida y azul de anilina) permite destacar por un lado las regiones ricas en fibras de colágeno, como las matrices extracelulares cartilaginosa y ósea (se tiñen de color azulado), y por otro lado la presencia de hematíes de los vasos sanguíneos del tejido óseo (se tiñen intensamente de rojo).

Para el estudio histológico específico de la matriz cartilaginosa, utilizamos tanto la tinción de AA como la inmunodetección de colágeno tipo II. Con la primera, la matriz cartilaginosa se tiñe de color azul celeste intenso, mientras que el tejido óseo se observa de color grisáceo y los vasos sanguíneos no destacan al adoptar un color pardo-grisáceo. La segunda técnica pone de manifiesto, mediante su marcaje específico, la presencia de fibras de colágeno tipo II (características del tejido cartilaginoso y no del tejido óseo). Revelando dicha técnica con el sustrato diaminobencidina (DAB), obtenemos una coloración parda oscura en la MEC, que contiene este tipo de fibras de colágeno.

La presencia de tejido óseo se objetiva mediante la inmunodetección de colágeno tipo I (presente en el tejido óseo y ausente en el CH) y de osteocalcina, proteína cuya expresión está restringida a células de extirpe osteoblástica. La observación microscópica de estos preparados, tras

revelarlos con DAB, pone de manifiesto las áreas de tejido óseo, teñidas de color pardo oscuro.

El estudio microscópico de la proliferación celular se realiza gracias a la inmunodetección del antígeno Ki-67. Este antígeno es una proteína nuclear expresada en las células de la fase activa del ciclo celular (G1, S, G2 o M), pero que está ausente en las células en fase de reposo (G0). Así, con esta técnica se tiñe intensamente de color pardo el núcleo de las células que se encuentran en dichas fases activas del ciclo celular.

El análisis inmunohistológico se utiliza para detectar la síntesis de colágeno tipos I y II, de osteocalcina y la expresión del antígeno Ki-67 (marcador de proliferación). Para ello, introducimos los cortes histológicos seriados durante una hora a temperatura ambiente, en una dilución al 1:1000 de anticuerpo para colágeno tipo I (Sigma); 1 µg/ml de anticuerpo para colágeno tipo II (Calbiochem); osteocalcina (R&D Systems) y en una dilución al 1:100 de anticuerpo para Ki-67 (Dako Cytomation). Los complejos antígeno-anticuerpo se detectan colorimétricamente utilizando HRP (*Horseradish Peroxidase*)-antígeno secundario conjugado y DAB con cromógeno (Dako Cytomation). Finalmente contrastamos los cortes con HE.

El estudio histológico de los biomateriales en forma de disco implantados en el complejo osteoarticular, se lleva a cabo igualmente, analizando a microscopía óptica los

cortes seriados de las muestras obtenidas. Éstos, generalmente se observan “en negativo”, de manera que la red de polímeros aparece como espacios blancos más o menos interconectados, que no se colorean con las tinciones utilizadas.

Por su parte, el tejido neoformado, que ha proliferado e invadido los poros del disco, se tiñe específicamente, dependiendo tanto del colorante utilizado como del tejido que en cada caso se haya desarrollado a lo largo de los tres meses que dura la experiencia (Figura 31).

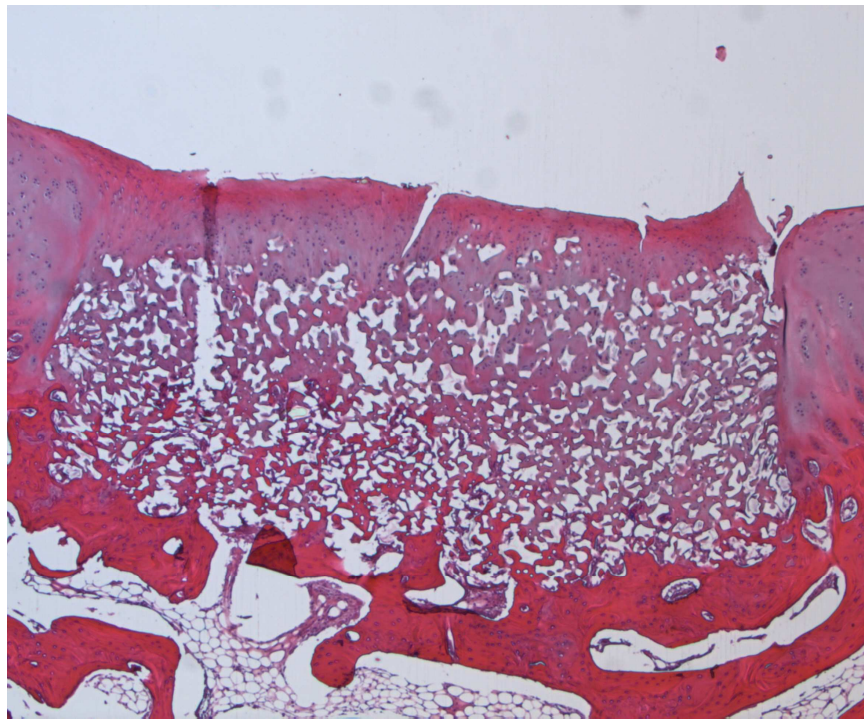


Figura 31: microscopia óptica (tinción HE, aumentos originales 5x) de una muestra de la serie 4 sin presiembra de células.

Resultados

1. ESTUDIO HISTOLÓGICO

1.1. SERIE 1

La composición de los *scaffolds* utilizados en esta serie es: EA (90%) y MAAC (10%). Esta combinación de biomateriales no da un resultado totalmente satisfactorio, ya que, aunque se produce cierta proliferación de neot Tejido tanto en su interior como en las zonas periféricas, encontramos amplias zonas de tejido fibroso alrededor de los discos implantados (a modo de encapsulación), sin que exista un regenerado completo de la superficie articular.

1.1.1. PRESEMBRADO DE CONDROCITOS

La observación microscópica de estas muestras, evidencia que el disco implantado en el lecho de la lesión condral está completamente rodeado de tejido osteoarticular (Figuras 32 y 34). En superficie, apreciamos CH de aspecto mayoritariamente normal, aunque con ciertas zonas de discontinuidad central en el cartílago y áreas de fibrosis en superficie. En las áreas de transición laterales y profunda del implante, objetivamos tejido óseo esponjoso de características normales.

El estudio histológico pone de manifiesto que el andamiaje se encuentra moderadamente invadido por tejido neoformado rellenando sus cavidades porosas, con predominio en las zonas central y superior del implante (Figura 33). En dichos puntos, el tejido neoformado es

basófilo y de apariencia similar al CH. Sin embargo, en las zonas periférica y profunda del disco, este tejido es más escaso y de carácter eosinófilo, y presenta importantes similitudes con la MEC ósea.

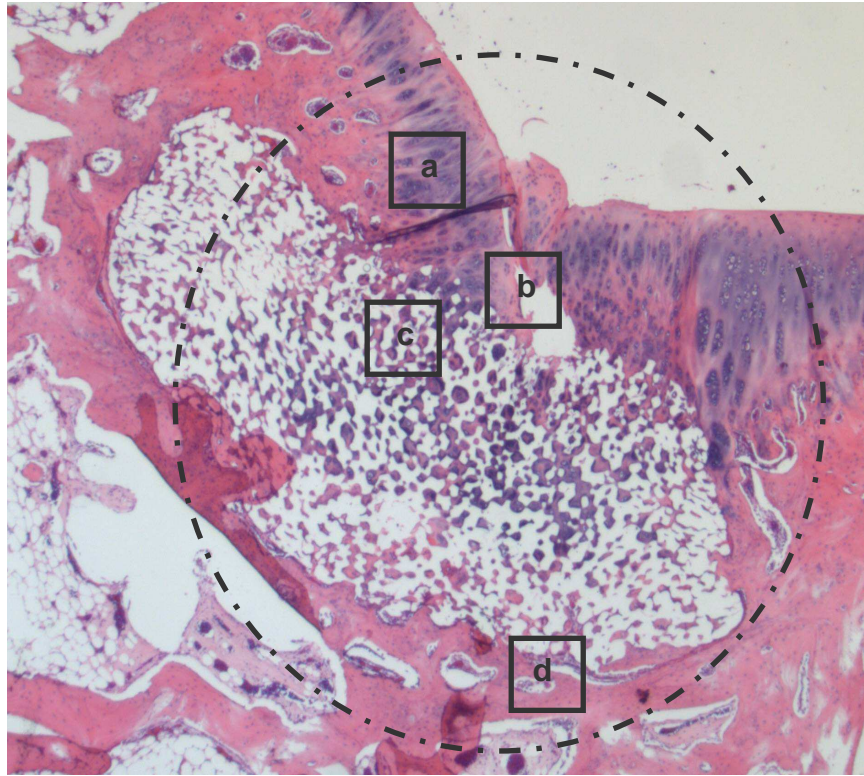


Figura 32: microscopia óptica de una muestra de la serie 1 con presiembra de condrocitos teñida con HE (aumentos originales 5x). El círculo contiene la zona del *scaffold* cubierto en superficie por cartílago de características normales (a), con una zona de discontinuidad central (b). Apreciamos anidación celular en la zona superior del *scaffold* (c) y osteoclastos aislados en la zona inferior (d). La integración del *scaffold* es parcial, con escasa anidación celular del mismo.

La integración del soporte tridimensional en el complejo osteoarticular es satisfactoria en general, observándose una muy buena continuidad entre el neocartílago formado en el interior del disco implantado y el cartílago de la superficie articular. La continuidad entre los tejidos óseos de las zonas laterales y basal o profunda es, igualmente, muy satisfactoria.

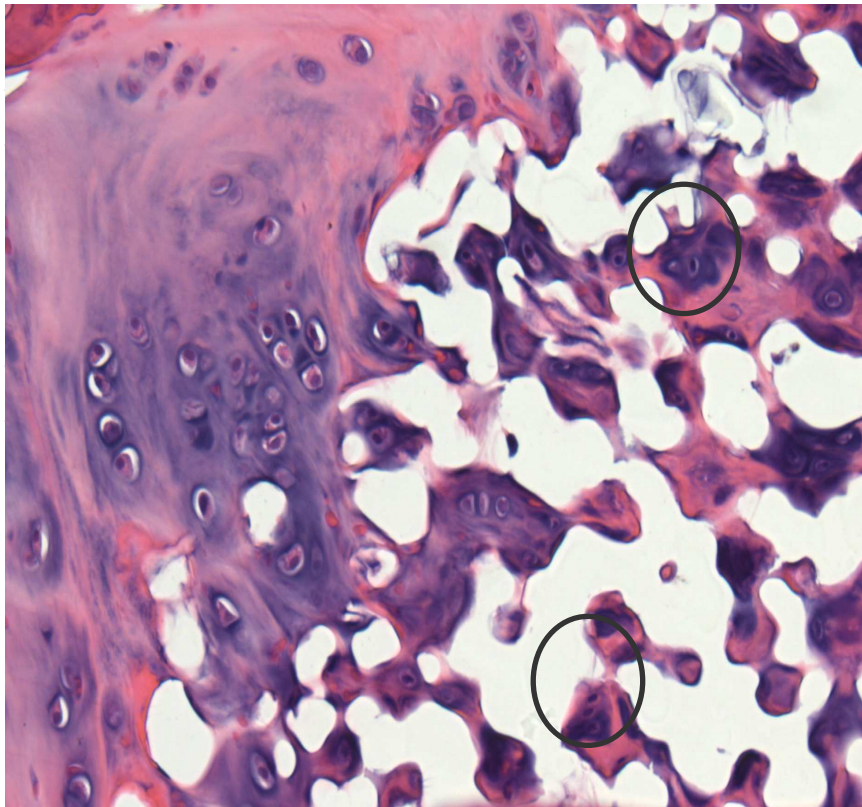


Figura 33: microscopía óptica de la muestra anterior (tinción HE, aumentos originales 60x), que corresponde a la zona superior del implante (área (c) de la figura 32) ampliada, en la que se observa la anidación celular (círculos).

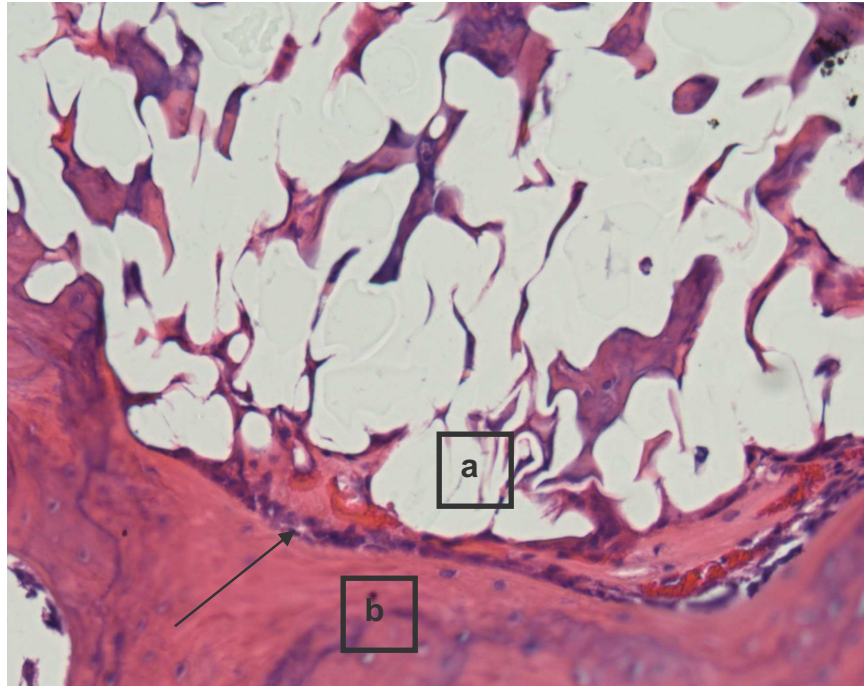


FIGURA 34: área (d) de la figura 32 ampliada (tinción HE, aumentos originales 60x). La línea basófila (flecha) que sitúa en la transición entre el *scaffold* en profundidad (a) y el hueso subcondral (b) y se corresponden con la localización periférica de los osteoclastos.

1.1.2. SIN PRESIEMBRA DE CONDROCITOS

La localización en profundidad respecto a la superficie articular del *scaffold* implantado es variable. En una de las muestras, se obtiene una regeneración completa de la superficie articular. El implante está situado a cierta profundidad, por debajo de un CH de aspecto normal en superficie, quedando el resto del disco rodeado de una banda ancha de tejido óseo de características normales. Sin embargo, en otra de las muestras de esta serie, se aprecia una respuesta más retardada, de manera que parte del

borde superior del andamiaje está en contacto con la cavidad articular y por lo tanto sin recubrimiento de tejido neoformado, mientras que el resto del borde superior del mismo se encuentra recubierto de un tejido fibroso con áreas condrales, con un tejido de aspecto similar al sinovial en superficie. El estudio microscópico de estas muestras, revela que el neot Tejido formado en el interior de las matrices macroporosas es sensiblemente más escaso que el que se obtiene en los implantes con el mismo biomaterial pero con condrocitos presembrados (Figura 35-37).

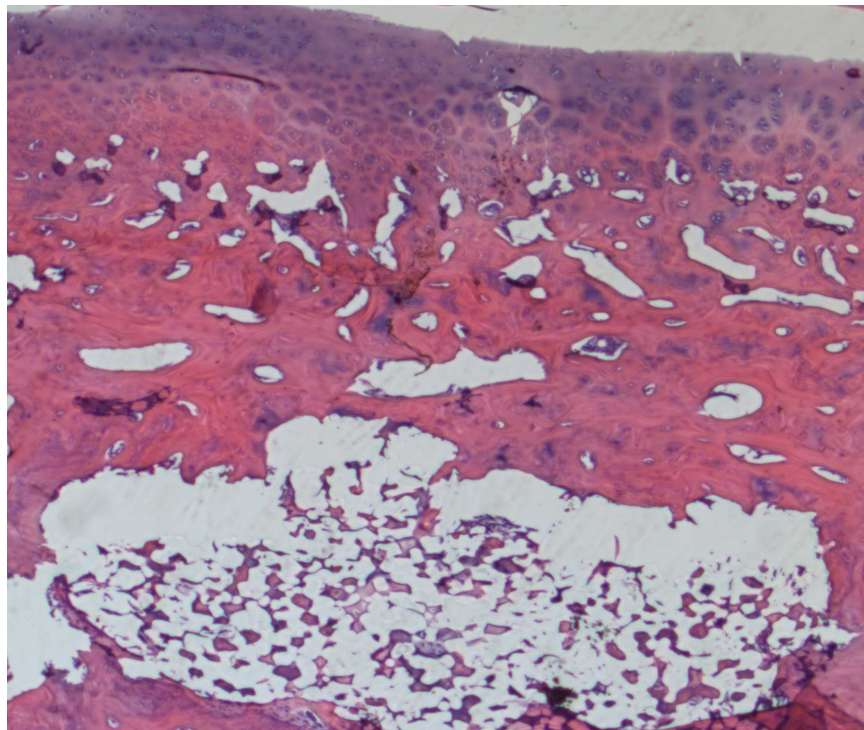


Figura 35: microscopía óptica de una muestra de la serie 1 sin presiembra de condrocitos. Entre el disco implantado y el CA regenerado, observamos tejido óseo (tinción HE, aumentos originales 5x).

La zona central de las matrices contiene más islotes de tejido neoformado que la periférica. Este tejido presenta aspecto cartilaginoso obteniéndose reacción positiva para el colágeno tipo II (marcador de la matriz condral). En las zonas laterales a los implantes, la respuesta proliferativa es menor; el tejido neoformado tiene características del tejido óseo, puesto que es más eosinófilo e inmunorreactivo para osteocalcina (marcador específico de tejido óseo).

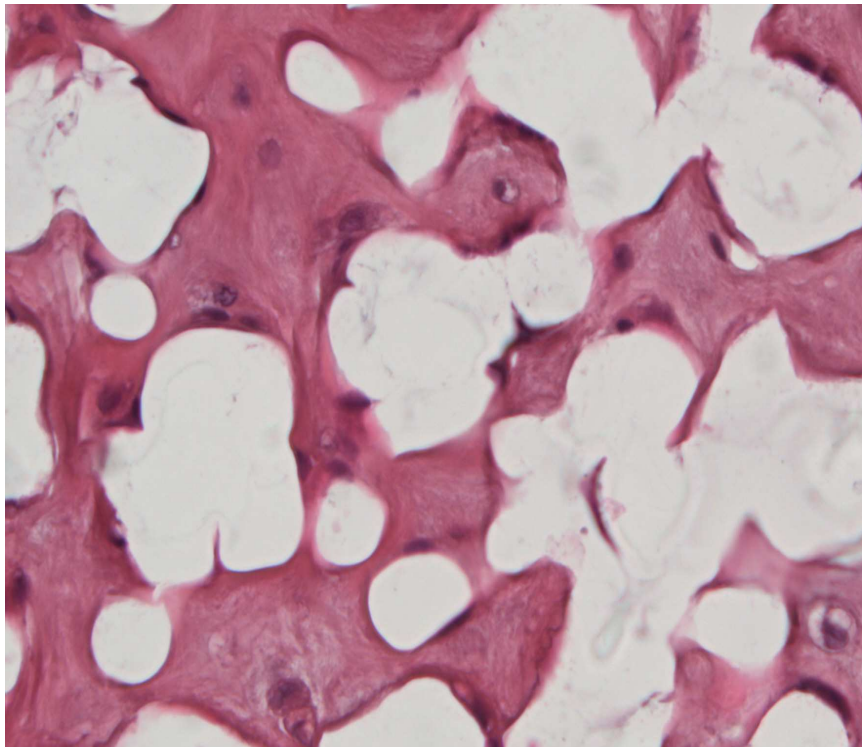


Figura 36: microscopía óptica de la muestra anterior. El tejido neoformado en el interior de los discos es escaso, siendo en la zona central algo más abundante y de aspecto cartilaginoso, mientras que en la zona periférica es más escaso y de aspecto óseo (tinción HE, aumentos originales 60x).

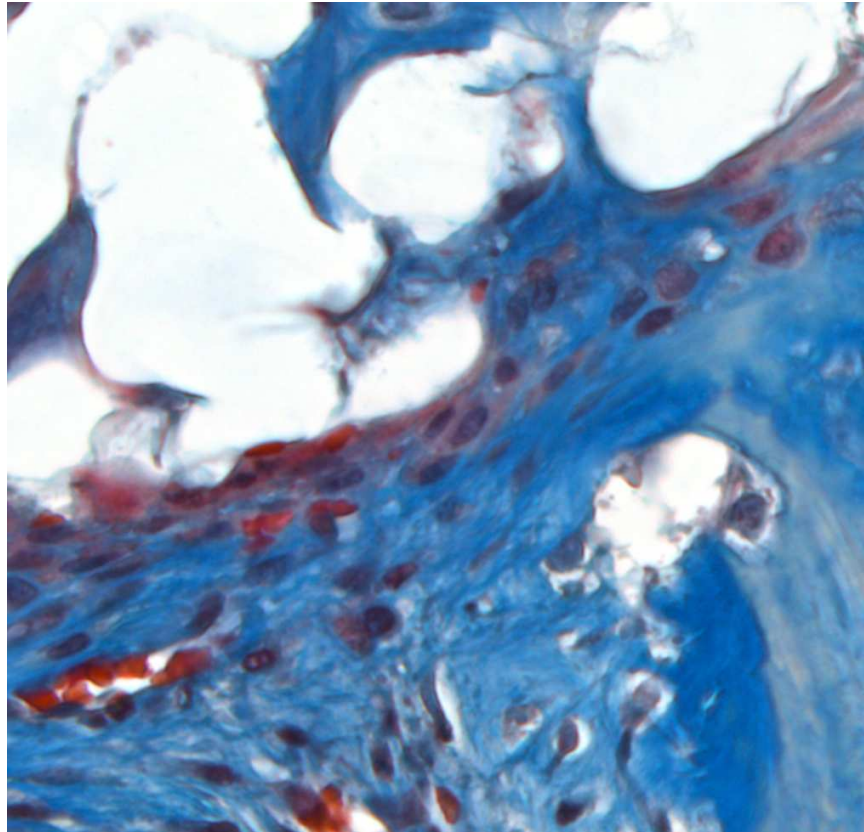


FIGURA 37: microscopía óptica de la muestra de la figura 35. La integración de los *scaffolds* no ha sido del todo satisfactoria, ya que se observa una reacción fibrosa alrededor del disco, principalmente en las zonas de contacto con el tejido óseo circundante, con presencia de macrófagos, dando un aspecto de encapsulación (tinción TM, aumentos originales 60x).

1.2. SERIE 2

Los *scaffolds* utilizados en esta serie están compuestos por un 90% de EA y un 10% de HEA. La respuesta tisular a los implantes de esta serie es en general satisfactoria, ya que la superficie de los mismos se recubre totalmente por un tejido de aspecto condral. En su interior,

se aprecia abundante neot Tejido tanto cartilaginosa como ósea. La integración resulta en general muy satisfactoria (con mejores resultados para las muestras con presembrado de condrocitos), a pesar de que se aprecian algunas zonas de fibrosis.

1.2.1. PRESEMBRADO DE CONDROCITOS

La superficie de los implantes se halla completamente tapizada de tejido cartilaginosa con estructura histológica de CH normal: células en superficie más pequeñas y paralelas a la misma mientras que en profundidad, se alinean en hileras perpendiculares al plano superficial con una matriz intercelular más abundante. Este neocartilago formado, se extiende en profundidad hasta contactar con la zona central del disco implantado, con el que presenta una perfecta continuidad, no observándose ningún signo de rechazo. En las zonas marginales de la superficie superior, así como en los laterales en la zona profunda del *scaffold*, se identifica tejido óseo esponjoso, constituido por trabéculas eosinófilas rodeadas de osteoblastos (Figura 38).

En el interior de los andamiajes se observa abundante tejido neoforado, cuyo aspecto es mayoritariamente cartilaginosa, ocupando sobre todo la zona superior y central de los mismos. El neot Tejido presente en los laterales y en la base de los discos es más escaso, eosinófilo y de aspecto semejante al material osteoide.

Esporádicamente, este tejido aparece en proximidad de neovasos y de tejido de apariencia mesenquimal.

Respecto a la integración de los implantes, se observa una perfecta transición entre el neot Tejido proliferado en su interior y el complejo osteoarticular circundante.

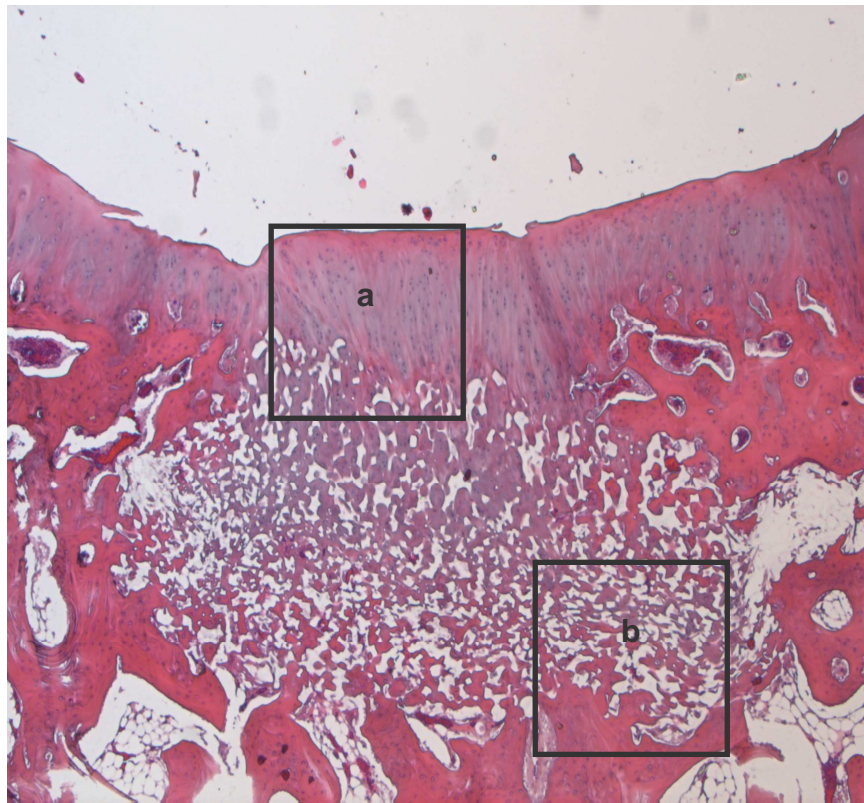


Figura 38: microscopía óptica de una muestra de la serie 2 con presembrado de condrocitos en la que se aprecia una integración y anidación celular satisfactorias del implante, rodeado en superficie de CH y en profundidad de tejido óseo, sin signos de rechazo o encapsulación. Véase la continuidad del CH en superficie con la zona superior del andamiaje (tinción HE, aumentos originales 5x). Las áreas (a) y (b) se amplían en las figuras 39 y 40 respectivamente.

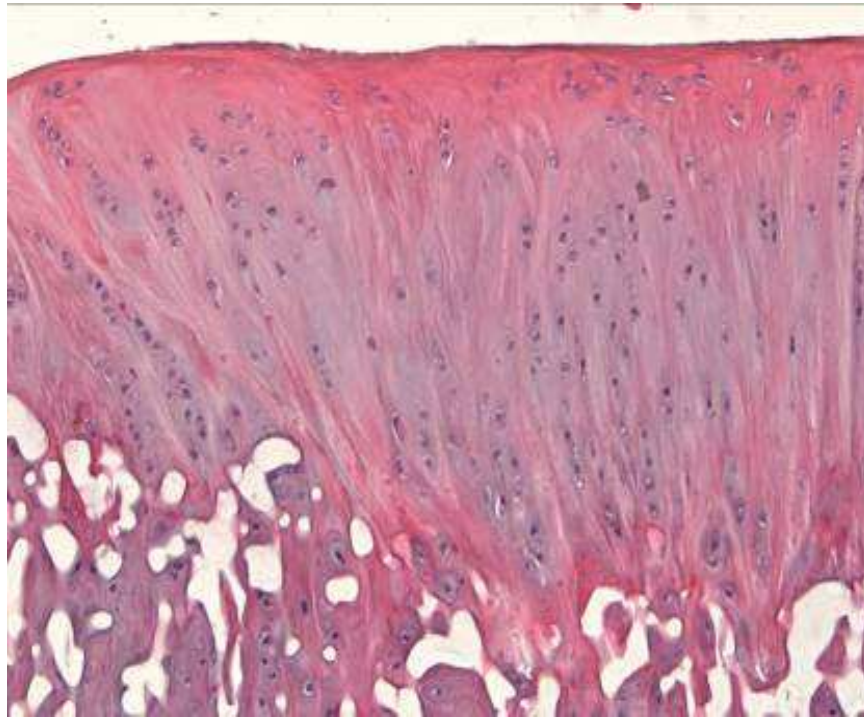


Figura 39: microscopía óptica correspondiente a la imagen ampliada de la zona (a) de la figura anterior. El aspecto histológico del tejido que cubre el implante es de cartílago hialino (tinción HE, aumentos originales 20x).

Así, en el plano superficial se identifica tejido cartilaginoso (Figura 39) y en las zonas laterales y en el plano profundo, se aprecia tejido óseo, sin signos de encapsulación ni rechazo en ningún punto (Figura 40). En algunas áreas de los bordes baso-laterales, se visualizan vasos que proceden del tejido óseo circundante acompañados de tejido de aspecto mesenquimal probablemente proveniente de los mismos vasos, que irían a regenerar la zona lesionada.

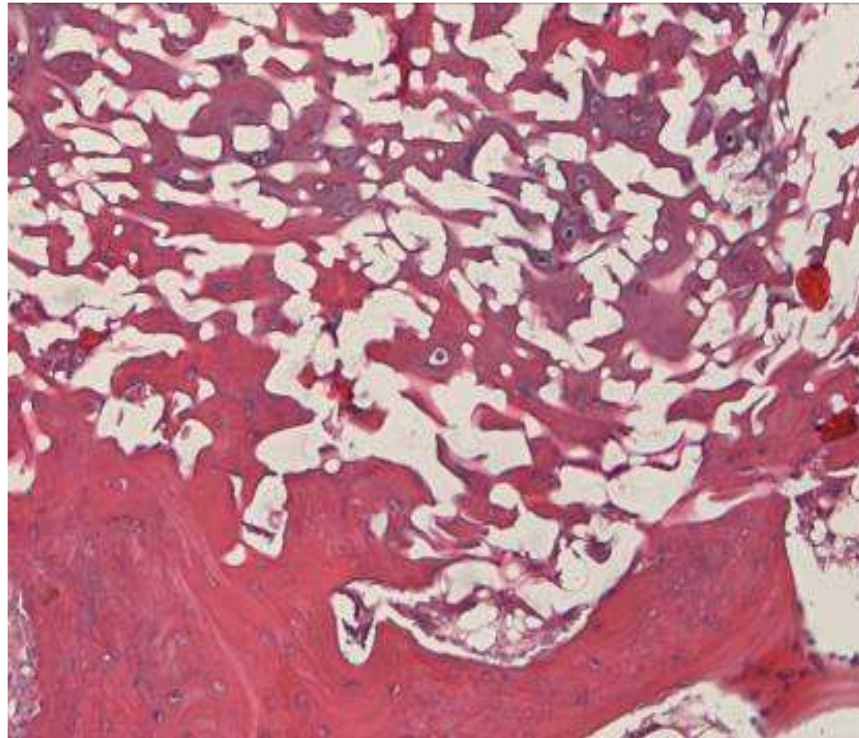


FIGURA 40: microscopía óptica correspondiente al área (b) de la figura 38. El tejido que rodea el implante en profundidad, es una neomatriz con características de tejido óseo (tinción HE, aumentos originales 40x).

1.2.2. SIN PRESIEMBRA DE CONDROCITOS

En ausencia de células presembradas, los discos de esta serie se localizan más profundos en el complejo osteoarticular que los discos con presiembra de condrocitos. La superficie articular se encuentra completamente regenerada, presentando un CH de apariencia normal, del que emerge una banda ancha de tejido cartilaginoso que

puede llegar a contactar con el disco subyacente (Figura 41).

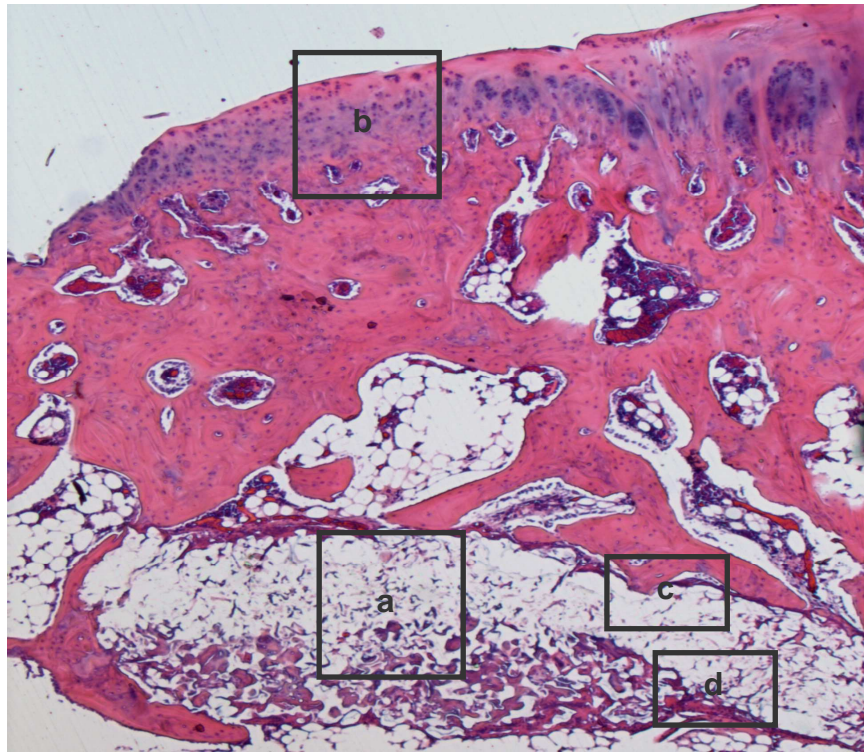


FIGURA 41: microscopía óptica de una muestra de la serie 2 sin presiembra de condrocitos teñida con HE (aumentos originales 5x). El disco implantado (área "a") se encuentra a cierta distancia de la superficie articular recubierta de CH (área "b"). El área (c) se sitúa en la zona de transición superior implante-tejido circundante, mientras que el área (d) lo hace en la zona inferior de la misma. Estas últimas áreas se muestran ampliadas en las figuras 42 y 43.

La neomatriz formada en el interior de los *scaffolds* es menos abundante que la de los discos presembrados con condrocitos y no está polarizada hacia la zona superficial y central, sino que es más abundante en la zona basal que en

el resto del disco. La mayor parte de esta matriz presenta características estructurales y tintoriales similares al tejido óseo con inmunoreactividad para la osteocalcina, aunque también observamos algunos islotes con características de tejido cartilaginoso (Figura 42). Al estar los discos situados a cierta profundidad respecto a la superficie, pueden incluso contactar con el tejido hematopoyético de predominio graso de la médula ósea.

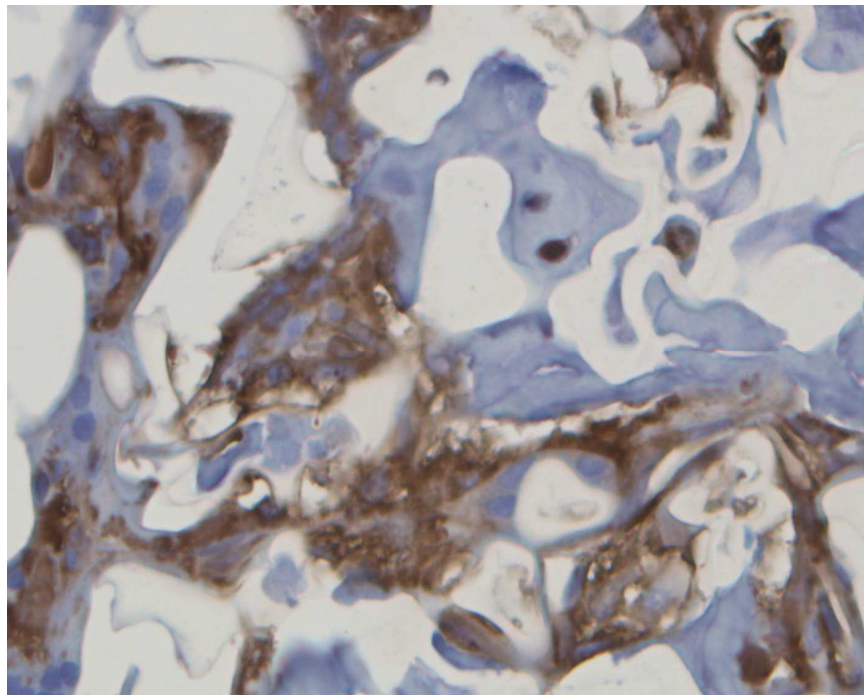


FIGURA 42: microscopía óptica de una muestra de la serie 2 sin presiembra de condrocitos teñida con técnica de inmunodetección para colágeno tipo II. Se trata una visión ampliada de la zona superficial del implante (área “c” de la figura 41), en la que se aprecia tejido de aspecto condral (colágeno tipo II, aumentos originales 60x).

Los implantes se encuentran mayoritariamente rodeados de tejido óseo, sin prácticamente zonas de continuidad con el tejido condral, salvo en algún caso en el que se aprecia un área de cartílago en el borde apical, en contacto con el cartílago de la superficie articular.

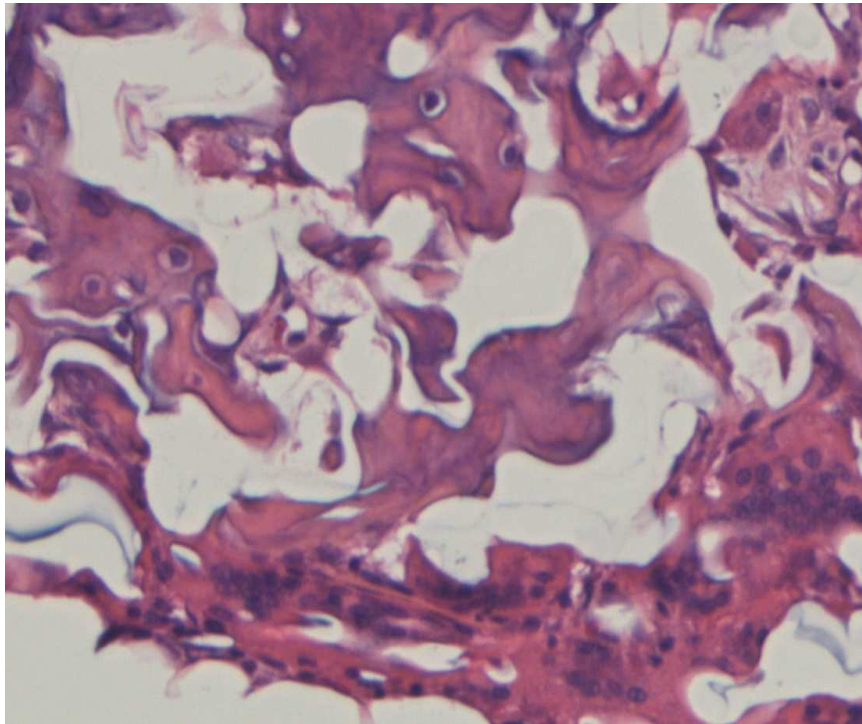


FIGURA 43: microscopía óptica ampliada del área de transición implante-tejido circundante en la zona basal (área "d" de la figura 41) (tinción HE, aumentos originales 60x). Se observa reacción fibrosa con presencia de macrófagos alrededor de extensas zonas de los discos, los cuales están mayoritariamente rodeados de tejido óseo.

La ausencia de contacto con zonas cartilaginosas probablemente conlleva la reacción fibrótica observada

alrededor de extensas áreas de estos soportes, con elementos macrofágicos (Figura 43). Estos datos de la microscopía óptica, nos permiten considerar que la integración de estos *scaffolds* con el tejido circundante no es del todo satisfactoria.

1.3. SERIE 3

Los biomateriales utilizados para la síntesis de los andamiajes de esta serie son el EA (50%) y el HEA (50%). Los implantes de esta serie son los de máximo contenido en HEA, lo que les confiere una gran hidrofilia. Esta característica conlleva por un lado la posibilidad de teñirse con los colorantes utilizados pero por otro lado, origina una respuesta biológica poco satisfactoria. Aunque la regeneración del CA en la superficie es, en general, bastante satisfactoria, la proliferación tisular en el interior de los discos es prácticamente nula. Además induce una marcada reacción fibrótica y de encapsulación a su alrededor, impidiendo la integración de los mismos en el complejo osteoarticular.

1.3.1. PRESEMBRADO DE CONDROCITOS

Los andamiajes se localizan bastante profundos respecto a la superficie articular, en la que se observa CH de características histológicas normales. En ocasiones, podemos apreciar una hendidura desde la superficie

articular en profundidad hasta las cercanías del *scaffold*, quedando por tanto interrumpida la continuidad de la superficie articular (Figura 44). Por debajo del cartílago superficial, existe una ancha banda de tejido óseo esponjoso en cuyo interior se alojan los discos implantados.

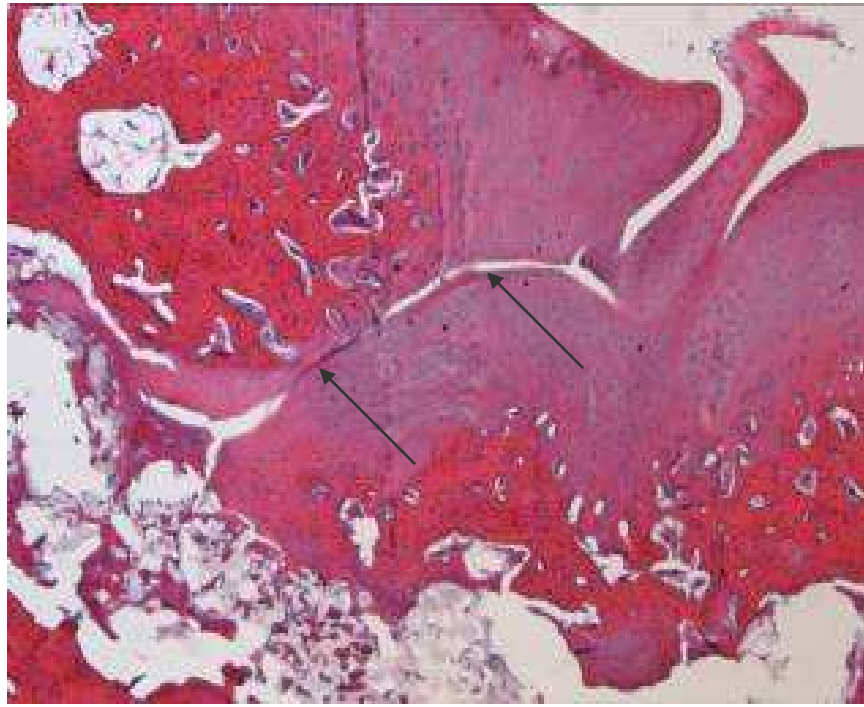


FIGURA 44: microscopía óptica de una muestra de la serie 3 con presiembra de condrocitos, en la que se aprecia una imagen lineal (flechas) que contacta con el disco implantado desde la superficie, dividiendo al superficie cartilaginosa y de tejido óseo circundante en dos áreas (tinción HE, aumentos originales 5x).

El neotejido formado en el interior de los soportes es muy escaso y sin signos de polarización. Las características morfológicas y tintoriales de esta neomatriz son difíciles de

valorar por su escasez. En las zonas donde este tejido es más abundante (en la periferia, en cercanía de los vasos), aparece un tejido similar al óseo.



FIGURA 45: microscopía óptica de una muestra de la serie 3 con presiembra de condrocitos. El área oval incluye el *scaffold* rodeado de una cápsula fibrosa, signo de falta de integración con el tejido circundante (tinción TM; aumentos originales 5x). El detalle de la zona (a) se muestra en la figura 46.

Alrededor de los discos implantados, se producen extensas áreas de fibrosis que microscópicamente confieren a la muestra un aspecto de encapsulación (Figuras 45 y 46).

Así, en este subgrupo, son muy escasas las zonas de integración entre el implante y el lecho de la lesión.



FIGURA 46: imagen ampliada del área (a) de la figura 45 correspondiente a la parte profunda del implante, en la que llama la atención la presencia de una cápsula fibrosa que lo rodea y osteoclastos (flechas) alrededor de zonas con ausencia de anidación celular (tinción HE, aumentos originales 40x).

1.3.2. SIN PRESIEMBRA DE CONDROCITOS

Los discos implantados se encuentran a cierta profundidad de la superficie articular. En la superficie libre, se constata CH de características normales, que en ocasiones, se invagina hacia el implante subyacente

(Figuras 47 y 48). A su vez, en superficie presenta una zona central de tejido fibroso de aspecto similar al tejido sinovial. En profundidad, los andamiajes quedan rodeados de una ancha banda de tejido óseo.

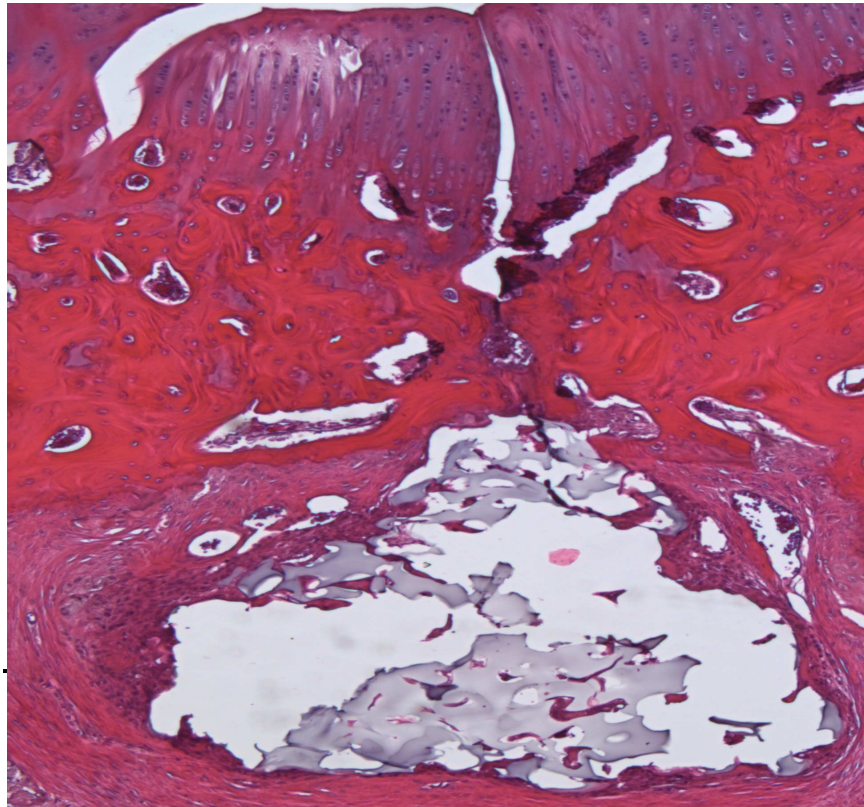


FIGURA 47: muestra de la serie 3 sin presiembra de condrocitos. El disco se encuentra a cierta profundidad completamente rodeado de abundante tejido fibroso, que lo encapsula. El implante queda cubierto de CH (tinción HE, aumentos originales 5x).

La observación a microscopía óptica de estas muestras, permite comprobar que la matriz neoformada en

el interior de los *scaffolds* es prácticamente inexistente. Además el escaso tejido formado es fibroso.

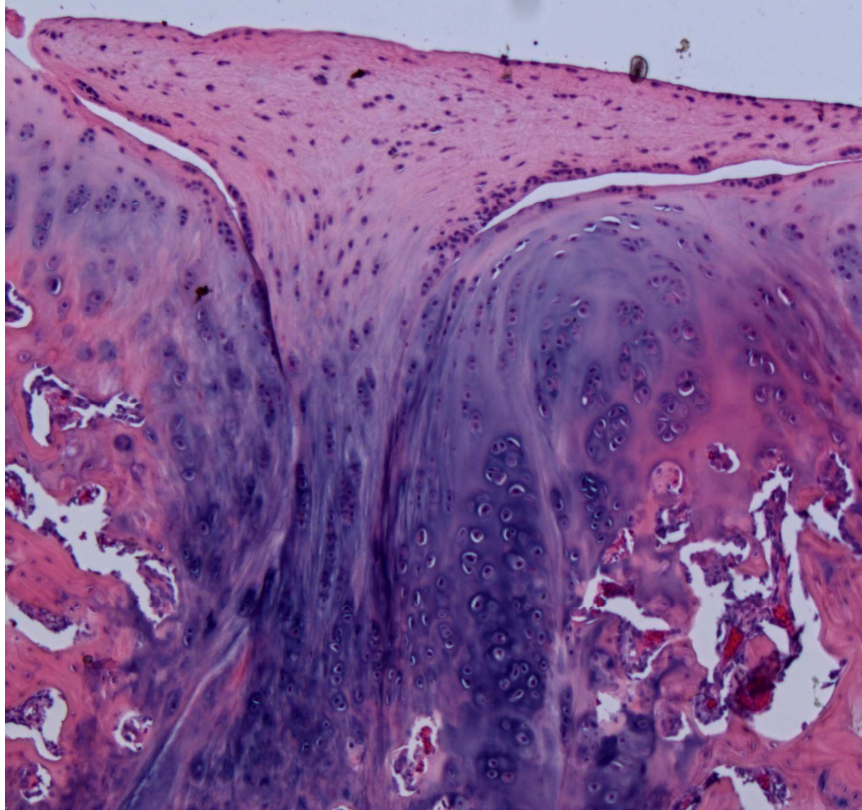


FIGURA 48: microscopía óptica de una muestra de la serie 3 sin presiembra de condrocitos. El cartílago hialino que recubre la superficie articular, presenta en ocasiones discontinuidades o zonas fibrosas de morfología similar al tejido sinovial (tinción de HE, aumentos originales 10x).

Por su parte, la periferia de los discos queda completamente aislada por tejido fibroso conteniendo infiltrados mononucleares y una rica vascularización (Figura 49). Por lo tanto, podemos concluir que los soportes de este

subgrupo presentan una integración casi nula con el tejido circundante.

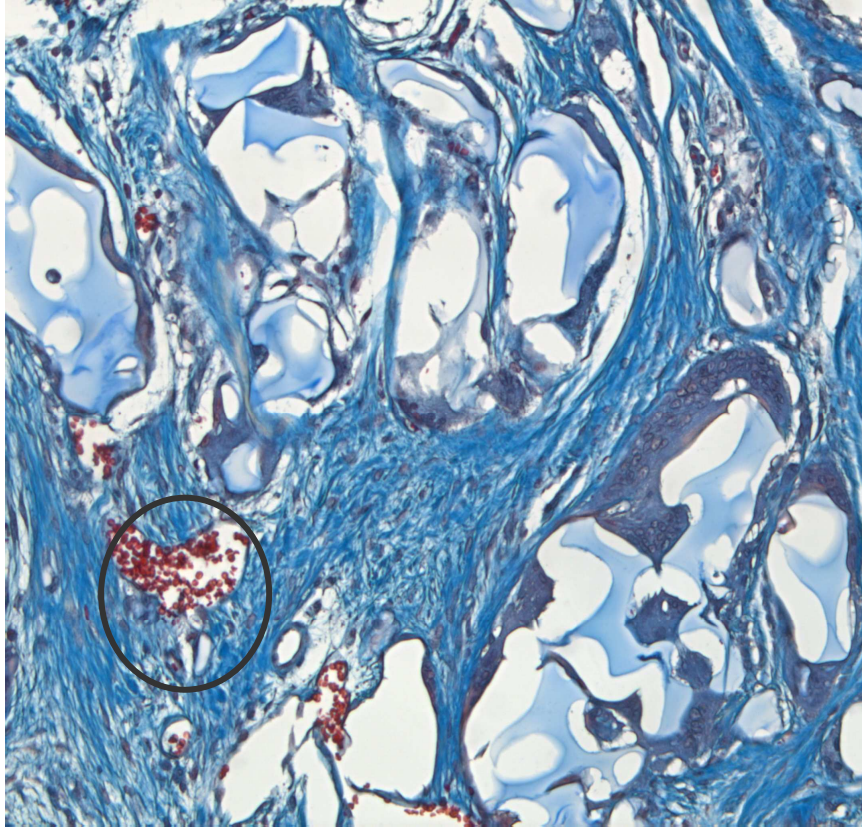


FIGURA 49: imagen ampliada de la zona central del implante (serie 3 sin presiembra de condrocitos), en la que la neomatrix formada es prácticamente inexistente. Las escasas áreas de tejido que aparecen tienen un aspecto fibrótico, con infiltrados mononucleares y una rica vascularización (área en el interior del círculo) (tinción TM, aumentos originales 40x).

1.4. SERIE 4

La respuesta biológica del tejido receptor a los implantes de esta serie (compuestos en su totalidad por

PEA) parece ser más lenta que en las otras series estudiadas, aunque es bastante satisfactoria. Por un lado, la superficie articular no siempre está completamente cubierta de neocartílago, incluso con presencia de alguna zona de fibrosis. Sin embargo, la proliferación celular en el interior de los andamiajes es muy buena, incluso en los que no se han presembrado con condrocitos. La integración al complejo osteoarticular es desigual. Cuando las áreas vecinas son condrales, se dan criterios de integración satisfactoria; sin embargo, si estas zonas son óseas aparecen interfases de tejido fibroso.

1.4.1. PRESEMBRADO DE CONDROCITOS

Los *scaffolds* se hallan en cercanía de la superficie articular e incluso en contacto directo con ella, por lo que parece que hay un retardo en la respuesta regenerativa (Figura 50). En las zonas que aparecen cubiertas de CH, éste presenta características morfológicas normales, continuando con el cartílago circundante con criterios de integración muy satisfactoria (Figura 51). Los discos implantados quedan rodeados de tejido osteoarticular, de manera que el CA envuelve aproximadamente la mitad superior del disco, mientras que la mitad inferior y la base de éste se ven circundados por tejido óseo esponjoso.

Todo el espesor de los implantes está ocupado por un abundante tejido neoforado, siendo más cuantioso en la zona central y polarizado hacia la superficie, donde presenta un aspecto cartilaginoso. En las zonas basal y lateral, la proliferación del tejido es menos abundante, aunque con características de hueso y en cercanía de vasos.

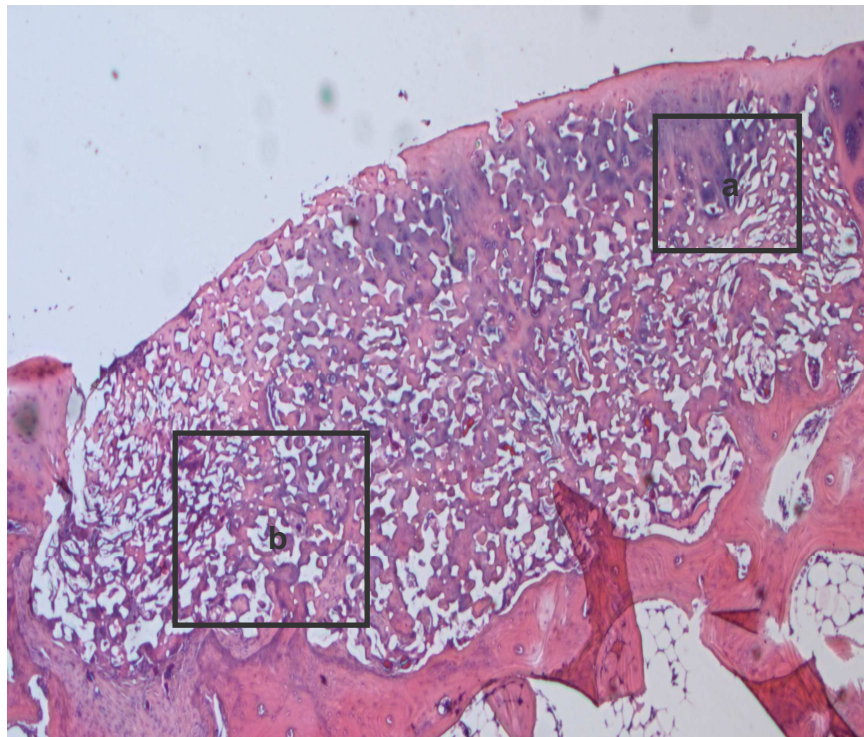


FIGURA 50: microscopía óptica de una muestra de la serie 4 con presiembra de condrocitos, en la que se aprecia el *scaffold* en superficie sin cobertura de CH pero con una abundante anidación celular (tinción HE, aumentos originales 5x). Las áreas (a) y (b) aparecen ampliadas en las figuras 51 y 52, respectivamente.

En general, existe una buena integración del material implantado en el complejo osteoarticular: el cartílago en superficie presenta continuidad con el CA vecino, al igual que el tejido óseo lo hace con los bordes laterales y profundo del implante.

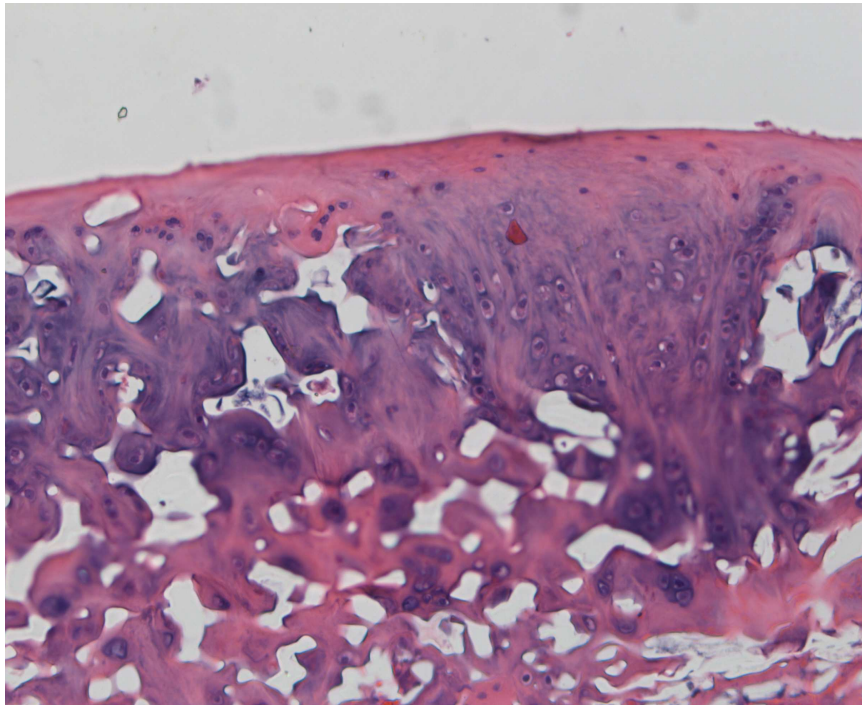


Figura 51: microscopía óptica que corresponde al área (a) de la figura 50, en la que se observan zonas con neomatriz hialina, que parece penetrar en la parte superior del andamiaje (tinción HE, aumentos originales 20x).

A pesar de ello, la transición tejido implantado-lecho receptor es heterogénea ya que, coincidiendo con zonas en las que la neoformación tisular es menor, se observa una peor integración con el entorno (presencia de áreas de

fibrosis ricas en macrófagos junto con vasos que aportan células mesenquimales) (Figura 52).

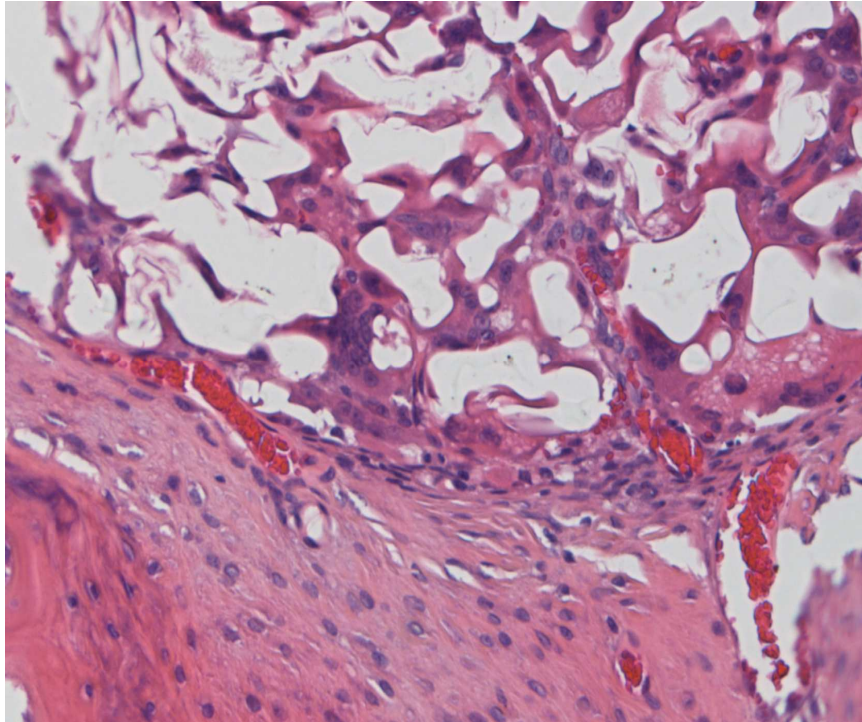


FIGURA 52: microscopía óptica que corresponde al área (b) de la figura 50. En la transición basal implante-lecho receptor, identificamos clastos y tejido fibrótico junto con vasos (tinción HE, aumentos originales 60x).

1.4.2. SIN PRESIEMBRA DE CONDROCITOS

Los implantes se sitúan cercanos a la superficie articular; su superficie queda en ocasiones completamente tapizada por neocartílago hialino, mientras que, en otros casos, prolifera tejido fibroso parecido al tejido sinovial, con un tapizado parcial de la superficie. Lateralmente, los discos contactan en su mitad superior con el CA, mientras que su

mitad inferior y la zona basal lo hacen con tejido óseo esponjoso (Figura 53).

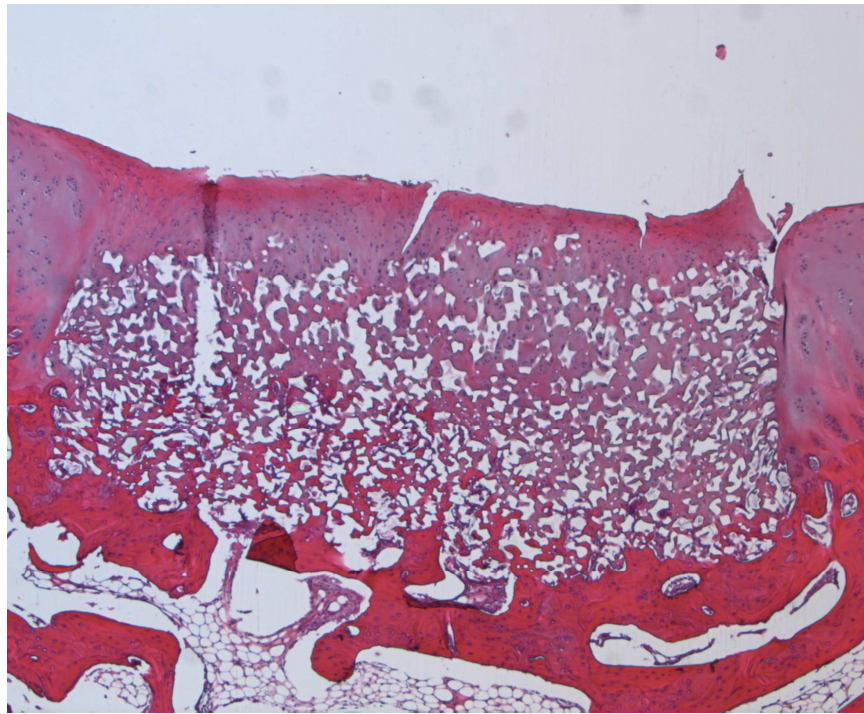


Figura 53: microscopía óptica de una muestra de la serie 4 sin presiembra de condrocitos. El disco implantado está cercano a la superficie articular, cubierto de neocartílago de aspecto hialino (tinción HE, aumentos originales 5x).

La respuesta regenerativa en el interior de los *scaffolds* se considera buena, aunque menor que en los discos de esta serie con presiembra de condrocitos. El tejido regenerado ocupa todo el disco. Presentando una alta coincidencia con el tejido que lo rodea (Figura 54), el neotejido es de aspecto cartilaginoso mayoritariamente en la mitad superior (colágeno tipo II positivo) y de aspecto óseo

(osteocalcina positivo) en la mitad inferior, junto con vasos y elementos macrofágicos.

La integración del andamiaje con su entorno osteoarticular, se considera irregular: alternan zonas tanto cartilaginosas como óseas sin ningún signo de encapsulación fibrótica, con zonas con menor proliferación de neot Tejido y con fibrosis acompañante (sobre todo en la transición lateral y basal) (Figura 55).

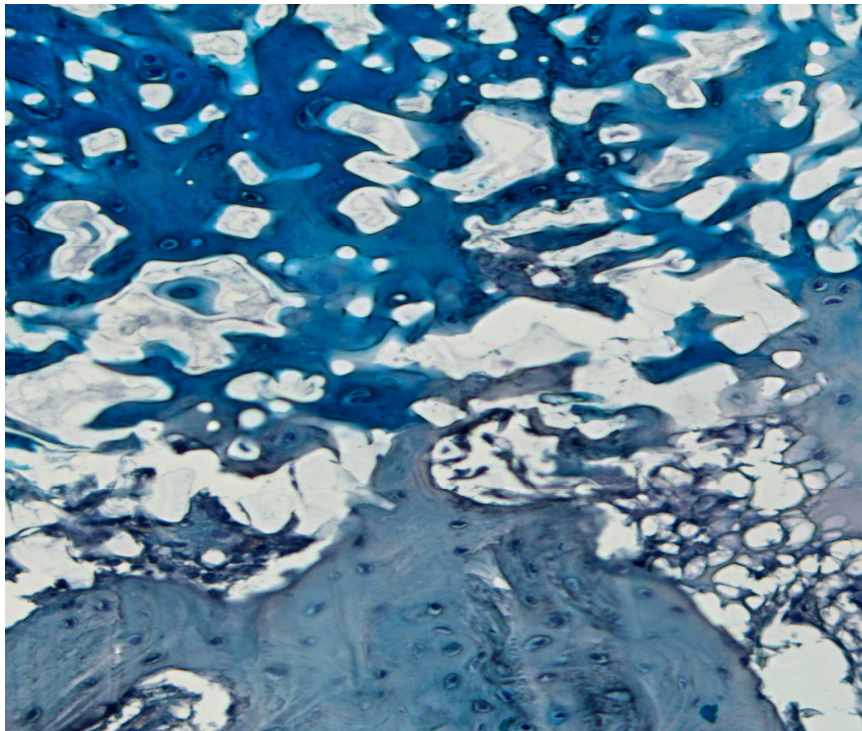


Figura 54: microscopía óptica de la serie 4 sin presiembra de condrocitos, que representa la zona de transición entre la profundidad del *scaffold* y el lecho de la lesión creada. El andamiaje aparece anidado por células mesenquimales que se han diferenciado y con morfología que coincide en alto grado con el tejido que las rodea (tinción Azul Alcian, aumentos originales 40x).

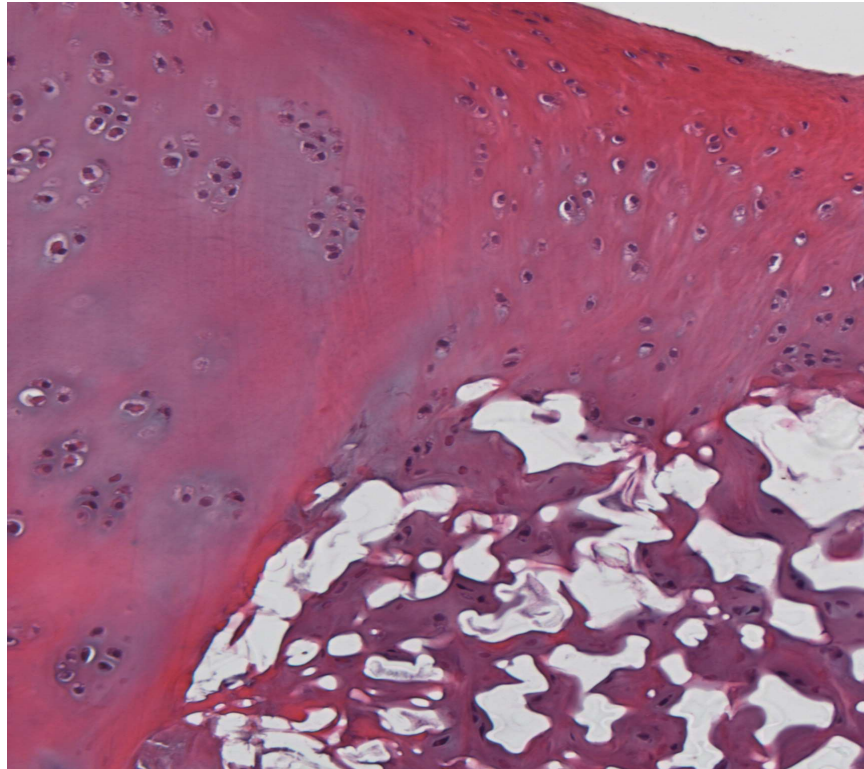


FIGURA 55: muestra de la serie 4 sin presiembra de condrocitos. En la transición en superficie entre el implante y el tejido cartilaginoso circundante, no existen signos de encapsulación ni reacción macrofágica (tinción HE, aumentos originales 40x).

2. CONSIDERACIONES GENERALES

La mejor respuesta biológica entre los implantes utilizados se produce en los animales de las series 2 (90% EA y 10% HEA) y 4 (100% PEA). En estas dos series, no se aprecian prácticamente respuestas histológicas de encapsulación o fibrosis alrededor del implante. La integración y proliferación tanto del tejido cartilaginoso en

superficie como del tejido óseo esponjoso en los límites laterales y profundo, permite deducir que los *scaffolds* utilizados en estas series, son capaces de estimular el crecimiento de un tejido u otro (cartilaginoso u óseo) dependiendo del que encuentran en la zona receptora. Estos criterios favorables de proliferación e integración de los tejidos respecto a los andamiajes utilizados, son aún más evidentes en las sub-series en las que se ha realizado el presembrado de condrocitos.

En este sentido, entre las dos sub-series referidas, se dan pequeñas diferencias desde el punto de vista histológico, que hacen que la mejor respuesta sea la del grupo con presembrado de condrocitos de la serie 2. En ésta, además de existir una continuidad casi perfecta entre tejidos (cartílago con cartílago y hueso esponjoso con hueso esponjoso), la estructura histológica y la disposición celular obtenidas resultan prácticamente iguales a las del tejido receptor. En el grupo de animales de la serie 4 en los que se han utilizado *scaffolds* con presembrado de condrocitos, detectamos una integración satisfactoria aunque menor y más heterogénea.

3. EVOLUCIÓN POSTQUIRÚRGICA E INCIDENCIAS

No hemos tenido ningún caso de infección de la herida quirúrgica ni en el post-operatorio inmediato, ni en la

evolución a medio-largo plazo. Nos ha llamado la atención especialmente la cicatrización satisfactoria de la piel (Figura 56) y el crecimiento del pelaje *ad integrum* en la zona intervenida: en todos los casos, al mes de la operación, prácticamente no se aprecian signos de la cirugía previa (Figura 57). Aunque se pueden producir lesiones por mordedura del propio animal en la zona de la operación, en nuestro trabajo no se ha dado ningún caso.

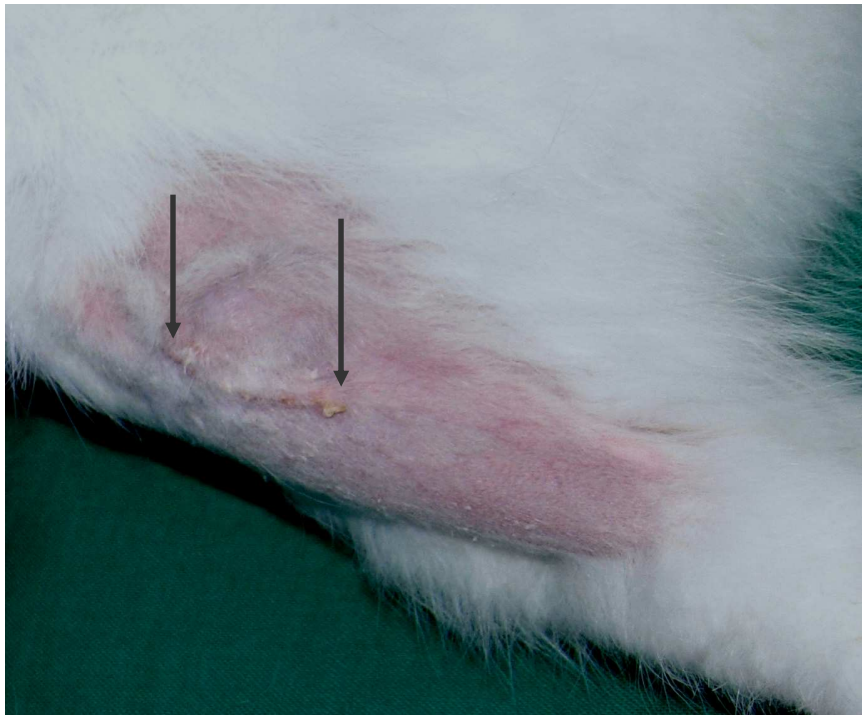


FIGURA 56: aspecto de la zona intervenida a los diez días de la cirugía. Las flechas marcan los límites craneal y caudal de la cicatriz quirúrgica (se trata de un animal de la serie 2).



FIGURA 57: aspecto de la zona intervenida al mes de la cirugía. El pelaje es de características normales y recubre, prácticamente en su totalidad la piel de la rodilla operada (animal de la serie 2).

En lo que se refiere a la recuperación funcional, la movilidad general del animal y en particular de la extremidad intervenida, destaca un patrón de marcha normal. Asimismo, los animales logran realizar una extensión activa de la rodilla intervenida para ponerse en bipedestación a las tres semanas de evolución (Figura 58).

Durante el periodo evolutivo de los animales intervenidos, se produjeron dos *exitus*. El primero fue el de un conejo de la serie I que falleció a los seis días de la cirugía, a causa de un íleo paralítico. El segundo animal, de la serie IV, murió al mes y medio de la intervención por un

cuadro de diarrea aguda. En ambos casos, el aspecto macroscópico del implante en la rodilla ha sido muy satisfactorio. El *scaffold* permanece en su posición inicial y no se observan signos degenerativos articulares alrededor del mismo. Con motivo de estos *exitus*, se intervinieron dos nuevos animales para completar numéricamente las series motivo de estudio.



Figura 58: conejo de la serie 3 a las tres semanas de la intervención.

Discusión

1. REPARACIÓN DE LAS LESIONES CARTILAGINOSAS MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR CON *SCAFFOLDS*

Para definir el proceso de curación de las lesiones del CA, se emplean en muchos casos indistintamente los términos “reparación” y “regeneración”. Sin embargo, existen diferencias conceptuales entre ambos. La reparación es la sustitución del tejido lesionado o perdido por un nuevo tejido sin la estructura, función y composición del original. La regeneración hace alusión a la formación de un nuevo tejido que reproduce la estructura, función y composición del inicial²⁵.

Es conocido que el potencial intrínseco de reparación del CA es limitado (ver “Introducción”). La regeneración de las lesiones que afectan a las capas superficiales del mismo (de espesor parcial), depende en gran medida de la capacidad de mitosis de los condrocitos. Si tenemos en cuenta que éstos predominan en las capas del CA más próximas al hueso subcondral, las lesiones que no afecten a dichas capas, aún tienen menor respuesta regenerativa. En cambio, las lesiones que afectan a todas las capas del CA (de espesor completo), requieren de la llegada de células madre procedentes del hueso esponjoso subcondral para su reparación. Además, en este segundo grupo de lesiones, el tejido de reparación resultante es, en la mayoría de los

casos, fibroso o fibrocartilaginoso y, por lo tanto, biomecánicamente inadecuado¹⁵¹.

Se han propuesto numerosas técnicas quirúrgicas con el objetivo de mejorar la estructura histológica del tejido reparativo que genera el propio CA ante una lesión²⁵. Las técnicas de estímulo osteocondral (perforaciones del hueso subcondral, artroplastia de abrasión y microfracturas) son las primeras que se desarrollan para estimular la formación de una nueva superficie articular, y probablemente las más utilizadas en la actualidad^{213,24,220,113,243,244,297}. En las regiones con defectos condrales de espesor completo o con lesiones degenerativas del CA con exposición del hueso subcondral, la penetración de este último lesiona los vasos subcondrales, lo que conlleva la formación de un coágulo de fibrina en la superficie ósea^{24,195,285}. Si ésta no es sometida a cargas mecánicas excesivas, CMMs indiferenciadas migran hacia el coágulo, proliferando y diferenciándose hacia células con las características morfológicas de los condrocitos²³⁴. En la mayoría de los casos, el tejido reparativo que se genera en la superficie ósea perforada es fibrocartilaginoso^{64,121,249}. Los estudios experimentales de Metsäranta¹⁷² demuestran que en el tejido reparativo de las lesiones cartilaginosas de espesor completo se distinguen dos áreas. En la zona más profunda del defecto condral, se encuentran células procedentes del hueso subcondral con niveles altos de colágeno tipo I y mRNA de la osteonectina,

produciendo importantes cantidades de sustancia osteoide. En superficie, se detecta el coágulo de fibrina diferenciándose hacia un mesénquima indiferenciado con alto contenido en colágeno tipo III. Por lo tanto, el tejido reparativo se convierte en fibrocartilaginoso, con escaso número de células sintetizando colágeno tipo II y por ende sin un fenotipo de CH. Sin embargo, la extensión del área de tejido cartilaginoso formada y la calidad del mismo, varía considerablemente entre los defectos condrales, aunque la primera no suele superar el 75% del volumen total de la lesión cartilaginosa²³.

Los resultados clínicos de las técnicas de estímulo osteocondral son variables, debido a la naturaleza impredecible del tejido de reparación que se forma, el tamaño de la lesión, la edad y el nivel de actividad de cada paciente. Johnson obtiene tejido fibrocartilaginoso de reparación viable a más de seis años tras condroplastias de abrasión. Con ello, consigue una mejoría clínica del paciente suficiente para retrasar varios años una artroplastia total de rodilla¹¹². Para Steadman, los pacientes tratados mediante microfracturas en lesiones cartilaginosas de rodilla, menores de cuarenta y cinco años, manifiestan una mejoría estadísticamente significativa respecto al dolor y a la funcionalidad tras la operación²⁴⁴. Según Williams, con la utilización de microfracturas en las lesiones cartilaginosas de rodilla grado III-IV de Outerbridge, se consiguen mejorías

significativas del dolor durante el año posterior a la intervención. Precisa que en muchos casos el nivel de actividad del paciente disminuye respecto al anterior a la cirugía, sobre todo en atletas de élite²⁸⁵. Millett considera que el resultado clínico de las microfracturas en las lesiones cartilaginosas del hombro, depende del tamaño de las mismas, siendo mejores los resultados en los casos de lesiones de pequeño tamaño¹⁷⁵.

Con la utilización de las técnicas de reparación cartilaginosa, se pretende obtener CH en las áreas con defectos cartilaginosos, y que éste se integre con el CA indemne de alrededor para formar una superficie mecánicamente funcional¹⁵⁵. Estos métodos no dependen de la llegada de CMMs al lecho de la lesión y, en la mayoría de los casos, logran obtener tejido de reparación semejante al CH o *hyaline-like*. Las técnicas de injertos osteocondrales con tejidos autogénicos o alogénicos son de utilidad para el tratamiento de lesiones condrales u osteocondrales amplias. La utilización de aloinjertos evita fundamentalmente la morbilidad en la zona donante de la articulación. En términos de muerte celular y estabilidad mecánica del implante, los injertos frescos (autoinjertos) presentan ventajas respecto a los congelados (aloinjertos). Los primeros se utilizan fundamentalmente en lesiones de pequeño tamaño, como en la osteocondritis disecante y las lesiones post-traumáticas, mientras que los segundos están

más indicados en rellenos de grandes defectos condrales o en patología articular tumoral^{255,217,88}. Sin embargo, estos métodos de injertos osteocondrales, presentan limitaciones como la dificultad para utilizarlos artroscópicamente en zonas poco accesibles de las articulaciones (meseta tibial posterior y cóndilos femorales posteriores de la rodilla, por ejemplo)²⁵⁰.

Por otro lado, las técnicas de injerto de tejidos blandos (pericondrio o periostio) pretenden aprovechar el potencial condrogénico de sus células mesenquimales para obtener un tejido cartilaginoso reparativo. Este tejido es histológicamente más parecido al CH que se obtiene con los procedimientos de estímulo del hueso subcondral, sin que existan diferencias entre el neotejido resultante del implante de pericondrio o de periostio (cartílago *hyaline-like*)^{150,22}. Desde el punto de vista clínico, los mejores resultados con la aplicación de estos procedimientos, se obtienen cuando no existen inestabilidades articulares ni malas alineaciones de las extremidades, concomitantes con las lesiones condrales^{15,22}. Por contra, se trata de cirugías que no son técnicamente sencillas y a las que se asocian otros inconvenientes como la cantidad limitada de tejido para implantar, la posibilidad de calcificación de los injertos (fundamentalmente cuando utilizamos periostio), y el potencial artrógeno de las suturas utilizadas para unirlos al CA circundante a la lesión^{177,190,100}. Algunos autores como

Seradge, consideran que el éxito de estos injertos también depende de la edad de los pacientes. Así, en los pacientes más jóvenes las células indiferenciadas del implante y los condrocitos poseen mayor capacidad de generar una nueva superficie cartilaginosa²³².

El ACI se ha utilizado desde 1987, con resultados clínicos e histológicos satisfactorios. En la mayoría de los estudios experimentales y clínicos con grandes series en los que se ha recurrido a esta técnica, el tejido que se obtiene en el lugar de la lesión condral es CH o *hyaline-like*^{39,178,20,146,161}. Teniendo en cuenta que una de las indicaciones para el empleo del ACI son las lesiones condrales de tamaño superior a 2 cm²¹⁷⁸, entre las ventajas de esta técnica, destaca la posibilidad de obtener los condrocitos necesarios según la extensión del defecto condral a rellenar. Estas células condrales son viables en la zona como mínimo cuatro semanas después de su aplicación, jugando un papel fundamental en la regeneración cartilaginosa¹⁷⁶. Para lograr contener los condrocitos dentro del defecto cartilaginoso, es necesario sellar la superficie del defecto con fragmentos de tejido blando, siendo el periostio el que se utiliza con mayor asiduidad. Este gesto técnico obliga en algunos casos a llevar a cabo una cirugía abierta, con la morbilidad que ello implica^{178,158}. A esta desventaja, debemos de añadir la posibilidad de una hipertrofia de la cobertura perióstica^{84,248},

la distribución irregular de los condrocitos implantados en el lecho lesional a causa de la fuerza de la gravedad²³⁶, la fuga de los condrocitos implantados por la zona de unión periostio-CA no dañado¹⁰³ o la artrofibrosis secundaria¹⁶¹. Otro de los inconvenientes en relación con esta técnica es el hecho de que los condrocitos se desdiferencian rápidamente durante su proliferación en el cultivo. Se trata de un proceso durante el cual los condrocitos cambian desde su apariencia redondeada hacia un aspecto celular de contornos irregulares (semejante a los fibroblastos o bien a las células mesenquimales precondrogénicas). En consecuencia, pierden su capacidad para expresar la MEC específica del CA compuesta por colágeno tipo II y agreganos, para pasar a producir MEC específica del tejido fibroblástico y por lo tanto, abundante en colágeno tipo I^{13,125,92}. En este sentido, para mantener el fenotipo de los condrocitos durante la fase de expansión celular, se han utilizado diferentes factores de crecimiento como el TGF- β , las BMPs, la activina A, la proteína osteogénica 1, el factor de crecimiento fibroblástico básico o el IGF-1^{152,226,189,78}.

Diferentes estudios han investigado las propiedades condrogénicas tanto de las BMPs como de las CDMPs. La homeostasis del CA es fundamental para el mantenimiento de las funciones de las articulaciones. Para alcanzarla, debe producirse un equilibrio entre los procesos anabólicos mediados por sustancias como las BMPs o las CDMPs y los

catabólicos, en los que intervienen citoquinas como la IL-1, la IL-17 y el factor de necrosis tumoral α ²¹⁶. Las BMPs son factores de crecimiento necesarios para la formación de cartílago durante el desarrollo del esqueleto en el embrión²⁶⁰. A su vez algunas de ellas, como la BMP-4, pueden inducir la rediferenciación o la desdiferenciación de los condrocitos tanto *in vitro* como *in vivo*, promoviendo la reparación del CA¹⁴⁵. Al igual que las BMPs, las CDMPs (también conocidas como factores de crecimiento y diferenciación o GDF) pertenecen a la superfamilia de las TGF- β , y pueden igualmente estimular la diferenciación de las CMMs a condrocitos^{5,10}. Li demuestra en sus estudios que tanto la BMP-2 como la CDMP-2 aisladas o combinadas, estimulan la síntesis de PTGs por los condrocitos¹⁴¹.

Aunque la aplicación directa de estos factores de crecimiento conlleva un efecto beneficioso en el proceso de curación de las lesiones cartilaginosas *in vivo*, su aplicación clínica queda limitada por el problema de su disponibilidad: teniendo en cuenta la complejidad de la regeneración del CA, se requieren aportes continuos de sustancias estimulantes para alcanzar los niveles óptimos de formación de cartílago con características histológicas semejantes al CH¹⁶³. Se han establecido diferentes sistemas, como por ejemplo las matrices transportadoras, para asegurar el aporte de factores de crecimiento estimulantes de la

condrogénesis en el lugar de la lesión condral¹⁶². Sin embargo, su efectividad y las posibilidades de aplicación en la clínica han sido limitadas. Por ello, se plantea la terapia génica como la única alternativa actual para el mantenimiento de los niveles necesarios de factores de crecimiento en el lecho de la lesión^{53,144}.

Ninguno de los procedimientos quirúrgicos para el tratamiento de los defectos cartilaginosos u osteocartilaginosos revisados, ha demostrado una superioridad de sus resultados histológicos y clínicos, respecto a los alternativos.

Sin embargo, la aplicación de la ingeniería tisular al tratamiento de las lesiones cartilaginosas puede resolver cada uno de los inconvenientes atribuidos a las técnicas analizadas anteriormente. La IT se define como la aplicación de la ingeniería y de las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o incrementen la función de un tejido. Aplicada al CA, podemos crear un molde tridimensional con la forma y tamaños deseados, compuesto de biomateriales reabsorbibles, que permita transportar en su interior condrocitos al igual que sustancias estimuladoras de la condrogénesis. A su vez, debemos de asegurar la estabilidad y durabilidad del implante durante el tiempo suficiente para que se produzca una regeneración cartilaginosa, con las características del CH, en la zona del

defecto condral. Para que sean aplicables en IT del CA, la arquitectura de estos moldes debe de imitar al máximo al propio tejido cartilaginoso y permitir la anidación, la adhesión, la proliferación y la diferenciación de los condrocitos. Además, con el objetivo de crear el entorno idóneo para el crecimiento tanto de neotejido cartilaginoso como de neotejido óseo, se sintetizan los denominados moldes bifásicos. De esta manera, los condrocitos serían atraídos hacia la porción cartilaginosa del molde, mientras que las células osteogénicas lo harían hacia la fase ósea del mismo, diferenciándose hacia hueso trabecular²⁶¹.

Se le atribuyen múltiples ventajas al empleo de *scaffolds* en la regeneración cartilaginosa, como por ejemplo: se trata de una técnica menos invasiva ya que no requiere la utilización de injertos de tejidos blandos como el periostio; la distribución de los condrocitos en su interior es homogénea a la vez que se mantiene el fenotipo condrocítico¹⁰³; el propio implante ejerce la función de barrera ante una posible invasión del injerto por fibroblastos, lo que generaría un tejido fibroso de reparación⁶¹; por último, una vez cumplida su misión, los biomateriales que lo componen desaparecen y persiste únicamente el neotejido¹⁵¹. Además, la mayoría de las técnicas de IT con andamiajes aplicadas al CA, pueden realizarse sin necesidad de utilizar un sellado del defecto con membranas o periostio, e incluso, mediante cirugía artroscópica¹⁰³.

2. BIOMATERIALES UTILIZADOS EN INGENIERÍA TISULAR DEL CARTÍLAGO

Se han utilizado diversos materiales para la síntesis de los *scaffolds* y su posterior aplicación en el tratamiento de los defectos cartilaginosos y osteocartilaginosos. Entre estos distinguimos diferentes grupos: los polímeros biológicos entre los que destacan el colágeno, el hialuronan, la fibrina, el alginato o el quitosano; los fosfatos cálcicos como la hidroxiapatita; los polímeros sintéticos como el PLA, el PGA, la policaprolactona (PCL) o el ácido polivinílico (PVA); y otras sustancias menos utilizadas en el tratamiento de las lesiones del CA, como la matriz ósea desmineralizada o los cristales bioactivos¹⁵³.

En este sentido, numerosos autores proponen emplear el colágeno^{271,229,73,156,67,296,241,36,203,129,299} puesto que se trata de uno de los componentes más abundantes de la MEC de los tejidos conjuntivos, a los que les otorga fuerza y estabilidad. Es una sustancia que se presenta como gel, membrana, esponja o espuma. Pulkkinen realiza estudios *in vitro* con colágeno tipo II recombinante y concluye que durante su cultivo, el número de condrocitos y la cantidad de MEC y de GAGs aumenta durante las cuatro primeras semanas, mientras que los agreganos y el colágeno tipo II, lo hace únicamente durante los siete primeros días²⁰⁸. Willers utiliza soportes de colágeno tipos I

y III presembrados con condrocitos (técnica MACI desarrollada en la “Introducción”) en un modelo experimental con conejos. A la sexta semana del implante, el defecto osteocondral contiene un tejido con arquitectura semejante al CA. A las doce semanas, el tejido regenerativo se mantiene aunque es más fino y contiene menos PTGs. El mismo autor demuestra que el neotejido obtenido no depende de la densidad celular del injerto²⁸³.

En otros estudios se utiliza el ácido hialurónico como material para la síntesis de andamiajes^{212,76,239,197186,77,149,114}. El AH forma parte de la composición de todos los tipos de cartílagos. Su empleo se basa en que este polisacárido natural es el componente más abundante de la MEC del CA. Al ejercer un papel fundamental en la homeostasis del CA, esta molécula ha demostrado ser ideal para su aplicación en la ingeniería tisular del CA^{40,159,254}. Se le atribuye un alto grado de biocompatibilidad, pudiendo ser utilizada para cultivo de condrocitos tridimensionalmente, reproduciendo las mismas condiciones que *in vivo*. Asimismo, suele reabsorberse completamente en unos tres meses desde su aplicación¹⁰³, sin generar respuesta inflamatoria. Desde el punto de vista histológico, diferentes estudios *in vivo* con modelos animales demuestran que utilizando *scaffolds* de AH sembrados con condrocitos se induce la formación de CA *hyaline-like* integrado con la superficie articular circundante a la lesión^{237,238}. Brun lleva a cabo un estudio

clínico mediante biopsias de las zonas de lesión cartilaginosa en la rodilla, en las que dieciocho meses antes se habían implantado soportes de AH presembrados con condrocitos. Establece diferencias significativas entre los hallazgos histológicos de los pacientes sintomáticos y asintomáticos. Así, en el primer grupo, el tejido de reparación es fundamentalmente FC o un tejido mixto FC-CH. En el segundo grupo, encuentra CH en la mayoría de los casos²¹.

Uno de los inconvenientes atribuibles a la aplicación de este polímero natural es la lentitud en generar tejido cartilaginoso en su interior. A pesar de ello, se demuestra que se logran obtener porcentajes importantes de neocartílago hialino en estos andamiajes macroporosos, a partir del año y medio de su colocación²¹. Por otra parte, para asegurar la estabilidad de estos implantes en el interior de la lesión cartilaginosa, algunos autores como Nehrer, consideran optativo colocar adhesivo de fibrina en los límites entre la matriz biosintética y el CA circundante¹⁸⁵.

Algunos investigadores sugieren la opción del adhesivo de fibrina como componente único del implante o en combinación con otros biomateriales^{19,267,198,96,16,49,55,227}. La fibrina es una proteína implicada en la formación de los coágulos sanguíneos. Este polímero natural se ha convertido en un biomaterial atractivo en la IT del CA, debido a sus altas biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Los resultados obtenidos en la literatura son dispares. Van Susante en su estudio en el que crea un defecto óseo en cabras que rellena posteriormente con adhesivo de fibrina, concluye que este biomaterial no ofrece un soporte suficientemente resistente para los condrocitos, poniendo en entredicho la estabilidad mecánica del mismo²⁶⁷. Asimismo, la fibrina exógena aplicada al CA, puede desencadenar una respuesta inmune atribuible sobre todo a la citotoxicidad celular, con la consiguiente degeneración del implante¹¹⁹. Sin embargo, Dragoo logra resultados esperanzadores incluyendo células madre derivadas del tejido adiposo en *scaffolds* de adhesivo de fibrina, que coloca en defectos óseos de la rodilla del conejo⁴⁹. También Peretti comunica buenos resultados utilizando un polímero de gel de adhesivo de fibrina presembrado con condrocitos en ratas y cerdos. La matriz cartilaginosa sintetizada en el lecho de la lesión condral, es capaz de rellenar por completo este último y formar puentes de unión con la superficie cartilaginosa de alrededor. Visna logra resultados clínicos satisfactorios al año del implante de andamiajes de fibrina presembrados con condrocitos en defectos condrales de rodillas²⁶⁸.

Otra de las alternativas propuestas para la elaboración de soportes macroporosos es el alginato^{81,91,92,266,36,126}. Se utiliza tanto en forma de *scaffold* como en forma de gel en el tratamiento de las lesiones cartilaginosas u osteocartilaginosas. En esta última

presentación, ha demostrado ser un buen transportador en el trasplante de condrocitos: al alto índice de proliferación de condrocitos que con esta sustancia se obtiene, se añade su capacidad de mantenimiento del fenotipo celular^{92,266}. Xu analiza el comportamiento *in vitro* de las CMM introducidas en *scaffolds* de gel de alginato y caracteriza la diferenciación a condrocitos de éstas y la expresión genética de las células condrales. Los picos más elevados de colágeno tipo II y tipo VI, de Sox 4 (factor de transcripción implicado en la síntesis de colágeno del CA) y de BMP-2 aparecen al sexto día. Entre el sexto y el décimo segundo día, halla los niveles más altos de expresión genética de colágeno tipo XI y Sox 9 (factor de transcripción igualmente implicado en la producción de colágeno tipo II y con un importante papel en la estabilidad fenotípica de los condrocitos). Entre los días doce y dieciocho, la expresión genética que predomina es la de matrilina 3 y condroadherina, entre otras. Finalmente, a la tercera semana encuentra predominio de la expresión genética de agrecanos; colágeno tipo II, tipo IX y tipo X; osteocalcina; fibromodulina; y fosfatasas alcalinas. Estos hallazgos permitirían modular, según los plazos, la síntesis del tejido cartilaginoso deseado²⁹¹.

La agarosa ofrece estas mismas posibilidades. Su utilización como transportador en las técnicas de cultivos de condrocitos, permite obtener un tejido de reparación en las

lesiones cartilaginosas rico en colágeno tipo II y en PTGs, y con una arquitectura celular comparable a la del CH²¹⁵.

Al igual que el alginato y la agarosa, el quitosano es un polisacárido natural de origen no humano. Se obtiene tanto mediante desacetilación alcalina de la quitina⁴ como procedente de la cáscara de algunos crustáceos¹²³. Ha sido ampliamente utilizado en IT y en medicina regenerativa, debido a su actividad biológica, a sus excelentes biocompatibilidad y biodegradabilidad, a sus propiedades antibacterianas intrínsecas y a su baja toxicidad^{45,33}. Aunque los *scaffolds* de quitosano se han utilizado en la IT del hueso^{231,165}, de los nervios periféricos¹⁰¹ o del hígado¹¹⁰, su empleo en la ingeniería del tejido cartilaginoso (puesto que es muy similar a los GAGs del CA) es cada vez más frecuente, obteniéndose cartílago maduro a las ocho semanas de su implantación en lesiones condrales en ratas¹⁰⁷. En su forma de microesferas ha demostrado una función importante en la distribución y liberación de factores de crecimiento, como el TGF- β 1^{124,27}. Sin embargo, la literatura desvela la falta de experiencia con el uso de estos tres biomateriales en humanos, e incluso existen estudios experimentales *in vitro* como el de Li, que afirman que los marcadores para colágeno específico del CA decrecen con el tiempo en los implantes de quitosano¹⁴³. En este mismo sentido, Tan en sus estudios *in vitro*, demuestra que la proliferación celular se inhibe cuando aumenta la proporción

de quitosano en matrices mixtas colágeno-quitosano²⁵². Asimismo, Ragetly demuestra que la microestructura del andamiaje de quitosano está relacionada con su capacidad de condrogénesis. Este autor, concluye que ésta es superior en los modelos de microfibras que en las esponjas macroporosas²¹⁴.

Otras líneas de investigación han propuesto emplear otros componentes del CA para sintetizar *scaffolds* utilizables en el tratamiento de los defectos condrales. Por ejemplo, se ha testado el comportamiento de soportes a base de células derivadas de la MEC, obteniéndose tejido cartilaginoso *hyaline-like*¹¹¹.

Igualmente, algunas sustancias que componen mayoritariamente otros tejidos como el óseo, se han empleado para la regeneración de defectos cartilagosos. Es el caso de la hidroxiapatita (HA). Este fosfato cálcico reproduce las características de biocompatibilidad y biodisponibilidad requeridas para su utilización en el tratamiento de las lesiones condrales u osteocondrales. Así lo demuestran autores como Ito, que logra obtener cartílago parecido al hialino y hueso subcondral, utilizando este compuesto presembrado de condrocitos¹⁰². No obstante, esta sustancia es utilizada con mayor frecuencia y con mejores resultados para la regeneración del tejido óseo que para la del tejido cartilaginoso¹⁴⁰.

Existe cierta controversia en la literatura respecto a al comportamiento de los implantes de fosfato tricálcico. Como en el caso de la HA, algunos estudios que analizan el comportamiento del primero logran bastante buenos resultados en la regeneración ósea, pero la regeneración cartilaginosa es únicamente parcial y con una baja durabilidad²⁵³. Sin embargo, otros trabajos como el de Guo, consideran a este compuesto como una alternativa a los inconvenientes de los polímeros sintéticos, como son: la acidez local por acúmulo del biomaterial; la respuesta inflamatoria local o sistémica que éstos producen durante su degradación *in vivo*; la alta hidrofobia que contribuye a su degradación en unas cuatro semanas, lo cual es insuficiente para la formación del tejido cartilaginoso de reparación. Para este último autor, el fosfato tricálcico es una biocerámica con alta biodegradabilidad, y cuyas partículas se sitúan en la interfase entre el implante y el lecho óseo receptor pero no en la fracción cartilaginosa del mismo⁸². Estos depósitos de material cerámico podrían, a su vez, generar una respuesta macrofágica desde el hueso subcondral, origen de fibrosis y encapsulación del implante.

Entre los polímeros sintéticos utilizados en la IT del CA, cabe destacar el PLA. Al igual que en el caso de otros biomateriales, los estudios que analizan el comportamiento del PLA como soporte para la regeneración del tejido cartilaginoso, son controvertidos. Pulliainen compara

histológicamente el tejido reparativo espontáneo respecto al que resulta de la aplicación de *scaffolds* de PLA aislado y presembrados con condrocitos, en lesiones cartilaginosas de rodillas de cerdos. En el segundo grupo, el tejido reparativo es de peor calidad que en el primero²⁰⁹. Douchis, utilizando un modelo experimental en conejos, concluye que aparece una concentración subóptima de GAGs en la MEC del neocartílago, con una superficie deprimida en la zona de la lesión y una estructura histológica diferente a la del CA normal⁴⁸. Otros autores como Von Schroeder, demuestran que el neotejido que aparece en los defectos condrales de conejos que se rellenaron con una matriz de PLA, con y sin injerto perióstico, es menos rígido pero posee la misma permeabilidad que el CA normal²⁷⁰. También Gong, en sus trabajos con ratas, demuestra la presencia de colágeno tipo II segregado por los condrocitos en el lugar donde previamente había implantado un soporte de PLA⁷⁰.

Con el objetivo de que el biomaterial implantado en la lesión cartilaginosa permanezca durante el mayor tiempo posible, para así conseguir aprovechar al máximo sus propiedades de estimulación celular, se han utilizado elementos no degradables como el PVA. Su utilización en la IT del CA, viene determinada por su naturaleza viscoelástica, su alto contenido en agua y su biocompatibilidad. Además al poderse polimerizar con

acrilamida, previene el colapso de los poros, disminuyendo la pérdida de agua y aumentando la resistencia mecánica del implante^{38,14}.

El poliuretano biodegradable es otro de los biomateriales que se ha experimentado para el tratamiento de las lesiones condrales. El trabajo *in vitro* de Grad revela que los implantes de esta sustancia mantienen la adhesión de los condrocitos a sus paredes y permiten que éstos produzcan MEC. Sin embargo, numerosas moléculas de la MEC difunden hacia el medio de cultivo y los condrocitos se desdiferencian a medida que transcurre el tiempo⁷¹.

Otras líneas de investigación pretenden sintetizar *scaffolds* biodegradables que actúen como vehículos de transporte y distribución celular y que, a su vez, tengan propiedades estructurales y morfológicas similares a las de la MEC del CA, para así crear el entorno fisiológico de los condrocitos. En este sentido, la PCL ha demostrado ser un excelente substrato biosintético para la anidación de condrocitos, manteniendo las características de biodegradabilidad (por hidrólisis o mediante degradación enzimática) y biocompatibilidad requeridas en la ingeniería tisular del CA^{191,66,104,37,44,142,287}.

Algunos elastómeros biodegradables como el polioctanediol citrato (también denominado POC), han sido estudiados experimentalmente, comprobándose que constituyen un lecho poroso favorable para la adhesión de

los condrocitos y la síntesis posterior de tejido cartilaginoso¹¹⁶.

Diferentes trabajos proponen utilizar conjuntamente varios polímeros para optimizar las propiedades individuales de cada uno de ellos: son los denominados copolímeros. Así, por ejemplo, la asociación PGA/PLA (también conocida como PLGA), ha demostrado estimular la síntesis de PTGs y la proliferación, diferenciación y maduración de los condrocitos, en comparación con los andamiajes de colágeno⁷³. Aunque las matrices de fibrina, entre otras, también promueven una distribución homogénea de los condrocitos en el seno del implante y la formación de un tejido de reparación cartilaginoso, el *scaffold* de copolímero aporta una mayor estabilidad biomecánica inicial del implante y es más fácil de manipular por el cirujano¹¹⁷. Los estudios experimentales en conejos y caballos han comprobado la formación de tejido cartilaginoso y una buena integración del neot Tejido con puentes de unión con el cartílago y el hueso subcondral subyacente¹². Varios estudios *in vitro* e *in vivo*, concluyen que esta unión de biomateriales aplicada en las lesiones cartilaginosas, induce la formación de tejido cartilaginoso de reparación en ausencia de signos de necrosis, apoptosis y reacciones tisulares anormales^{12,192,132}. Por el contrario, Mercier detalla que cuando el tamaño de las microesferas que componen el

implante de PLGA es grande, se producen signos de necrosis en el centro de éste¹⁷¹.

Otras investigaciones experimentales, comparan el comportamiento entre diferentes biomateriales. Griffon compara el PLA y el quitosano presembrados con condrocitos en un estudio *in vitro* y concluye que, tras veintiocho días de cultivo, apenas permanecen restos de PLA mientras que el quitosano lo hace prácticamente en su totalidad. Mientras que las concentraciones de DNA y GAGs son mayores en las muestras de PGA, las esponjas de quitosano de poros grandes contienen mayor concentración de colágeno tipo II, condrocitos y GAGs que las matrices con poros pequeños⁷⁵. Freed confronta el PGA con el PLA y demuestra que el porcentaje de proliferación de condrocitos y de GAGs específicos del CA es significativamente más importante en el primer biomaterial, mientras que ambos polímeros han demostrado inducir la síntesis de PTGs igual que el colágeno^{60,73}. En este sentido, el PLGA ha demostrado estimular considerablemente la estabilidad de las células osteoblásticas aumentando la expresión de las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 5$ y $\beta 1$ ⁵¹. Esta característica hace que este copolímero pueda ser ideal para la reparación de lesiones osteocondrales¹¹⁵. Sin embargo, otros autores como Zwingmann consideran que la diferenciación de condrocitos humanos en soportes de PGA es mayor que en los de PLGA. La síntesis de agreganos y la expresión genética del

mRNA del colágeno tipo II es más importante en el primer grupo, con una diferencia estadísticamente significativa³⁰². Otros inconvenientes atribuibles a cada uno de estos polímeros, y por lo tanto al copolímero, es su rigidez. Esta característica actúa pues como factor limitante para su utilización en IT del CA⁷².

Caterson, por su parte, pretende aumentar la estabilidad mecánica de los implantes de biomateriales. Para lograrlo propone utilizar matrices macroporosas de PLA-alginato en combinación con TGF- β 1, que proporciona estabilidad al proceso de diferenciación condrogénica de las CMMs³². Han utiliza el mismo copolímero aunque en combinación con TGF- β 3, para el tratamiento de defectos osteocondrales en el conejo. El estudio histológico a los tres meses del implante, confirma la presencia de tejido *hyaline-like*, con expresión genética para GAGs y colágeno tipo II⁸⁶. Marijnissen confirma la aplicabilidad de los polímeros biodegradables en el tratamiento de los defectos cartilagosos, utilizando matriz ósea y PLGA ambos con gel de alginato. En el segundo grupo obtiene una mayor homogeneidad estructural y un mayor número de células con positividad histológica para colágeno tipo II¹⁶⁰. Jeong utiliza un andamiaje híbrido de polioxanona-PVA-CMMs y demuestra la formación de un neocartílago con elevado contenido en colágeno tipo II *in vitro*. *In vivo*, este mismo copolímero es capaz de regenerar defectos

osteocondrales¹⁰⁸. Para Kobayashi, la utilización de un hidrogel de PVA permite el tratamiento de lesiones cartilaginosas (“hemiartroplastia”) en la cadera sin lesiones óseas subyacentes¹³⁰.

La síntesis de moldes híbridos de PVA-PGA permite simultanear las propiedades de durabilidad del PVA con las de estímulo de la actividad condrocítica del PGA³⁸. Una situación parecida se pretende con la utilización de *scaffolds* bifásicos de PGA-HA. Zhou utiliza este tipo de sustrato en el que presiembró CMMs, para el tratamiento de defectos osteocondrales creados en la rodilla del conejo. A los ocho meses de su implantación, el sustrato aparece incorporado tanto al tejido cartilaginoso hialino en superficie como al tejido óseo subcondral en profundidad, sin que existan evidencias histológicas de degeneración tisular³⁰¹.

Algunos estudios utilizan células de extirpe no cartilaginosa sembradas en soportes de biomateriales para regenerar lesiones condrales. Wei introduce células madre derivadas de los adipocitos en implantes de fibrina-condroitín sulfato. Esta asociación de polímeros reproduce con bastante exactitud la MEC del CA (el CS es una de los componentes más abundantes de la MEC), estimulando la progresiva diferenciación de las células adiposas en condrocitos^{277,275,80}. La facilidad de obtención de este tipo celular para su posterior conversión en tejido cartilaginoso

mediante técnicas de IT, disminuiría la morbilidad del procedimiento de reparación de las lesiones cartilaginosas.

Otros polímeros naturales han sido asociados y utilizados en la IT del CA. Yan utiliza experimentalmente un copolímero de colágeno-quitosano-CS presembrado con condrocitos de rata e implantado en el tejido celular subcutáneo de ésta. A los tres meses de su implante, obtiene un tejido cartilaginoso homogéneo de características histológicas semejantes al CH. En la fase *in vitro* del trabajo, demuestra que los condrocitos se adhieren al *scaffold*, proliferan y segregan MEC que ocupa su estructura porosa²⁹⁵. Shi crea matrices de quitosano-colágeno tipo II y verifica *in vivo* que los condrocitos en su interior mantienen su fenotipo esférico y sintetizan colágeno del mismo tipo²³⁵.

3. POLIACRILATO DE ETILO Y OTROS COPOLÍMEROS

Considerando que existen ciertas controversias respecto a la idoneidad de los biomateriales empleados en IT para la regeneración de las lesiones condrales, en el presente estudio planteamos diferentes alternativas de biomateriales que nos permitan evolucionar en los planteamientos y alternativas en este campo.

Inicialmente, debemos tener en cuenta varias evidencias científicas que nos permitan analizar convenientemente los resultados de nuestro trabajo. Los

scaffolds implantados han estado en contacto con la sangre procedente del lecho del defecto condral creado en la superficie del surco intercondíleo del conejo. Aunque no se puede considerar que hayamos producido microfracturas en el hueso subcondral, la creación del defecto cartilaginoso con el *punch* ha implicado, en todos los casos, un contacto con éste. A pesar de ello, pensamos que es el utensilio más preciso para realizar la lesión y la extracción del disco de CA, a la vez que conseguimos producir las menores lesiones del cartílago circundante, como lo demuestra Vizesi²⁶⁹. Por ello, cuando implantamos andamiajes en los defectos creados en la superficie articular, éstos absorben inmediatamente sangre procedente del hueso subcondral, incluso en el caso del biomaterial más hidrófobo de los utilizados, el PEA, ya que el soporte tridimensional está embebido en tampón fosfato salino (PBS) antes de su implante. De ahí que en todos los casos existan células anidadas, tanto en los andamiajes presembrados como en los casos en que éstos no se han sembrado previamente con células condrales.

El comportamiento de los condrocitos procedentes de la diferenciación de las CMMs que invaden el *scaffold* y las características del tejido que de ellos deriva depende, en gran medida, de las propiedades de la matriz macroporosa. Se sabe que las células mesenquimales que invaden el defecto condral cuando sobre este se realizan

microfracturas, adquieren el fenotipo condrocítico y generan un tejido fibrocartilaginoso de reparación^{285,249}. Teniendo en cuenta este dato, en el presente estudio nos proponemos incorporar una esponja polimérica cuya función sea la de modificar el estado de las cargas a las que se ven sometidas las células que formarían el tejido cartilaginoso de reparación. Los resultados de nuestros experimentos demuestran la importancia de la biomecánica en el lugar del defecto cartilaginoso durante el proceso de regeneración, respecto a la calidad del tejido que en él se produzca. Cuando rellenamos el defecto cartilaginoso con un andamiaje, las células que se encuentran en la superficie cartilaginosa del surco intercondíleo femoral, se ven sometidas a fuerzas de estrés en compresión y reaccionan produciendo MEC²⁷⁴. El neotejido que se genera tiene las características histológicas de CH, entre las que destacan células aisladas en lagunas perpendiculares a la superficie articular del cóndilo femoral, con una MEC teñida con Azul Alcian.

Mientras que la biomecánica de la superficie cartilaginosa depende en gran medida del módulo de elasticidad del CA, la capacidad de crecimiento de la superficie condral regenerada depende de la deformabilidad del *scaffold*. Por otra parte, una población de CMMs invade la estructura porosa del implante y se genera nueva MEC en su interior, lo cual contribuye al incremento continuo del

módulo de elasticidad del complejo soporte-células. Transcurridos tres meses, en muchas de las muestras analizadas, observamos el disco de biomaterial implantado en una posición subcondral. Se trataría pues del resultado de un competición entre la capa superficial del cartílago intentando deformar el andamiaje y el aumento de la resistencia de éste. Este hecho puede explicar la diferente localización de las matrices macroporosas dependiendo de la elasticidad del biomaterial empleado en cada caso. De esta forma, el PEA (polímero al 100% utilizado en la serie 4), que constituye el biomaterial más rígido de los examinados, parece bastante inalterado tras tres meses de evolución, si tenemos en cuenta la fina capa de CH que sobre él se encuentra. Sin embargo, el hidrogel de copolímero P(EA-co-HEA) a iguales concentraciones (50%) testado en la serie 3, más blando a consecuencia de su hidrofilia, aparece completamente deformado y cercano al hueso subcondral en profundidad. En este último caso, no solamente el implante se encuentra poco anidado por células, sino que se ha producido una reacción fibrosa a su alrededor, remedando una reacción de encapsulación a “cuerpo extraño”. Al igual que en nuestro estudio, Pérez Olmedilla establece una relación significativa entre la mayor adhesión celular y la hidrofobia de los biomateriales²⁰⁰. El comportamiento de los implantes de las series 1 (P(EA-co-MAAc) 90/10) y 2 (P(EA-co-HEA) 90/10) es intermedio, con

una fina capa de CH cubriendo el implante, en la mayoría de las muestras.

La respuesta biológica también depende de la composición de cada uno de los *scaffolds*. El copolímero P(EA-co-MAAc), utilizado en la serie 1 de nuestro estudio, contiene grupos ácidos en la unidad monomérica de MAAc de la red polimérica. Estos grupos disociados en medio acuoso, liberan cargas eléctricas negativas unidas a la cadena polimérica. Esta característica es propicia para el cultivo *in vitro* de algunos tipos celulares como las células epiteliales conjuntivales²⁹, o los precursores neurales²⁴⁰. Aunque *in vivo*, la respuesta biológica a este copolímero no ha sido del todo satisfactoria, hemos observado una ligera colonización celular del implante, en parte rodeada de áreas de tejido fibrótico, tanto en la serie con presiembra de condrocitos como en la serie en la que ésta no se llevaba a cabo.

Por otro lado, el copolímero P(EA-co-HEA), utilizado en las series 2 y 3 (con diferentes proporciones de cada polímero), contiene grupos hidroxilo. Es conocido que la presencia de estos grupos en cultivos celulares, además de aumentar la capacidad de absorción de agua, disminuye de manera considerable la adhesión celular. Esta circunstancia es así, hasta el extremo que los copolímeros P(EA-co-HEA) con una proporción mayor del 20% de unidades de HEA, inhiben la adhesión de células epiteliales, de células

endoteliales umbilicales humanas o de fibroblastos^{29,30}. En los cultivos en monocapa de condrocitos con estos copolímeros, el número de células disminuye a medida que se incrementa el contenido de HEA²⁰⁰. Este extremo se confirma en nuestro estudio *in vivo*, puesto que en la serie 3 (en la que utilizamos el copolímero con la mayor proporción de HEA, un 50%), apreciamos en la mayoría de muestras que la formación de neot Tejido es prácticamente inexistente en el interior del *scaffold*.

Los biomateriales de las series 2 (P(EA-co-HEA), 90/10) y 4 (PEA, 100%) han demostrado conseguir la mejor respuesta en cuanto a formación de neot Tejido. En el interior de los implantes de estas series, los poros están rellenos mayoritariamente de células condrales aisladas en lagunas, observándose en muchas ocasiones tejido de aspecto óseo en la base de los andamiajes. Así, observamos un tejido que en el área superior es predominantemente cartilaginoso y en el área inferior es fundamentalmente óseo, ocupando ambos la totalidad del defecto condral creado tres meses antes. Es interesante destacar la presencia de células proliferativas inmunorreactivas al Ki67 tanto en las muestras presembradas con condrocitos como en las no presembradas. Esta observación sugiere que la colonización de los implantes de biomateriales se produce tanto a expensas de las CMMs procedentes del hueso subcondral como de los propios condrocitos incorporados durante la

siembra de los soportes. No tenemos datos sobre la adhesión celular a las paredes de los poros de los discos, durante las primeras fases tras su implante en el defecto condral de la rodilla del conejo.

El escaso número de células que hemos encontrado en el interior de los implantes de la serie 3 (P(EA-co-HEA), 50/50) podría deberse a la falta de adhesión celular, como hemos expuesto anteriormente. Sin embargo, este hallazgo también podría estar en relación con el colapso de estos implantes blandos a consecuencia de las fuerzas de compresión cráneo-caudales que ejerce sobre ellos el tejido en crecimiento por encima. Para dilucidar esta incógnita, se deberían plantear nuevos estudios que analicen a más corto plazo, el comportamiento y la anidación de estos implantes.

El comportamiento de los *scaffolds* presembrados con condrocitos respecto a los no presembrados también ha sido valorado en nuestro estudio. El tejido regenerativo obtenido en ambos grupos ha presentado unas características histológicas semejantes. La principal variación que establecemos, es el mayor número de células que se diferencian en las estirpes condral y ósea hallado en los especímenes a los que se les ha implantado andamiajes presembrados. Así pues, parece que estas células presembradas son estables en el interior del disco implantado y que no se produce muerte celular con la evolución. El aspecto histológico del tejido que ocupa el

espacio del defecto cartilaginoso es semejante al CH, con células aisladas en lagunas y una MEC con abundantes fibras de colágeno tipo II y agreganos, puestos en evidencia por inmunohistoquímica para este tipo de colágeno y la tinción de Azul Alcian. Una pequeña proporción de estas células probablemente deriven de las CMMs que, llegando desde el lecho subcondral, invaden el disco implantado, como hemos planteado en el caso de los *scaffolds* no presembrados con células. Pero el incremento de la colonización celular de los andamiajes presembrados con condrocitos, sugiere que los condrocitos obtenidos del cultivo en monocapa, han sido capaces de originar *in vivo* tejido *hyaline-like* en el interior de los implantes. Tampoco hemos detectado diferencias significativas entre el tejido regenerado en la superficie de los soportes con y sin presiembra, lo que nos hace plantear que el mecanismo de regeneración debe de ser el mismo, y por tanto depende más de la naturaleza del biomaterial que de la presencia o ausencia de condrocitos sembrados en el andamiaje.

Respecto a la respuesta biológica en relación con los biomateriales analizados en nuestro estudio, destacan los buenos resultados obtenidos en la serie 4. Se trata de la serie en la que hemos utilizado andamiajes de PEA al 100%. Además de la tendencia a producir CH en la superficie por encima del implante y tejido óseo en profundidad, la transición del neot Tejido con el tejido receptor

es homogénea y sin signos de fibrosis ni encapsulación. Estos hallazgos que abogan sobre la capacidad regenerativa del PEA, son asimilables a los obtenidos en otros tejidos como el nervioso, tal y como plantea Martínez-Ramos en su estudio sobre diferenciación de células madre neurales *in vivo*¹⁶⁴.

Otro punto de análisis destacable es el de la estabilidad de los implantes una vez situados en el defecto condral. En ninguna de nuestras series hemos objetivado casos de separación o movimiento anómalo de los *scaffolds* respecto al lecho de la lesión condral en el que se implantan. Durante la fase experimental y previamente al cierre de la artrotomía, realizamos diferentes ciclos de flexo-extensión de la rodilla, comprobando que el andamiaje permanece *in situ*. Otras series estudiadas en humanos, plantean la necesidad de fijar los soportes macroporosos mediante sistemas reabsorbibles, incluso utilizando técnicas artroscópicas²⁰¹. Desde el punto de vista experimental, Knecht compara la estabilidad de andamiajes compuestos por distintos polímeros y estabilizados con diferentes sistemas; concluye que el andamiaje de PGA es el más estable independientemente del sistema de estabilización utilizado¹²⁷. Drobnic pone a prueba la estabilidad de implantes cartilaginosos de colágeno en cadáver concluyendo que no es factible prescindir de sistemas de fijación y que el sistema con mejor relación riesgo-beneficio

es el sellado con fibrina⁵⁰. Existen varias hipótesis que justificarían la estabilidad de los implantes en nuestro estudio: el reducido tamaño del defecto condral y por lo tanto del *scaffold* que lo ocupa; la correspondencia prácticamente exacta del continente respecto al contenido; y, por último, el hecho de que el defecto se haya producido en la zona de la rodilla más congruente en la posición habitual en flexión de la rodilla en el conejo (articulación femoro-patelar).

Analizados los resultados del presente trabajo, nos planteamos en un futuro buscar nuevas perspectivas para la obtención de formatos de implantes inyectables y autoestables para su posible utilización clínica vía artroscópica, así como comprobar *in vivo* el comportamiento de nuestros biomateriales en zonas articulares de carga o en defectos osteocondrales de mayor tamaño.

Respecto al presente modelo, estamos en la fase evolutiva de la ampliación del seguimiento a un año, con el mismo protocolo experimental y con los siguientes objetivos: valorar el grado de viabilidad del tejido neoformado en el lecho lesional, analizar la presencia de signos degenerativos e incluso de metaplasias tanto en el implante como en el CA circundante al mismo y comprobar la biocompatibilidad de los biomateriales utilizados a medio-largo plazo.

Conclusiones

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

1. La ingeniería de tejidos utilizando soportes tridimensionales o matrices de los biomateriales por nosotros testados en este modelo experimental, es una técnica apropiada para la regeneración de lesiones inducidas en la superficie del complejo osteocondral.

2. Los biomateriales más rígidos y/o más hidrófobos presentan una respuesta biológica más adecuada tanto respecto a su posición definitiva dentro del complejo osteocondral como respecto a las características histológicas del neot Tejido que generan.

3. Los andamiajes más hidrófilos inducen la aparición de una cápsula fibrosa con numerosos clastos alrededor, junto con escasa o nula neoformación celular en su interior.

4. Los andamiajes de polímeros de PEA puro o con alta proporción del mismo, inducen un complejo osteocondral similar al original que lo circunda. Este complejo neoformado está constituido por un cartílago en superficie de características similares al cartílago hialino articular que lo rodea, y en profundidad una zona semejante al hueso subcondral del complejo osteoarticular original.

5. La presiembra de condrocitos en los soportes favorece la obtención de un tejido de regeneración de características muy parecidas al cartílago hialino articular.

6. La utilización de *scaffolds* sin siembra previa permite obtener igualmente un neocartílago articular, sin diferencias estructurales cualitativas respecto a la utilización de andamiajes presembrados.

7. Las técnicas de regeneración del cartílago articular en defectos condrales inducidos de pequeño tamaño, con los biomateriales testados, no requieren sistemas de fijación para asegurar su estabilidad en el modelo utilizado en el presente estudio.

Bibliografía

1. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):199-215.
2. 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.
3. Altaf FM, Hering TM, Kazmi NH, Yoo JU, Johnstone B. Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *Eur Cell Mater.* 2006;12:64-9.
4. Alves NM, Mano JF. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int J Biol Macromol.* 2008;43(5):401-14.
5. Alleyne KR, Galloway MT. Management of osteochondral injuries of the knee. *Clin Sports Med.* 2001;20(2):343-64.
6. Arai Y, Kubo T, Kobayashi K, Takeshita K, Takahashi K, Ikeda T et al. Adenovirus vector-mediated gene transduction to chondrocytes: in vitro evaluation of therapeutic efficacy of transforming growth factor beta-1 and heat shock protein 70 gene transduction. *J Rheumatol.* 1997;24(9):1787-95.
7. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006;20(1):3-25.
8. Ayrat X, Dougados M. Joint lavage. *Rev Rhum Engl Ed.* 1995;62(4):281-7.
9. Ayrat X. Arthroscopy and joint lavage. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005;19(3):401-15.
10. Bai X, Xiao Z, Pan Y, Hu J, Pohl J, Wen J et al. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(2):453-60.

11. Barnard JC, Williams AJ, Rabier B, Chassande O, Samarut J, Cheng SY et al. Thyroid hormones regulate fibroblast growth factor receptor signaling during chondrogenesis. *Endocrinology*. 2005;146(12):5568-80.
12. Barnewitz D, Endres M, Krüger I, Becker A, Zimmermann J, Wilke I et al. Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials*. 2006;27(14):2882-9.
13. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982;30(1):215-24.
14. Bodugoz-Senturk H, Macias CE, Kung JH, Muratoglu OK. Poly(vinyl alcohol)-acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials*. 2009;30(4):589-96.
15. Bouwmeester P, Kuijjer R, Terwindt-Rouwenhorst E, van der Linden T, Bulstra S. Histological and biochemical evaluation of perichondrial transplants in human articular cartilage defects. *J Orthop Res*. 1999;17(6):843-9.
16. Brehm W, Aklín B, Yamashita T, Rieser F, Trüb T, Jakob RP et al. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(12):1214-26.
17. Brígido Diego R, Pérez Olmedilla M, Serrano Aroca A, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M, Gallego Ferrer G et al. Acrylic scaffolds with interconnected spherical pores and controlled hydrophilicity for tissue engineering. *J. Mat. Sci. Mat. Medicine*. 2005;16: 693-8.
18. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889-95.
19. Brittberg M, Sjögren-Jansson E, Lindahl A, Peterson L. Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. *Biomaterials*. 1997;18(3):235-42.

20. 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.
21. Brun P, Dickinson SC, Zavan B, Cortivo R, Hollander AP, Abatangelo G. Characteristics of repair tissue in second-look and third-look biopsies from patients treated with engineered cartilage: relationship to symptomatology and time after implantation. *Arthritis Research and Therapy* 2008;10(6):1-8.
22. Bruns J, Steinhagen J. Treatment of deep hyalin cartilage defects with autologous perichondrial grafts. *Int J Sports Med.* 2003;24(5):382-8.
23. Buckwalter JA, Rosenberg LA, Hunziker EB. Articular cartilage: composition, structure, response to injury and methods of facilitating repair. En: Ewing JW, editor. *Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy.* New York: Raven Press;1990. p.19-56.
24. Buckwalter JA. Operative treatment of osteoarthritis: current practice and future development. *J Bone Joint Surg.* 1994;76A:1405-18.
25. Buckwalter JA. Were the Hunter brothers wrong? Can surgical treatment repair articular cartilage? *Iowa Orthop J.* 1997;17:1-13.
26. Buckwalter JA, Saltzman C, Brown T. The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; 427:6-15.
27. Cai DZ, Zeng C, Quan DP, Bu LS, Wang K, Lu HD et al. Biodegradable chitosan scaffolds containing microspheres as carriers for controlled transforming growth factor-beta1 delivery for cartilage tissue engineering. *Chin Med J (Engl).* 2007;120(3):197-203.
28. Caldwell PE 3rd, Shelton WR. Indications for allografts. *Orthop Clin North Am.* 2005;36(4):459-67.
29. Campillo Fernández AJ, Pastor S, Abad Collado M, Bataille L, Gómez Ribelles JL, Meseguer Dueñas JM et al. Future design of a new keratoprosthesis. Physical and biological analysis of polymeric substrates for epithelial cell growth. *Biomacromolecules.* 2007; 8(8):2429-36.

30. Campillo-Fernández AJ, Unger RE, Peters K, Halstenberg S, Santos M, Salmerón Sánchez M et al. Analysis of the biological response of endothelial and fibroblast cells cultured on synthetic scaffolds with various hydrophilic/hydrophobic ratios. Influence of fibronectin adsorption and conformation. *Tissue Eng A* 2009; 15:1331-41.
31. Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists and the skeleton. *Endocrine Reviews*. 2003;24(2):218-35.
32. Catterson EJ, Nesti LJ, Li WJ, Danielson KG, Albert TJ, Vaccaro AR et al. Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam. *J Biomed Mater Res*. 2001;57(3):394-403.
33. Cruz DM, Ivirico JL, Gomes MM, Gómez Ribelles JL, Sánchez MS, Reis RL, Mano JF. Chitosan microparticles as injectable scaffolds for tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008;2(6):378-80.
34. Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science*. 1995;270(5235):404-10.
35. 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.
36. Chajra H, Rousseau CF, Cortial D, Ronzière MC, Herbage D, Mallein-Gerin F et al. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. *Biomed Mater Eng*. 2008;18:33-45.
37. Chang KY, Cheng LW, Ho GH, Huang YP, Lee YD. Fabrication and characterization of poly(γ -glutamic acid)-graft-chondroitin sulfate/polycaprolactone porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009;5(6):1937-47.
38. Charlton DC, Peterson MG, Spiller K, Lowman A, Torzilli PA, Maher SA. Semi-degradable scaffold for articular cartilage replacement. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(1):207-13.

39. Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. Chondrocyte transplantation and experimental treatment options for articular cartilage defects. *Am J Orthop*. 1997;26(6):396-406.
40. Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen*. 1999;7(2):79-89.
41. Chiang H, Jiang CC. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J Formos Med Assoc*. 2009; 108(2):87-101.
42. Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Int Orthop*. 2007;31(6):773-81.
43. Chun JS, Oh H, Yang S, Park M. Wnt signaling in cartilage development and degeneration. *BMB Rep*. 2008;41(7):485-94.
44. da Silva MA, Crawford A, Mundy J, Martins A, Araújo JV, Hatton PV et al. Evaluation of extracellular matrix formation in polycaprolactone and starch-compounded polycaprolactone nanofiber meshes when seeded with bovine articular chondrocytes. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15(2):377-85.
45. Di Martino A, Sittlinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005;26(30):5983-90.
46. Djian P, Versier G. Technique de reconstruction cartilagineuse. En: *EMC. Techniques chirurgicales Orthopédie-Traumatologie*. Paris: Elsevier Masson; 2006.44-035. p.1-18.
47. 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.
48. Douchis JS, Bae WC, Chen AC, Sah RL, Coutts RD, Amiel D. Cartilage repair with autogenic perichondrium cell and polylactic acid grafts. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;377:248-64.
49. Dragoo JL, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhu M, Zuk PA et al. Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue Eng*. 2007; 13(7):1615-21.

50. Drobic M, Radosavljevic D, Ravnik D, Pavlovcic V, Hribernik M. Comparison of four techniques for the fixation of a collagen scaffold in the human cadaveric knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(4):337-44.
51. El Amin SF, Attawia M, Lu HH, Shah AK, Chang R, Hickok NJ et al. Integrin expression by human osteoblasts cultured on degradable polymeric materials applicable for tissue engineered bone. *J Orthop Res*. 2002;20(1):20-8.
52. Evans CH, Robbins PD. Possible orthopaedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77-A:1103-14.
53. Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P, Shuler FD, Mi Z, Robbins PD. Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;379:214-9.
54. Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater*. 2006;12:57-63.
55. Eyrich D, Wiese H, Maier G, Skodacek D, Appel B, Sarhan H et al. In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds. *Tissue Eng*. 2007;13(9):2207-18.
56. Faber SC, Eckstein F, Lukasz S, Mühlbauer R, Hohe J, Englmeier KH, Reiser M. Gender differences in knee joint cartilage thickness, volume and articular surface areas: assessment with quantitative three-dimensional MR imaging. *Skeletal Radiol*. 2001;30(3):144-50.
57. Fawcett DW. Cartilago. En: McGraw Hill Interamericana. *Tratado de histología*. 11ª ed. Madrid: Panamericana; 1987. p.188-98.
58. Feng G, Wan Y, Balian G, Laurencin CT, Li X. Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells. *Growth Factors*. 2008;26(3):132-42.
59. Fithian DC, Kelly MA, Mow VC. Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;252:19-31.

60. Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(1):11-23.
61. Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br.* 1997;79(5):831-6.
62. Freyria AM, Courtes S, Mallein-Gerin F. [Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2]. *Pathol Biol (Paris).* 2008;56(5):326-33.
63. 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.
64. 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.
65. Fuss M, Ehlers EM, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light scanning and transmission electron microscopy study. *Ann Anat.* 2000; 182(4):303-10.
66. García Giralt N, Izquierdo R, Nogués X, Pérez Olmedilla M, Benito P, Gómez Ribelles JL et al. A porous PCL scaffold promotes the human chondrocytes redifferentiation and hyaline-specific extracellular matrix protein synthesis. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85(4):1082-9.
67. Gigante A, Bevilacqua C, Cappella M, Manzotti S, Greco F. Engineered articular cartilage: influence of the scaffold on cell phenotype and proliferation. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14(8):713-6.
68. Gillogly SD, Myers TH, Reinold MM. Treatment of full-thickness chondral defects in the knee with autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2006; 36(10):751-64.
69. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 2006;97(1):33-44.

70. Gong Y, Zhou Q, Gao C, Shen J. In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of poly(L-lactic acid) scaffold fabricated by a gelatin particle leaching method. *Acta Biomater.* 2007;3(4):531-40.
71. Grad S, Kupcsik L, Gorna K, Gogolewski S, Alini M. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials.* 2003; 24(28):5163-71.
72. Grad S, Zhou L, Gogolewski S, Alini M. Chondrocytes seeded onto poly(l/dl-lactide) 80%/20% porous scaffolds: a biochemical evaluation. *J Biomed Mater Res.* 2003;66:571-9.
73. Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res.* 1997; 34(2):211-20.
74. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetics proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1463-73.
75. Griffon DJ, Sedighi MR, Schaeffer DV, Eurell JA, Johnson AL. Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater.* 2006;2(3):313-20.
76. Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, et al. Transplantation of chondrocytes on a hyaluronan derivative (Hyaff-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials* 2001;22:2417-24.
77. Grigolo B, De Franceschi L, Roseti L, Cattini L, Facchini A. Down regulation of degenerative cartilage molecules in chondrocytes grown on a hyaluronan-based scaffold. *Biomaterials.* 2005;26(28):5668-76.
78. Gründer T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J et al. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12(7):559-67.
79. Gudas R, Simonaityte R, Riauba L, Pocius G, Kalesinskas R. [Treatment of joint surface pathology by Pridie drilling]. *Medicina (Kaunas).* 2002;38(7):720-9.

80. Guilak F, Awad HA, Fermor B, Leddy HA, Gimple JM. Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biorheology*. 2004;41(3-4):389-99.
81. Guo JF, Jourdian GW, MacCallum DK. Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connect Tissue Res*. 1989;19:277-97.
82. Guo X, Wang C, Duan C, Descamps M, Zhao Q, Dong L et al. Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep. *Tissue Eng*. 2004;10(11-12):1830-40.
83. Guo X, Zheng Q, Yang S, Shao Z, Yuan Q, Pan Z et al. Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor beta1 gene. *Biomed Mater*. 2006;1(4):206-15.
84. Haddo O, Mahroof S, Higgs D, David L, Pringle J, Bayliss M et al. The use of chondroglide membrane in autologous chondrocyte implantation. *Knee*. 2004;11(1):51-5.
85. Hall BK. Modulation of chondrocyte activity in vitro in response to ascorbic acid. *Acta Anat (Basel)*. 1981; 109(1):51-63.
86. Han SH, Kim YH, Park MS, Kim IA, Shin JW, Yang WI et al. Histological and biomechanical properties of regenerated articular cartilage using chondrogenic bone marrow stromal cells with a PLGA scaffold in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87(4):850-61.
87. 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.
88. 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.
89. Harley BA, Kim HD, Zaman MH, Yannas IV, Lauffenburger DA, Gibson LJ. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences

cell migration behavior via junction interactions. *Biophys J*. 2008;95(8):4013-24.

90. Haupt JL, Frisbie DD, McIlwraith CW, Robbins PD, Ghivizzani S, Evans CH et al. Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. *J Orthop Res*. 2005;23(1):118-26.

91. Häuselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ. Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix*. 1992; 12(2):116-29.

92. Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci*. 1994;107:17-27.

93. Hoffman LM, Kulyk WM. Alcohol promotes in vitro chondrogenesis in embryonic facial mesenchyme. *Int J Dev Biol*. 1999;43(2):167-74.

94. 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.

95. Horstman CL, 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.

96. Hunter CJ, Levenston ME. Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model. *Tissue Eng*. 2004;10:736-46.

97. Hunter CJ, Mouw JK, Levenston ME. Dynamic compression of chondrocyte-seeded fibrin gels: effects on matrix accumulation and mechanical stiffness. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(2):117-30.

98. Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *BMJ*. 2006;332:639-42.

99. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(6):432-63.

100. Hunziker EB, Stähli A. Surgical suturing of articular cartilage induces osteoarthritis-like changes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(9):1067-73.
101. Ishikawa N, Suzuki Y, Dezawa M, Kataoka K, Ohta M, Cho H et al. Peripheral nerve regeneration by transplantation of BMSC-derived Schwann cells as chitosan gel sponge scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2009;89(4):1118-24.
102. Ito Y, Adachi N, Nakamae A, Yanada S, Ochi M. Transplantation of tissue-engineered osteochondral plug using cultured chondrocytes and interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic cylindrical plugs to treat osteochondral defects in a rabbit model. *Artif Organs*. 2008; 32(1):36-44.
103. Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009;17(6):561-77.
104. Izquierdo R, Garcia Giralto N, Rodriguez MT, Cáceres E, García SJ, Gómez Ribelles JL et al. Biodegradable PCL scaffolds with an interconnected spherical pore network for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85(1):25-35.
105. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A:53-64.
106. Jakob M, Démarteau O, Suetterlin R, Heberer M, Martin I. Chondrogenesis of expanded adult human articular chondrocytes is enhanced by specific prostaglandins. *Rheumatology*. 2004;43(7):852-7.
107. Jeon YH, Choi JH, Sung JK, Kim TK, Cho BC, Chung HY. Different effects of PLGA and chitosan scaffolds on human cartilage tissue engineering. *J Craniofac Surg*. 2007; 18(6):1249-58.
108. Jeong WK, Oh SH, Lee JH, Im GI. Repair of osteochondral defects with a construct of mesenchymal stem cells and a polydioxanone/poly(vinyl alcohol) scaffold. *Biotechnol Appl Biochem*. 2008;49:155-64.
109. 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.

110. Jiankang H, Dichen L, Yaxiong L, Bo Y, Hanxiang Z, Qin L et al. Preparation of chitosan-gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009;5(1):453-61.
111. 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.
112. Johnson L. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy.* 1986; 2(1):54-69.
113. Johnson L. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391:306-17.
114. Kang JY, Chung CW, Sung JH, Park BS, Choi JY, Lee SJ et al. Novel porous matrix of hyaluronic acid for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Int J Pharm.* 2009; 369:114-20.
115. Kang SW, Yoon JR, Lee JS, Kim HJ, Lim HW, Lim HC et al. The use of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as injectable cell carriers for cartilage regeneration in rabbit knees. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006;17(8):925-39.
116. Kang Y, Yang J, Khan S, Anissian L, Ameer GA. A new biodegradable polyester elastomer for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2006;77(2):331-9.
117. Kaps C, Frauenschuh S, Endres M, Ringe J, Haisch A, Lauber J et al. Gene expression profiling of human articular cartilage grafts generated by tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27(19):3617-30.
118. Kato Y, Iwamoto M, Koike T, Suzuki F. Effect of vanadate on cartilage-matrix proteoglycan synthesis in rabbit costal chondrocyte cultures. *J Cell Biol.* 1987;104(2):311-9.
119. Kawabe N, Yoshinao M. The repair of full-thickness articular cartilage defects. Immune responses to reparative tissue formed by allogeneic growth plate chondrocyte implants. *Clin Orthop Relat Res.* 1991;268:279-93.

120. Kessler MW, Grande DA. Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis*. 2008;4(1):28-32.
121. 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.
122. Kim HT, Teng MS, Dang AC. Chondrocyte apoptosis: implications for osteochondral allograft transplantation. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;466(8):1819-25.
123. Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*. 2008;26(1):1-21.
124. Kim SE, Park JH, Cho YW, Chung H, Jeong SY, Lee EB et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering. *J Control Release*. 2003; 91(3):365-74.
125. Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop Relat Res*. 1984;186: 231-9.
126. Kitahara S, Nakagawa K, Sah RL, Wada Y, Ogawa T, Moriya H et al. In vivo maturation of scaffold-free engineered articular cartilage on hydroxyapatite. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(11):1905-13.
127. Knecht S, Erggelet C, Endres M, Sittinger M, Kaps C, Stüssi E. Mechanical testing of fixation techniques for scaffold-based tissue-engineered grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83(1):50-7.
128. Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin Orthop Relat Res*. 2004; 427:152-62.
129. Ko CS, Huang JP, Huang CW, Chu IM. Type II collagen-chondroitin sulfate-hyaluronan scaffold cross-linked by genipin for cartilage tissue engineering. *J Biosci Bioeng*. 2009;107(2):177-82.

130. Kobayashi M, Oka M. Characterization of a polyvinyl alcohol-hydrogel artificial articular cartilage prepared by injection molding. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2004;15(6):741-51.
131. Kosher RA, Walker KH. The effect of prostaglandins on in vitro limb cartilage differentiation. *Exp Cell Res.* 1983; 145(1):145-53.
132. Kreuz PC, Müller S, Ossendorf C, Kaps C, Erggelet C. Treatment of focal degenerative cartilage defects with polymer-based autologous chondrocyte grafts: four-year clinical results. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(2):1-11.
133. Kulyk WM, Reichert C. Staurosporine, a protein kinase inhibitor, stimulates cartilage differentiation by embryonic facial mesenchyme. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1992; 12(2):90-7.
134. Kulyk WM, Hoffman LM. Ethanol exposure stimulates cartilage differentiation by embryonic limb mesenchyme cells. *Exp Cell Res.* 1996;223(2):290-300.
135. Kuroda R, Usas A, Kubo S, Corsi K, Peng H, Rose T et al. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum.* 2006;54(2):433-42.
136. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(2):226-31.
137. Lane Smith R, Trindade MC, Ikenoue T, Mohtai M, Das P, Carter DR et al. Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology.* 2000;37(1-2):95-107.
138. Lee DA, Noguchi T, Frean SP, Lees P, Bader DL. The influence of mechanical loading on isolated chondrocytes seeded in agarose constructs. *Biorheology.* 2000;37:149-61.
139. Lefebvre V, Zhou G, Mukhopadhyay K, Smith CN, Zhang Z, Eberspaecher H et al. An 18-base-pair sequence in the mouse proalpha1(II) collagen gene is sufficient for expression in cartilage and

binds nuclear proteins that are selectively expressed in chondrocytes. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(8):4512-23.

140. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;395:81-98.

141. Li J, Kim KS, Park JS, Elmer WA, Hutton WC, Yoon ST. BMP-2 and CDMP-2: stimulation of chondrocyte production of proteoglycan. *J Orthop Sci.* 2003;8(6):829-35.

142. Li WJ, Chiang H, Kuo TF, Lee HS, Jiang CC, Tuan RS. Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009;3(1):1-10.

143. Li Z, Zhang M. Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2005; 75(2):485-93.

144. Lieberman JR, Ghivizzani SC, Evans CH. Gene transfer approaches to the healing of bone and cartilage. *Mol Ther.* 2002;6(2):141-7.

145. Lin L, Zhou C, Wei X, Hou Y, Zhao L, Fu X, Zhang J, Yu C. Articular cartilage repair using dedifferentiated articular chondrocytes and bone morphogenetic protein 4 in a rabbit model of articular cartilage defects. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(4):1067-75.

146. Lindahl A, Brittberg M, Peterson L. Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects. *Novartis Found Symp.* 2003;249:175-86.

147. Little CB, Ghosh P, Rose R. The effect of strenuous versus moderate exercise on the metabolism of proteoglycans in articular cartilage from different weight-bearing regions of the equine third carpal bone. *Osteoarthritis Cartilage.* 1997; 5(3):161-72.

148. Lohmann CH, Schwartz Z, Niederauer GG, Carnes DL Jr, Dean DD, Boyan BD. Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo. *Biomaterials.* 2000; 21(1):49-61.

149. Løken S, Jakobsen RB, Arøen A, Heir S, Shahdadfar A, Brinchmann JE et al. Bone marrow mesenchymal stem cells in a hyaluronan scaffold for treatment of an osteochondral defect in a rabbit model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008;16(10):896-903.
150. Lubiawski P, Manikowski W, Romanowski L, Trzeciak T, Kruczyński J, Piontek T. The experimental reconstruction of articular cartilage using autogenous periosteal and perichondreal implants. *Ortop Traumatol Rehabil.* 2001; 3(2):194-9.
151. Lubiawski P, Kruczynski J, Gradys A, Trzeciak T, Jaroszewski J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc.* 2006;38(1):320-2.
152. Luyten FP, Chen P, Paralkar V, Reddi AH. Recombinant bone morphogenetic protein-4, transforming growth factor-beta 1, and activin A enhance the cartilage phenotype of articular chondrocytes in vitro. *Exp Cell Res.* 1994; 210(2):224-9.
153. Lynn AK, Brooks RA, Bonfield W, Rushton N. Repair of defects in articular joints. *J Bone Joint Surg Br.* 2004;86-B: 1093-9.
154. Madry H, Zurakowski D, Trippel SB. Overexpression of human insulin-like growth factor-1 promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther.* 2001;8:1443-9.
155. Magnussen RA, Dunn WR, Carey JL, Spindler KP. Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466(4):952-62.
156. Mainil-Varlet P, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saager C, Jakob RP. Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9:6-15.
157. Mankin HJ, Brandt KD. Biochemistry and metabolism of articular cartilage in osteoarthritis. En: Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ, editores. *Osteoarthritis. Diagnosis and management.* 2ª Edición. Philadelphia. Saunders; 1992. p. 109-54.
158. Marcacci M, Zaffagnini S, Kon E, Visani A, Iacono F, Loreti I. Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2002; 10(3):154-9.

159. Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A et al. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;435:96-105.
160. Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials*. 2000;21(6):571-80.
161. 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.
162. Martinek V, Fu FH, Lee CW, Huard J. Treatment of osteochondral injuries. Genetic engineering. *Clin Sports Med*. 2001;20(2):403-16.
163. Martinek V, Ueblacker P, Imhoff AB. Current concepts in gene therapy and cartilage repair. *J Bone Joint Surg. Br*. 2003;85-B:782-8.
164. Martínez-Ramos C, Lainez S, Sancho F, García Esparza MA, Planells Cases R, García Verdugo JM et al. Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(8):1365-75.
165. Martins AM, Santos MI, Azevedo HS, Malafaya PB, Reis RL. Natural origin scaffolds with in situ pore forming capability for bone tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2008; 4(6):1637-45.
166. Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, Porti D, Pergolizzi RG, Grande DA. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*. 2000; 379:171-8.
167. Matsumoto T, Cooper GM, Gharaibeh B, Meszaros LB, Li G, Usas A et al. Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intraarticular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble Flt-1. *Arthritis Rheum*. 2009;60(5):1390-405.
168. 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.

169. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaschte K, Muller L, Finkenzeller G, Hartl D et al. Differential effects of BMP-2 and TGF-beta1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Cell Prolif.* 2007;40(6):809-23.
170. Menche DS, Frenkel SR, Blair B, Watnik NF, Toolan BC, Yaghoubian RS et al. A comparison of abrasion burr arthroplasty and subchondral drilling in the treatment of full-thickness cartilage lesions in the rabbit. *Arthroscopy.* 1996; 12(3):280-6.
171. Mercier NR, Costantino HR, Tracy MA, Bonassar LJ. A novel injectable approach for cartilage formation in vivo using PLG microspheres. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):418-29.
172. Metsäranta M, Kujala UM, Pelliemi L, Osterman H, Aho H, Vuorio E. Evidence for insufficient chondrocytic differentiation during repair of full-thickness defects of articular cartilage. *Matrix Biol.* 1996;15(1):39-47.
173. Micheli L, Curtis C, Shervin N. Articular cartilage repair in the adolescent athlete: is autologous chondrocyte implantation the answer? *Clin J Sport Med.* 2006;16(6):465-70.
174. Miljkovic ND, Cooper GM, Marra KG. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(10):1121-30.
175. Millett PJ, Huffard BH, Horan MP, Hawkins RJ, Steadman JR. Outcomes of full-thickness articular cartilage injuries of the shoulder treated with microfracture. *Arthroscopy.* 2009; 25(8):856-63.
176. 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.
177. Minas T, Nehrer S. Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics.* 1997;20(6):525-38.
178. Minas T, Chiu R. Autologous chondrocyte implantation. *Am J Knee Surg.* 2000;13(1):41-50.

179. Mithoefer K, Williams RJ 3rd, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC et al. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87(9):1911-20.
180. Mithoefer K, Williams RJ 3rd, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC et al. Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* 2006; 88:294-304.
181. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch.* 2009;76(2):56-66.
182. Mobasher 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 pro-inflammatory cytokines. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2008;200:1-84.
183. Möller HD, Fu FH, Niyibizi C, Studer RK, Georgescu HJ, Robbins PD et al. TGF-beta-1 gene transfer in joint cartilage cells: stimulating effect in extracellular matrix synthesis. *Orthopade.* 2000;29(2):75-9.
184. Namba RS, Meuli M, Sullivan KM, Le AX, Adzick NS. Spontaneous repair of superficial defects in articular cartilage in a fetal lamb model. *J Bone Joint Surg Am.* 1998; 80(1):4-10.
185. Nehrer S, Domayer S, Dorotka R, Schatz K, Bindreiter U, Kotz R. Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. *Eur J Radiol.* 2006;57(1):3-8.
186. Nettles DL, Vail TP, Morgan MT, Grinstaff MW, Setton LA. Photocrosslinkable hyaluronan as a scaffold for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):391-7.
187. Newman AP. Articular cartilage repair. *Am J Sports Med.* 1998;26(2):309-24.
188. Nixon AJ, Haupt JL, Frisbie DD, Morisset SS, McIlwraith CW, Robbins PD et al. Gene-mediated restoration of cartilage matrix by

combination insulin-like growth factor-I/interleukin-1 receptor antagonist therapy. *Gene Ther.* 2005; 12(2):177-86.

189. Nishida Y, Knudson CB, Kuettner KE, Knudson W. Osteogenic protein-1 promotes the synthesis and retention of extracellular matrix within bovine articular cartilage and chondrocyte cultures. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000; 8(2):127-36.

190. O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS. The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391:190-207.

191. Oliveira JT, Crawford A, Mundy JM, Moreira AR, Gomes ME, Hatton PV et al. A cartilage tissue engineering approach combining starch-polycaprolactone fibre mesh scaffolds with bovine articular chondrocytes. *J Mater Sci Mater Med.* 2007; 18(2):295-302.

192. Ossendorf C, Kaps C, Kreuz PC, Burmester GR, Sittlinger M, Erggelet C. Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):R41.

193. Pacifici M, Koyama E, Shibukawa Y, Wu C, Tamamura Y, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M. Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;68:74-86.

194. Pagnotto MR, Wang Z, Karpie JC, Ferretti M, Xiao X, Chu CR. Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther.* 2007;14(10):804-13.

195. Pässler HH. Microfracture for treatment of cartilage defects. *Zentralbl Chir.* 2000;125(6):500-4.

196. Paul J, Sagstetter A, Kriner M, Imhoff AB, Spang J, Hinterwimmer S. Donor-site morbidity after osteochondral autologous transplantation for lesions of the talus. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(7):1683-8.

197. Pavesio A, Abatangelo G, Borrione A, Brocchetta D, Hollander AP, Kon E et al. Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment

of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. Novartis Found Symp. 2003; 249:203-17.

198. Peretti GM, Randolph MA, Villa MT, Buragas MS, Yaremchuk MJ. Cell-based tissue-engineered allogeneic implant for cartilage repair. *Tissue Eng.* 2000;6(5):567-76.

199. Peretti GM, Xu JW, Bonassar LJ, Kirchoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng.* 2006; 12(5):1151-68.

200. Pérez Olmedilla M, Garcia Giralt N, Pradas MM, Ruiz PB, Gómez Ribelles JL, Palou EC et al. Response of human chondrocytes to a non-uniform distribution of hydrophilic domains on poly (ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymers. *Biomaterials.* 2006;27(7):1003-12.

201. Petersen W, Zelle S, Zantop T. Arthroscopic implantation of a three dimensional scaffold for autologous chondrocyte transplantation. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2008;128(5):505-8.

202. 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.

203. Pfeiffer E, Vickers SM, Frank E, Grodzinsky AJ, Spector M. The effects of glycosaminoglycan content on the compressive modulus of cartilage engineered in type II collagen scaffolds. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 16(10):1237-44.

204. Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat.* 1997;191:1-13.

205. Popko M, Bleys RL, De Groot JW, Huizing EH. Histological structure of the nasal cartilages and their perichondrial envelope. I. The septal and lobular cartilage. *Rhinology.* 2007;45(2):148-52.

206. Potter HG, Foo LF. Magnetic resonance imaging of articular cartilage: trauma, degeneration and repair. *Am J Sports Med.* 2006;34(4):661-77.

207. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276:71-4.
208. Pulkkinen HJ, Tiitu V, Valonen P, Hamalainen ER, Lammi MJ, Kiviranta I. Recombinant human type II collagen as a material for cartilage tissue engineering. *Int J Artif Organs*. 2008;31(11):960-9.
209. Pulliainen O, Vasara AI, Hyttinen MM, Tiitu V, Valonen P, Kellomäki M et al. Poly-L-D-lactic acid scaffold in the repair of porcine knee cartilage lesions. *Tissue Eng*. 2007; 13(6):1347-55.
210. 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.
211. Quarto R, Campanile G, Cancedda R, Dozin B. Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis. *J Cell Biol*. 1992;119(4):989-95.
212. Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *J Biomed Mater Res*. 2000;50(2):101-9.
213. Rae P, Noble J. Arthroscopic drilling of osteochondral lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br*. 1989;71B:534.
214. Ragetly GR, Griffon DJ, Lee HB, Fredericks LP, Gordon-Evans W, Chung YS. Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cells chondrogenesis. *Acta Biomater*. 2009 (en prensa).
215. Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Bräuer R. Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998;6(1):50-65.

216. Reddi AH. Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:73-78.
217. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater.* 2005;9:23-32.
218. Révillion-Carette F, Desbiens X, Meunier L, Bart A. Chondrogenesis in mouse limb buds in vitro: effects of dibutyryl cyclic AMP treatment. *Differentiation.* 1986; 33(2):121-9.
219. Rodgers BJ, Kulyk WM, Kosher RA. Stimulation of limb cartilage differentiation by cyclic AMP is dependent on cell density. *Cell Differ Dev.* 1989;28(3):179-87.
220. Rodrigo J, Steadman J, Silliman J. Improvement of full-thickness chondral defect healing in the human knee after debridement and microfracture using continuous passive motion. *Am J Knee Surg.* 1994;7:109-16.
221. Roessler BJ, Allen ED, Wilson JM, Hartman JW, Davidson BL. Adenoviral-mediated gene transfer to rabbit synovium in vivo. *J Clin Invest.* 1993;92(2):1085-92.
222. Roughley PJ. Age-associated changes in cartilage matrix: implications for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001; 391:153-60.
223. Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater.* 2006;12:92-101.
224. Säämänen AM, Tammi M, Jurvelin J, Kiviranta I, Helminen HJ. Proteoglycan alterations following immobilization and remobilization in the articular cartilage of young canine knee (stifle) joint. *J Orthop Res.* 1990;8(6):863-73.
225. Sánchez-Guijo FM, Blanco JF, Cruz G, Muntion S, Gómez M, Carrancio S et al. Multiparametric comparison of mesenchymal stromal cells obtained from trabecular bone by using a novel isolation method with those obtained by iliac crest aspiration from the same subjects. *Cell Tissue Res.* 2009; 336(3):501-7.

226. Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. *J Orthop Res.* 1996; 14(6):937-45.
227. Scotti C, Buragas MS, Mangiavini L, Sosio C, Di Giancamillo A, Domeneghini C et al. A tissue engineered osteochondral plug: an in vitro morphological evaluation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007;15(11):1363-9.
228. 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.
229. Schuman L, Buma P, Versleyen D, de Man B, van der Kraan PM, van den Berg WB et al. Chondrocyte behaviour within different types of collagen gel in vitro. *Biomaterials.* 1995;16(10):809-14.
230. Sellards RA, Nho SJ, Cole BJ. Chondral injuries. *Curr Opin Rheumatol.* 2002;14(2):134-41.
231. Seol YJ, Lee JY, Park YJ, Lee YM, Young-Ku, Rhyu IC et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol Lett.* 2004;26(13):1037-41.
232. Seradge H, Kutz JA, Kleinert HE, Lister GD, Wolff TW, Atasoy E. Perichondrial resurfacing arthroplasty in the hand. *J Hand Surg Am.* 1984;9(6):880-6.
233. Serrano Aroca A, Campillo Fernández AJ, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M, Gallego Ferrer G, Pissis P. Porous poly(2-hydroxyethyl acrylate) hydrogels prepared by radical polymerisation with methanol as diluent. *Polymer.* 2004;45: 8949-55.
234. 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.
235. Shi DH, Cai DZ, Zhou CR, Rong LM, Wang K, Xu YC. Development and potential of a biomimetic chitosan/type II collagen scaffold for cartilage tissue engineering. *Chin Med J (Engl).* 2005;118(17):1436-43.

236. Sohn DH, Lottman LM, Lum LY, Kim SG, Pedowitz RA, Coutts RD et al. Effect of gravity on localization of chondrocytes implanted in cartilage defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;394:254-62.
237. Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res.* 1999; 17(2):205-13.
238. Solchaga LA, Yoo JU, Lundberg M, Dennis JE, Huibregtse BA, Goldberg VM et al. Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. *J Orthop Res.* 2000; 18(5):773-80.
239. Solchaga LA, Gao J, Dennis JE, Awadallah A, Lundberg M, Caplan AI, Goldberg VM. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng.* 2002;8(2):333-47.
240. Soria JM, Martínez Ramos C, Salmerón Sánchez M, Benavent V, Campillo Fernández A, Gómez Ribelles JL et al. Survival and differentiation of embryonic neural explants on different biomaterials. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 79(3):495-502.
241. Stark Y, Suck K, Kasper C, Wieland M, van Griensven M, Schepers T. Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Exp Toxicol Pathol.* 2006;57(4):305-11.
242. 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.
243. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo J. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391:362-9.
244. Steadman JR, Briggs K, Rodrigo J, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 2003;19:477- 84.
245. Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(3):213.

246. Steinert AF, Nöth U, Tuan RS. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury*. 2008;39:97-113.
247. Steinert AF, Palmer GD, Pilapil C, Nöth U, Evans CH, Ghivizzani SC. Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(5):1127-39.
248. Steinwachs MR, Kreuz PC. Autologous chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with a type I/III collagen membrane: a prospective study with a 3-year follow-up. *Arthroscopy*. 2007;23(4):381-7.
249. Steinwachs MR, Guggi T, Kreuz PC. Marrow stimulation techniques. *Injury*. 2008;39:26-31.
250. Stone KR, Walgenbach AW, Freyer A, Turek TJ, Speer DP. Articular cartilage paste grafting to full-thickness articular cartilage knee joint lesions: a 2 to 12 year follow-up. *Arthroscopy*. 2006;22(3):291-9.
251. Szerb I, Hangody L, Duska Z, Kaposi NP. Mosaicoplasty: long term follow-up. *Bull Hosp Jt Dis*. 2005;63:54-62.
252. Tan W, Krishnaraj R, Desai TA. Evaluation of nanostructured composite collagen-chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Eng*. 2001;7(2):203-10.
253. Tanaka T, Komaki H, Chazono M, Fujii K. Use of a biphasic graft constructed with chondrocytes overlying a beta-tricalcium phosphate block in the treatment of rabbit osteochondral defects. *Tissue Eng*. 2005;11(1-2):331-9.
254. Tognana E, Borriore A, De Luca C, Pavesio A. Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage. *Cells Tissues Organs*. 2007;186(2):97-103.
255. Tomford WW, Springfield DS, Mankin HJ. Fresh and frozen articular cartilage allografts. *Orthopedics*. 1992;15(10):1183-8.

256. Tomita T, Hashimoto H, Tomita N, Morishita R, Lee SB, Hayashida K et al. In vivo direct gene transfer into articular cartilage by intraarticular injection mediated by HVJ (Sendai virus) and liposomes. *Arthritis Rheum.* 1997;40(5):901-6.
257. Toolan BC, Frenkel SR, Pachence JM, Yalowitz L, Alexander H. Effects of growth-factor-enhanced culture on a chondrocyte-collagen implant for cartilage repair. *J Biomed Mater Res.* 1996;31(2):273-80.
258. Trippel S, Cucchiarini M, Madry H, Shi S, Wang C. Gene therapy for articular cartilage repair. *Proc Inst Mech Eng H.* 2007;221(5):451-9.
259. Tsonis PA. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates chondrogenesis of the chick limb bud mesenchymal cells. *Dev Biol.* 1991;143(1):130-4.
260. Tsumaki N, Nakase T, Miyaji T, Kakiuchi M, Kimura T, Ochi T et al. Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J Bone Miner Res.* 2002;17(5):898-906.
261. Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(5):235-8.
262. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science.* 1965; 150:893-9.
263. Valhmu WB, Palmer GD, Dobson J, Fischer SG, Ratcliffe A. Regulatory activities of the 5'- and 3'-untranslated regions and promoter of the human aggrecan gene. *J Biol Chem.* 1998;273(11):6196-202.
264. Valhmu WB, Stazzone EJ, Bachrach NM, Saed-Nejad F, Fischer SG, Mow VC et al. Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression. *Arch Biochem Biophys.* 1998;353(1):29-36.
265. Vangness CT Jr. Radiofrequency use on articular cartilage lesions. *Orthop Clin North Am.* 2005;36(4):427-31.
266. van Susante JL, Buma P, van Osch GJ, Versleyen D, van der Kraan PM, van der Berg WB et al. Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand.* 1995;66(6):549-56.

267. van Susante JL, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials*. 1999; 20(13):1167-75.
268. Visna P, Pasa L, Cizmár I, Hart R, Hoch J. Treatment of deep cartilage defects of the knee using autologous chondrograft transplantation and by abrasive techniques: a randomized controlled study. *Acta Chir Belg*. 2004; 104(6):709-14.
269. Vizesi F, Oliver R, Smitham P, Gothelf T, Yu Y, Walsh WR. Influence of surgical preparation on the in-vivo response of osteochondral defects. *Proc Inst Mech Eng H*. 2007; 221(5):489-98.
270. von Schroeder HP, Kwan M, Amiel D, Coutts RD. The use of polylactic acid matrix and periosteal grafts for the reconstruction of rabbit knee articular defects. *J Biomed Mater Res*. 1991;25(3):329-39.
271. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br*. 1989;71(1):74-80.
272. Wakitani S. [Present status and perspective of articular cartilage regeneration]. *Yakugaku Zasshi*. 2007;127(5):857-63 (abstract).
273. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(1):74-9.
274. Waldman SD, Couto DC, Grynypas MD, Pilliar RM, Kandel RA. Multi-axial mechanical stimulation of tissue engineered cartilage: review. *Eur Cell Mater*. 2007;13:66-73.
275. Wang DA, Varghese S, Sharma B, Strehin I, Fermanian S, Gorham J et al. Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. *Nat Mater*. 2007; 6(5):385-92.

276. Wei F, Golenberg N, Kepich ET, Haut RC. Effect of intermittent cyclic preloads on the response of articular cartilage explants to an excessive level of unconfined compression. *J Orthop Res.* 2008;26(12):1636-42.
277. Wei Y, Hu Y, Hao W, Han Y, Meng G, Zhang D et al. A novel injectable scaffold for cartilage tissue engineering using adipose-derived adult stem cells. *J Orthop Res.* 2008; 26(1):27-33.
278. Welsch U. Tejido cartilaginoso. *Histología Sobotta.* 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 127-31.
279. Wendt D., Jakob M., Martin I. Bioreactor based engineering of osteochondral grafts: from model systems to tissue manufacturing. *J Biosci Bioeng.* 2005;100(5):489-94.
280. Wescoe KE, Schugar RC, Chu CR, Deasy. The role of the biochemical and biophysical environment in chondrogenic stem cell differentiation assays and cartilage tissue engineering. *Cell Biochem Biophys.* 2008;52(2):85-102.
281. Wezeman FH. Morphological foundations of precartilage development in mesenchyme. *Microsc Res Tech.* 1998; 43(2):91-101.
282. Widuchowski W, Lukasik P, Kwiatkowski G, Faltus R, Szyluk K, Widuchowski J, Koczy B. 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.
283. Willers C, Chen J, Wood D, Xu J, Zheng MH. Autologous chondrocyte implantation with collagen bioscaffold for the treatment of osteochondral defects in rabbits. *Tissue Eng.* 2005;11(7-8):1065-76.
284. Williams RJ. Articular cartilage repair: clinical approach and decision making. *Operative techniques in orthopaedics.* 2006;16(4): 218-26.
285. Williams RJ, Harnly HW. Microfracture: indications, technique and results. *Instr Course Lect.* 2007;56:419-28.

286. Williams RJ, Ranawat AS, Potter HG, Carter T, Warren RF. Fresh stored allografts for the treatment of osteochondral defects of the knee. *JBJS*. 2007;89(4):718-26.
287. Wise JK, Yarin AL, Megaridis CM, Cho M. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on oriented nanofibrous scaffolds: engineering the superficial zone of articular cartilage. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(4):913-21.
288. Włodarski KH, Galus K. Osteoblastic and chondroblastic response to a variety of locally administered immunomodulators in mice. *Folia Biol (Praha)*. 1992; 38(5):284-92.
289. Xie WF, Kondo S, Sandell LJ. Regulation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by the transcription factor AP-2. *J Biol Chem*. 1998;273(9):5026-32.
290. Xu XL, Lou J, Tang T, Ng KW, Zhang J, Yu C, Dai K. Evaluation of different scaffolds for BMP-2 genetic orthopedic tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;75(2):289-303.
291. Xu J, Wang W, Ludeman M, Cheng K, Hayami T, Lotz JC et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate gels. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(5):667-80.
292. Yamane S, Reddi AH. Induction of chondrogenesis and superficial zone protein accumulation in synovial side population cells by BMP-7 and TGF-beta1. *J Orthop Res*. 2008;26(4):485-92.
293. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T et al. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A*. 2006;78(1):1-11.
294. Yamashita F, Sakakida K, Suzu F, Takai S. The transplantation of an autogeneic osteochondral fragment for osteochondritis dissecans of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 1985;201:43-50.

295. Yan J, Qi N, Zhang Q. Rabbit articular chondrocytes seeded on collagen-chitosan-GAG scaffold for cartilage tissue engineering in vivo. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2007;35(4):333-44.
296. Yates KE, Allemann F, Glowacki J. Phenotypic analysis of bovine chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: effect of serum substitutes. *Cell Tissue Bank.* 2005;6(1):45-54.
297. Yen YM, Cascio B, O'Brien L, Stalzer S, Millett PJ, Steadman JR. Treatment of osteoarthritis of the knee with microfracture and rehabilitation. *Med Sci Sports Exerc.* 2008; 40(2):200-5.
298. Yetkinler DN, Greenleaf JE, Sherman OH. Histologic analysis of radiofrequency energy chondroplasty. *Clin Sports Med.* 2002;21(4):649-61.
299. Zheng L, Fan HS, Sun J, Chen XN, Wang G, Zhang L et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by collagen-based hydrogel: An in vivo study. *J Biomed Mater Res A.* 2009 (en prensa).
300. Zhou G, Lefebvre V, Zhang Z, Eberspaecher H, de Crombrughe B. Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. *J Biol Chem.* 1998;273(24):14989-97.
301. Zhou XZ, Leung VY, Dong QR, Cheung KM, Chan D, Lu WW. Mesenchymal stem cell-based repair of articular cartilage with polyglycolic acid-hydroxyapatite biphasic scaffold. *Int J Artif Organs.* 2008;31(6):480-9.
302. Zwingmann J, Mehlhorn AT, Südkamp N, Stark B, Dauner M, Schmal H. Chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes differs in biodegradable PGA/PLA scaffolds. *Tissue Eng.* 2007;13(9):2335-43.