



Universidad
de La Laguna

Escuela de Doctorado
y Estudios de Posgrado

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

Biomateriales, factores de crecimiento y células para regeneración de cartílago

AUTOR/A

RICARDO

REYES

RODRIGUEZ

DIRECTOR/A

CARMEN MARIA

EVORA

GARCIA

CODIRECTOR/A

ARACELI RITA

DELGADO

HERNANDEZ

DEPARTAMENTO O INSTITUTO UNIVERSITARIO

FECHA DE LECTURA

06/10/2017



Universidad de La Laguna

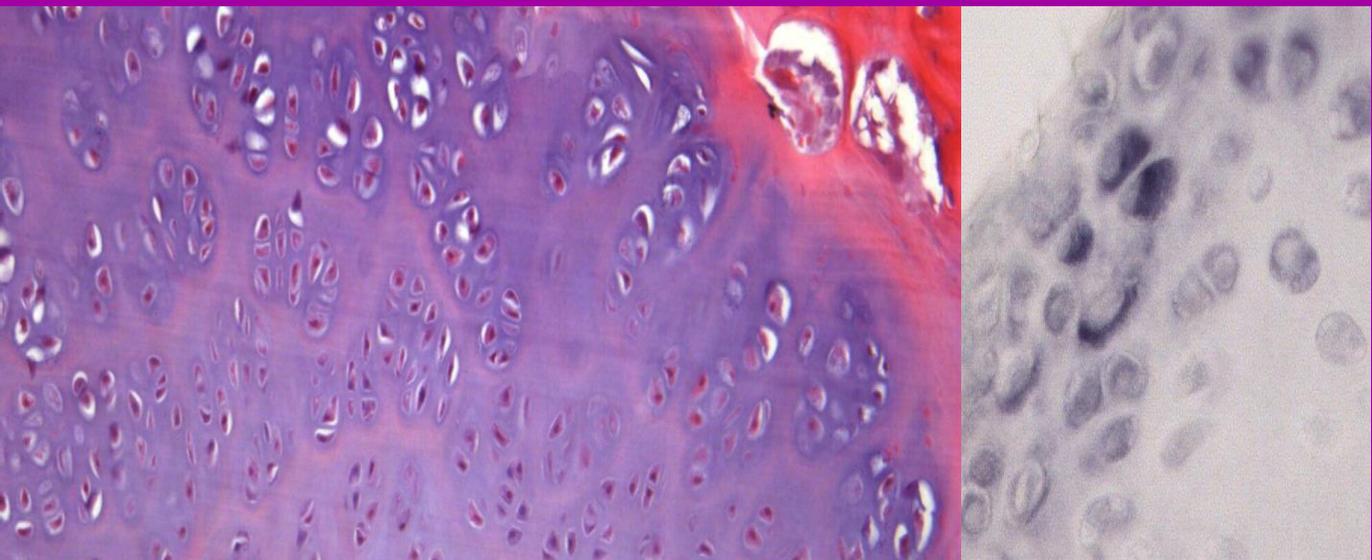
Facultad de Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL



Sección Farmacia

Biomateriales, factores de crecimiento y células para regeneración de cartílago



Ricardo Reyes Rodríguez

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica



Universidad de La Laguna

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**BIOMATERIALES, FACTORES DE CRECIMIENTO Y
CÉLULAS PARA REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO**

Autor: Ricardo Reyes Rodríguez

Directora: Dra. Carmen María Évora García

Codirectora: Dra. Araceli Rita Delgado Hernández

Julio 2017



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Ingeniería Química y

Tecnología Farmacéutica

**“Biomateriales, factores de crecimiento y células para
regeneración de cartílago”**



Sección de Farmacia

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor en
Farmacia por la Universidad de La Laguna por:**

D. Ricardo Reyes Rodríguez

Julio 2017



Universidad
de La Laguna

Facultad de Ciencias de la Salud. Sección Farmacia
Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica

CARMEN MARÍA ÉVORA GARCÍA y ARACELI RITA DELGADO HERNÁNDEZ, Catedrática y Profesora Titular respectivamente, del área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de La Laguna,

CERTIFICAN:

1. Que D. **Ricardo Reyes Rodríguez**, Licenciado en Farmacia y Doctor en Biología por la Universidad de La Laguna, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título **“Biomateriales, factores de crecimiento y células para regeneración de cartílago”**.
2. Que revisada la memoria de Tesis Doctoral y, previo informe favorable de la Comisión Académica del Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud, expresan su conformidad para que sea defendida ante el Tribunal correspondiente designado al efecto, ya que la misma reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en La Laguna, a 18 de Julio de 2017

Dra. Carmen María Évora García

Dra. Araceli Delgado Hernández

Directora

Codirectora

Esta tesis doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos y convenios de investigación:

- “Desarrollo de estructuras polimérico-inorgánicas conteniendo factores de crecimiento de aplicación en hueso” (MAT2008-02632). Ministerio de Ciencia e Innovación.
- “Scaffolds porosos bioactivos para regeneración ósea” (MAT2011-23819). Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Convenio Hospitén Holding, S.L.-Universidad de La Laguna (Convenio CI02320701).
- Proyecto MOTIVA de la ACIISI (Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información Gobierno de Canarias).

A mis padres y hermana

A Txema

En primer lugar quiero dar las GRACIAS, a las Dras. Évora García y Delgado Hernández por decidirse por mí, entre otros tantos participantes, hace ya algo más de ocho años. A partir de ese momento comenzó, primero una relación laboral y en la actualidad una colaboración, que hasta el momento ha sido muy productiva y que espero lo siga siendo...Gracias otra vez.

Quiero también dar las GRACIAS, a la Dra. Esther Sánchez, miembro del equipo de investigación en aquel momento, cuya opinión fue también fundamental en aquella decisión. Quiero agradecerle igualmente su implicación y tesón en el trabajo diario de laboratorio que ha sido fundamental para el desarrollo de esta tesis. También, como no, su amistad y su apoyo.

Quiero agradecer a todos los profesores/as del área de Tecnología Farmacéutica su acogida y su apoyo en todos estos años de trabajo en el departamento, a Pepe Fariña, Ana Santoveña, Mabel Soriano, Matías Llabrés, Alexis Oliva y Obdulia Munguía. Agradecer también el uso de todas las instalaciones e infraestructuras del área de Tecnología Farmacéutica.

Quiero agradecer la colaboración, apoyo y amistad al resto de doctores, doctorandos e investigadores que han pasado por el área de Tecnología Farmacéutica a lo largo de estos años, especialmente a la Dra. Martina Pec y a Emiliano Pizarro por su amistad, apoyo y colaboración en parte de esta tesis.

Al Dr. Hernández Lecuona, por su simpatía y ese punto de despiste que lo hacen tan especial y como no, por su inestimable ayuda con la cirugía animal.

A la Dra. Damas Hernández, por su amistad y por su inestimable ayuda con el tratamiento estadístico de los datos. Gracias Carmela.

A María y a Carlos por su apoyo, simpatía y valiosa ayuda en parte de esta tesis.

A Beatriz de la Riva, Arístides de León, Juanjo Perera, Raquel Vayas, David Rentería, Konny Flämig, Ana Beloqui y tantos otros que han pasado por el departamento a lo largo de estos años.

A Margarita de la Rosa (Marga), por su ayuda incondicional, disposición en todo momento y por su enorme eficacia.

Al área de Biología Celular de la Universidad de La Laguna, así como a todo el personal de la misma, el uso de sus instalaciones e infraestructuras para el desarrollo de parte de esta tesis.

Al Estabulario central de la Universidad de La Laguna y a todo su personal por el mantenimiento y cuidado de los animales de experimentación utilizados en este estudio.

A tod@s mis colegas, much@s, amig@s entrañables y compañer@s de fatiga, con quien comparto la pasión por la ciencia y la búsqueda de la verdad en los hechos.

Quiero dar las gracias a mi familia por apoyar siempre mis decisiones.

Finalmente quiero dar las gracias a una persona muy importante en mi vida, el que soporta mí día a día y me acompaña casi a cada minuto, a Txema, GRACIAS por estar ahí.

***“No hay que temer a nada en la vida, sólo
tratar de comprender”***

Marie Curie

Abreviaturas

ACPCs: Células progenitoras del cartílago articular.

ALG: Alginato.

ALP: Fosfatasa alcalina.

AT: Azul de toluidina.

BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas.

MOs: Médula ósea.

C: Condrocitos.

CA: Cartílago articular.

Col I, II, IX, X: Colágenos I, II, IX y X.

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EMA: European Medicines Agency.

ESC: Células de origen embrionario.

FBS: Suero bovino fetal.

FGF: Superfamilia del factor de crecimiento fibroblástico (Fibroblast growth factor).

FGF-2: factor de crecimiento fibroblástico-2.

CGC: Células fagocíticas multinucleadas.

FC: Factor de crecimiento.

FCD: Fixed-Change Density.

FDA: Food and Drug Administration.

TC: Tejido conjuntivo.

GAG: Glicosaminoglicanos.

GAM: Matrices génicas activadas.

H: Hueso.

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.

H-Er: Hematoxilina-Eritrosina.

HT: Contenido hemático.

HE: Hueso esponjoso.

HS: Hueso subcondral.

IGF: Superfamilia del factor de crecimiento insulínico (Insulin-like growth factor).

IGF-I: Factor de crecimiento insulínico-I.

IgG: Inmunoglobulina G.

iPSC: Células pluripotenciales inducidas.

kDa: Kilodalton.

MEC: Matriz extracelular.

Ms: Microesferas.

MMP: Metaloproteasas de la matriz extracelular.

MSC: Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea.

NC: Neocartílago.

OA: Osteoartritis.

DO: Defecto osteocondral.

PBS: Tampón fosfato-salino (Phosphate buffer saline).

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Platelet derived growth factor).

PI: Ioduro de propidio.

PLA: Ácido poli-láctico.

PGA: Ácido poli-glicólico.

PLGA: Ácido poli-láctico-co-glicólico.

PTMG: poli-(tetrametilen-glicol).

PVA: Alcohol polivinílico.

PRP: Plasma rico en plaquetas.

SPU: Poliuretano segmentado.

p-i: postimplantación.

PM: Peso molecular.

rbC: Condrocitos de conejo.

rhBMP-2: Proteína morfogenética ósea-2 recombinante humana.

rhBMP-7: Proteína morfogenética ósea-7 recombinante humana.

Sc: Scaffold.

SEM: Microscopía electrónica de barrido (Scanning electron microscopy).

SPU: Poliuretano segmentado.

TC: Tejido conjuntivo.

TGF- β : Superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (Transforming growth factor - β).

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante- β 1.

TBS: Tampón tris salino (Tris Buffer Saline).

TLC: Cromatografía en capa fina.

VEGF: Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (Vascular endothelial growth factor).

XTT: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2*H*-Tetrazolium-5 Carboxanilide.

1. Introducción.....	25
1.1 Generalidades del tejido cartilaginoso.....	25
1.2 Composición del cartílago articular.....	27
1.2.1 Agua.....	27
1.2.2 Condrocitos.....	29
1.2.3 Colágenos.....	32
1.2.4 Glicosaminoglicanos (GAG).....	33
1.2.5 Proteoglicanos.....	34
1.2.6 Proteínas multiadhesivas.....	39
1.2.7 Zonación del cartílago articular.....	41
1.3 Aspectos funcionales del cartílago articular.....	46
1.3.1 Propiedades mecánicas del cartílago articular.....	47
1.3.2 Variaciones en las propiedades mecánicas del cartílago articular.....	49
1.4 Lesión del cartílago articular.....	50
1.4.1 Tipos de lesiones y respuesta natural.....	50
1.4.2 Aproximaciones clínicas en la reparación del cartílago articular.....	52
1.4.3 Ingeniería de tejidos en la reparación del cartílago articular.....	53
1.4.3.1 Tipo celular.....	54
1.4.3.2 Andamios-matrices 3D-scaffolds.....	56
1.4.3.3 Factores de crecimiento.....	60
1.4.4 Tendencias actuales en ingeniería de tejidos en la reparación del cartílago articular.....	64
2. Hipótesis de trabajo y objetivos.....	69
3. Materiales y métodos.....	73
3.1 Ensayos de doble capa.....	73
3.1.1 Preparación de las microesferas.....	73

3.1.2 Preparación del scaffold o implante de doble capa ALG-PLGA /SPU-PLGA.....	74
3.1.3 Ensayos de cesión <i>in vitro</i> de BMP-2 y TGF- β 1.....	77
3.1.4 Bioactividad de la BMP-2 y del TGF- β 1.....	77
3.1.5 Procedimiento quirúrgico.....	79
3.1.6 Experimentos de cesión <i>in vivo</i> y biodistribución de BMP-2 y TGF- β 1.....	81
3.1.7 Evaluación y puntuación histológica.....	82
3.1.8 Inmunohistoquímica.....	88
3.1.9 Análisis cuantitativo.....	90
3.1.10 Análisis estadístico.....	90
3.2 Ensayos de triple capa.....	91
3.2.1 Preparación de las microesferas.....	91
3.2.2 Preparación del scaffold o implante de triple capa alginato-PLGA.....	91
3.2.3 Células.....	91
3.2.3.1 Aislamiento y cultivo de células madre mesen- quimales derivadas de la médula ósea de conejo (MSC).	92
3.2.3.2 Aislamiento y cultivo de condrocitos de conejo (rbC).....	93
3.2.3.3 Carga de las células en el scaffold y tratamiento..	94
3.2.3.4 Tinción con Ioduro de propidio (PI).....	95
3.2.3.5 Cuantificación de células adheridas al scaffold...	96
3.2.4 Procedimiento quirúrgico. Evaluación histológica histomorfométrica e inmunohistoquímica.....	97
4. Resultados.....	101
4.1 Caracterización de las microesferas y del cilindro poroso de PLGA.....	101
4.2 Scaffold de doble capa ALG-PLGA.....	102
4.2.1 Caracterización del sistema.....	102

4.2.2 Cesión <i>in vitro</i> de BMP-2 y TGF- β 1.....	104
4.2.3 Bioactividad de la BMP-2 y el TGF- β 1.....	104
4.2.4 Cesión <i>in vivo</i> de BMP-2 y TGF- β 1.....	105
4.2.5 Biodistribución de la BMP-2 y el TGF- β 1.....	108
4.2.6 Análisis histológico.....	108
4.2.7 Puntuación histológica.....	116
4.3 Scaffold de doble capa SPU-PLGA.....	122
4.3.1 Caracterización del sistema.....	122
4.3.2 Cesión <i>in vitro</i> de BMP-2 y TGF- β 1.....	123
4.3.3 Cesión <i>in vivo</i> de BMP-2 y TGF- β 1.....	123
4.3.4 Biodistribución de la BMP-2 y el TGF- β 1.....	125
4.3.5 Análisis histológico.....	126
4.3.6 Puntuación histológica.....	133
4.4 Scaffold de triple capa ALG-PLGA.....	140
4.4.1 Caracterización del sistema.....	140
4.4.2 Condiciones de cultivo de MSC y condrocitos para ser expandidas en el scaffold	141
4.4.3 Análisis histológico.....	144
4.4.4 Puntuación histológica.....	149
5. Discusión.....	157
5.1 Sistemas de doble capa conteniendo BMP-2 y TGF- β 1..	157
5.2 Sistema de triple capa conteniendo células, BMP-2 o combinaciones de ambos.....	166
6. Conclusiones.....	179
7. Bibliografía.....	183

Indice

Introducción

1. Introducción

1.1 Generalidades del tejido cartilaginoso

El cartílago es una variedad de tejido conjuntivo aneural, avascular y alinfático. Al igual que en otras variedades de tejido conjuntivo, los condrocitos, tipo celular exclusivo del cartílago, deriva de células madre mesenquimales (MSC) procedentes de la médula ósea (Mow et al., 1992). La matriz extracelular del cartílago (MEC) está compuesta de colágeno (60%), proteoglicanos (25%) y glucoproteínas (15%) y es sintetizada por los condrocitos (Buckwalter et al., 2005). Durante el desarrollo del sistema esquelético, el cartílago crece rápidamente y se mineraliza posteriormente para formar hueso. Durante la fase inicial del proceso de reparación de una fractura ósea, se produce la formación de un molde inicial de cartílago que posteriormente se osifica y mineraliza para restaurar el tejido lesionado. En el estado adulto, el cartílago se clasifica en tres tipos, hialino, elástico y fibroso (Krause y Cutts, 1994). El cartílago hialino presenta aspecto vítreo (gr. *hyalos*, vidrio) y forma los cartílagos costales, el cartílago articular presente en las uniones de las articulaciones, y los cartílagos de la nariz, laringe, tráquea y bronquios. El cartílago elástico se encuentra formando parte del cartílago de la epiglotis, del cartílago del pabellón auditivo externo y del conducto auditivo y en algunos de los pequeños cartílagos laríngeos. Histológicamente, el cartílago elástico es similar al cartílago

hialino con la diferencia de que el primero contiene una densa red de fibras elásticas finamente ramificadas (Krause y Cutts, 1997). El cartílago fibroso, a diferencia de los otros tipos de cartílago, contiene principalmente colágeno tipo I. Se puede encontrar en los labios intra-articulares, discos, meniscos y discos intervertebrales, y sirve como tejido de transición entre el tejido conjuntivo denso que forma los tendones y el cartílago hialino (Mow et al., 1992). En esta memoria, nos centraremos en el cartílago articular, que constituye una forma especializada de cartílago hialino. El cartílago articular reviste los extremos de las articulaciones sinoviales, donde provee una superficie de baja fricción, participa en la lubricación de las mismas y distribuye las fuerzas aplicadas al hueso subyacente. Tras una lesión, el cartílago articular es incapaz de regenerarse de forma natural y volver a constituir un tejido funcional (Chen et al., 2011), ello justifica los numerosos esfuerzos dirigidos hacia la ingeniería de tejidos. El cartílago articular contiene zonas que son específicas en sus diferentes funciones, la replicación de estas zonas puede ser de enorme importancia en la obtención de construcciones funcionales en el campo de la ingeniería de tejidos, y la histología puede servir como primera herramienta de análisis para discernir estas variaciones zonales (Hu y Athanasiou, 2003).

1.2 Composición del cartílago articular

El cartílago articular está compuesto por una fase fluida y una fase sólida. La fase fluida está formada por agua, con concentraciones fisiológicas de solutos iónicos y no-iónicos y constituye entre el 75-80% del peso húmedo del cartílago (Maroudas, 1979). Por peso húmedo, la fase sólida está compuesta de un 10% aproximadamente de condrocitos, entre un 10-30% de colágeno, de un 3-10% de proteoglicanos, aproximadamente un 10% de lípidos, y pequeñas cantidades de glicoproteínas (Muir, 1979). Las propiedades mecánicas, y por tanto la funcionalidad del cartílago, son consecuencia de las interacciones entre los distintos componentes de su MEC. Puesto que la organización y la composición del cartílago varían con la profundidad, sus propiedades mecánicas varían también en consecuencia (Hu y Athanasiou, 2003).

1.2.1 Agua

Constituye aproximadamente el 80% del peso húmedo del cartílago y es más abundante en las capas superficiales que en las capas profundas. En mínima cantidad se encuentra en el interior de las células donde participa en la difusión de los nutrientes. La mayor parte se encuentra en el espacio extracelular, aproximadamente un 30% está asociada a los espacios intrafibrilares dentro del colágeno y el resto se encuentra en el entramado de espacios presentes en la

MEC. En el agua extracelular se encuentran en disolución sales inorgánicas como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , etc.

La cantidad de agua depende de varios factores como son:

- a) Concentración de proteoglicanos y presión resultante de sus cargas negativas.
- b) Organización macromolecular del colágeno.
- c) Resistencia y rigidez del entramado de colágeno.

El contenido de agua no se distribuye de forma homogénea en el cartílago, disminuyendo su concentración desde aproximadamente un 80% en las capas superficiales hasta un 65% en las capas profundas. La mayor parte del agua puede desplazarse en el interior del tejido o bien ser expulsada fuera de él al aplicarse un gradiente de presión o comprimiendo la MEC sólida. La resistencia al flujo del agua que ofrece la MEC es muy alta, y por lo tanto la permeabilidad es muy baja. Esta resistencia al flujo y la presión del agua en el interior de la MEC son los dos mecanismos básicos que permiten al cartílago soportar cargas articulares muy altas. La afinidad del cartílago articular por el agua deriva de la naturaleza hidrofílica de los proteoglicanos y en menor medida de la del colágeno. La capacidad de los proteoglicanos para atraer agua se explica por 3 mecanismos físico-químicos:

- 1) La presión osmótica de Donnan, debida a la presencia de cationes en disolución en la MEC y que son necesarios para neutralizar las cargas negativas de los proteoglicanos.
- 2) Las fuerzas de repulsión electrostática debidas a las cargas fijas de las moléculas de proteoglicanos.
- 3) La tendencia entrópica de los proteoglicanos a ganar volumen cuando se encuentran en disolución.

En el cartílago articular, el grado de hidratación está determinado por el equilibrio entre la presión total ejercida por los proteoglicanos, consecuencia de la suma de los 3 efectos descritos, y las fuerzas de restricción desarrolladas por la red de colágeno (Martin-Hernández, 2002).

1.2.2 Condrocitos

Los condrocitos comprenden solamente entre el 1-5% del volumen del cartílago. Los condrocitos se diferencian a partir de MSC y son responsables del remodelado de la MEC, produciendo y secretando tanto los componentes que constituyen la propia MEC como las enzimas que la degradan (Mow et al., 1992). Al ser el cartílago un tejido avascular, los condrocitos obtienen los nutrientes mediante un proceso de difusión (Honner y Thompson, 1971; Lee et al., 1997). La nutrición de los condrocitos se realiza a partir del líquido sinovial y durante el desarrollo y la maduración del tejido también por difusión desde el estrato óseo subyacente. El paso de los nutrientes a través

de la MEC depende de la concentración, composición y organización de los proteoglicanos grandes, el tamaño y la carga eléctrica de las moléculas que deben difundir. Esta complejidad en la nutrición de los condrocitos hace que sus requerimientos de oxígeno sean mucho menores que los de otras células del organismo y que dependan principalmente de un metabolismo anaerobio (Vega-Álvarez et al., 2002).

Durante el movimiento articular, se produce una transferencia de masa a través del tejido por compresión y relajación del cartílago que resulta en la exudación y absorción de fluido. Una región pericelular que conecta al condrocito con la MEC circundante actúa como una especie de reservorio que es capaz de llenarse y vaciarse de líquido absorbiendo cargas mecánicas y proveyendo protección hidrodinámica al condrocito (Fig. 1.1) (Knight et al., 1998). La formación de esta MEC pericelular condrocítica parece estar dirigida por receptores de hialuronano (Knudson, 1993).

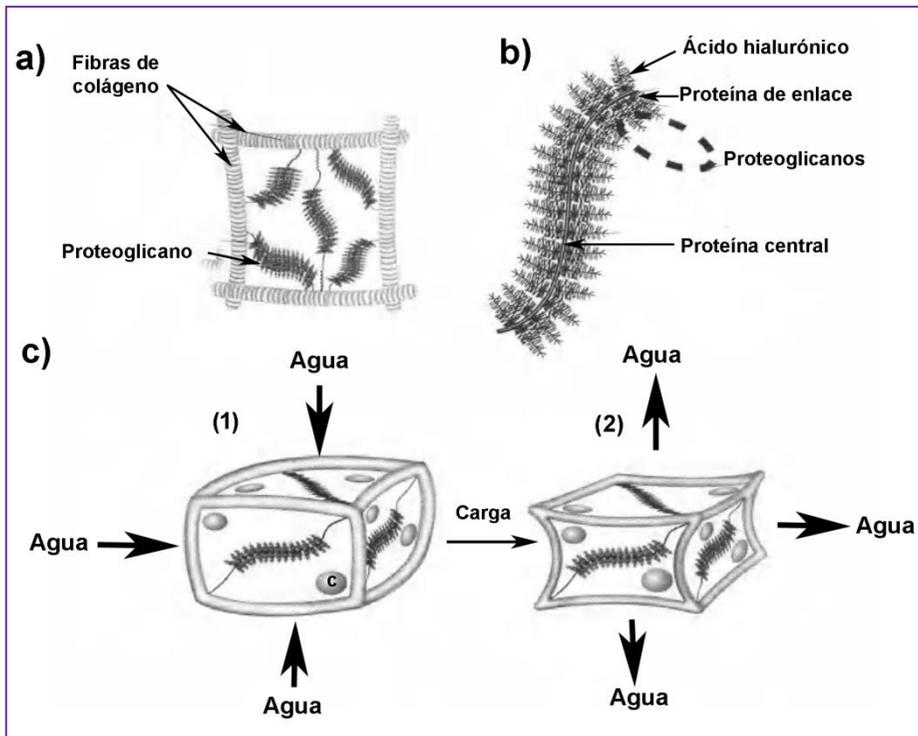


Figura 1.1 a) Unidad elemental del cartílago articular: agregados de proteoglicanos aniónicos que ocupan el espacio comprendido entre las fibras de colágeno. b) Agregado de proteoglicanos formado por un filamento central de ácido hialurónico al que están unidas las proteínas de enlace y las cadenas de proteoglicano. c) Comportamiento de una unidad del cartílago articular en reposo (1) y en un momento de carga (2). c: condrocito. (Trujillo Martín, 2005).

La región territorial de la MEC que viene a continuación, contiene fibrillas de colágeno que siguen el contorno pericelular en la zona más próxima al condrocito, pero que van desorganizándose a medida que se alejan del mismo. La región territorial de la MEC puede englobar más de un condrocito. La zona más alejada del condrocito, así como los grandes espacios entre los mismos, se conoce como MEC interterritorial y es la principal responsable de las propiedades mecánicas del cartílago (Poole, 1997).

1.2.3 Colágenos

El colágeno es una proteína de aproximadamente 1000 aminoácidos, que contiene un residuo de glicina cada tres aminoácidos. Cada molécula de colágeno se enrolla formando una hélice α en sentido levógiro, y tres cadenas en hélice α se enrollan una alrededor de la otra formando a su vez una triple hélice dextrógira denominada molécula de tropocolágeno. El colágeno contiene hidroxiprolina, que estabiliza la triple hélice, e hidroxilisina que le permite unirse covalentemente a carbohidratos (Eyre, 1980). Los tipos de colágeno presentes en el cartílago articular pueden clasificarse en formadores de fibrillas y no formadores de fibrillas; los colágenos tipo II y tipo XI forman fibrillas, los colágenos tipos VI, IX y X no forman fibrillas, aunque contribuyen igualmente a la estructura de la MEC. Las fibrillas de colágeno tipo II contribuyen a la resistencia a la tracción del cartílago (Kempson et al., 1976). El grosor de las fibrillas de colágeno tipo II se ve afectado por otros tipos de colágeno y varía con la profundidad del cartílago. El colágeno tipo II es el más abundante en el cartílago hialino articular, constituyendo entre el 90-95% del colágeno de la MEC. Se asocia al colágeno tipo XI formando una especie de malla. El colágeno tipo XI controla el diámetro de la fibrillas. El colágeno tipo VI es un colágeno microfibrilar que forma fibras elásticas y se localiza preferentemente en la región pericelular de los condrocitos (Ayad et al., 1984). El colágeno tipo IX se clasifica

como un colágeno asociado a fibras con triple hélice interrumpida y puede funcionar actuando como nexo de unión entre las fibrillas de colágeno y el agregano (Vaughan et al., 1988; Smith y Brandt, 1992). El colágeno tipo X se clasifica como un colágeno formador de redes, y aunque su función no está del todo aclarada, se encuentra en la zona de cartílago calcificada y mineralizada, en concreto la zona de transición entre el cartílago y el hueso subcondral. Dado que los colágenos tipo II, VI, IX, X y XI sólo se encuentran en cantidades importantes en la MEC del cartílago, se ha acordado en denominarlos colágenos condroespecíficos. Las fibrillas de colágeno se estabilizan por la proteína oligomérica de la MEC del cartílago (COMP), una proteína de 100.000 kDa que está presente en el cartílago y en los tendones (Hedbom et al., 1992) y que posee numerosos sitios de unión al colágeno.

1.2.4 Glicosaminoglicanos (GAG)

Los glicosaminoglicanos (GAG) son largas cadenas de polisacáridos no ramificados, que consisten en la repetición de unidades de disacáridos (Fosang y Hardingham, 1996). Contienen normalmente un grupo sulfato (SO_4^{2-}) por disacárido. Aunque menos frecuente, existen disacáridos no sulfatados o con dos grupos sulfato. La presencia de numerosos disacáridos sulfatados y de grupos carboxilo ionizados (COO^-) confiere una carga global negativa a los GAG, lo cual es crucial en el control del grado de hidratación del

cartílago y en última instancia de las propiedades mecánicas de este tejido.

Los dos tipos principales de GAG presentes en el cartílago articular son el keratan sulfato y el condroitin sulfato. Ambos condroitin y keratan sulfato contienen variaciones dentro de sus propios grupos, tales como diferencias en las unidades de disacárido, grado de sulfatación y epimerización de aminoácidos. Por ejemplo, el condroitin sulfato puede ser dividido en condroitin A, B y C, cada uno con propiedades diferentes. El condroitin sulfato tiene mayor peso molecular, aproximadamente 20 kDa, mientras que las cadenas de keratan sulfato presentan pesos moleculares entre 5 y 15 kDa. La biosíntesis y el control de ambos GAG no están aún bien comprendidos. Se ha observado que la cantidad de keratan sulfato en el cartílago aumenta con la edad (Mow et al., 1992; Woessner y Howell, 1993). La ratio de los dos GAG también varía con la profundidad del cartílago. Otros GAG presentes en el cartílago incluyen dermatan sulfato, que es condroitin sulfato en el cual algunas de las unidades de GAG presentan ácido L-idurónico, epímero del ácido D-glucurónico y, heparan sulfato (Woessner y Howell, 1993).

1.2.5 Proteoglicanos

Los proteoglicanos son una clase especial de glicoproteínas con largas cadenas de GAG no ramificadas y con alta densidad de cargas (Fosang y Hardingham, 1996). El tipo más abundante de

proteoglicano presente en el cartílago es el agrecano, el cual confiere resistencia a la compresión (Kempson et al., 1976). Otros proteoglicanos incluyen la decorina, el biglicano y la fibromodulina.

El agrecano está formado por un núcleo central de proteína de alto peso molecular (aprox. 250 kDa) con cadenas de GAG unidas, principalmente condroitin sulfato y keratan sulfato. Cada monómero de agrecano contiene aproximadamente 100 cadenas de condroitin sulfato y keratan sulfato. El monómero de agrecano se asemeja a un cepillo o escobilla, ya que las cadenas de GAG, con sus altas concentraciones de grupos sulfato y carboxilo ionizados, espaciados 1-1,5 nm, hace que se repelan las unas a las otras confiriendo ese aspecto. Expresados mayoritariamente en tejidos cartilagosos, los agregados de agrecano se estabilizan con ácido hialurónico (hialuronano), un polisacárido no ramificado con peso molecular superior a varios millones de kDa y unión no covalente a proteínas (Fig. 1.2).

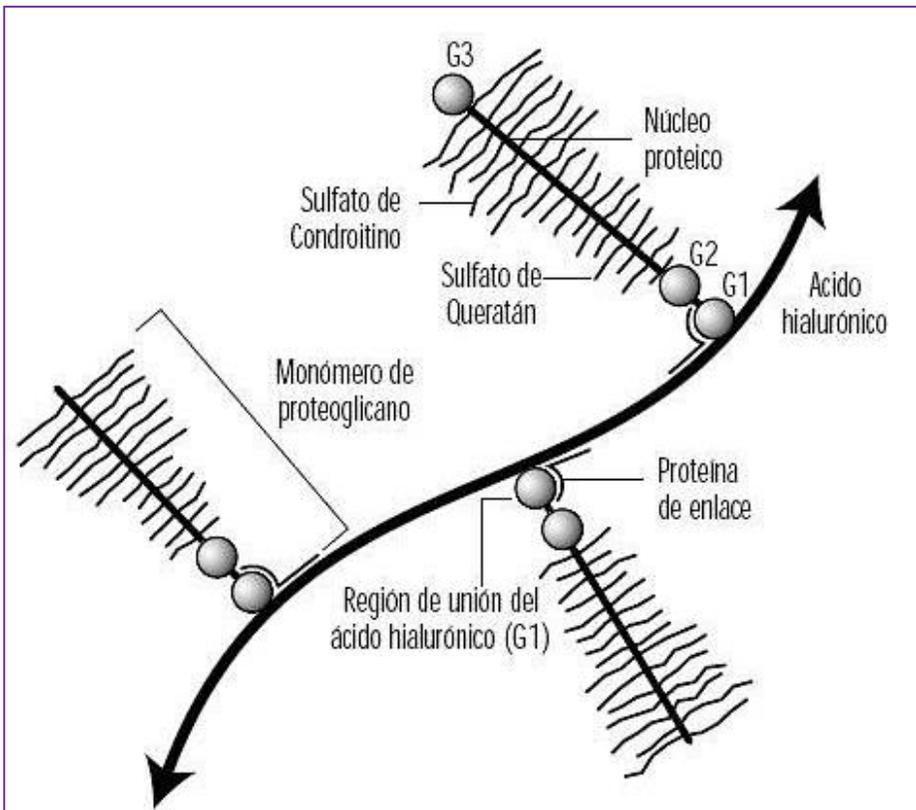


Figura 1.2. Representación esquemática que muestra los monómeros de agrecano asociados a la molécula central de ácido hialurónico. G1, G2 y G3 son proteínas globulares que estabilizan y enlazan el monómero de agrecano al ácido hialurónico (Tomado de Riihimäki Hilkkka y Viikari-Juntura Eira, 2001).

La carga negativa general del agrecano, denominada densidad de cambio fijo (FCD fixed-charge density), atrae cationes desde la fase fluida. De acuerdo con la ley de distribución iónica de Donnan, siempre hay mayor densidad de partículas cargadas en el tejido que en el fluido circundante (Lai et al., 1993). Como resultado, esta diferencia en la concentración iónica crea una presión osmótica positiva, conocida como presión osmótica de Donnan, lo que provoca que la MEC se hinche (Maroudas, 1979; Broom y Poole, 1990; Lai et

al., 1993). Esta capacidad de hinchamiento es equilibrada por las fibrillas de colágeno entrecruzadas que contiene el agregano (Fig. 1.3).

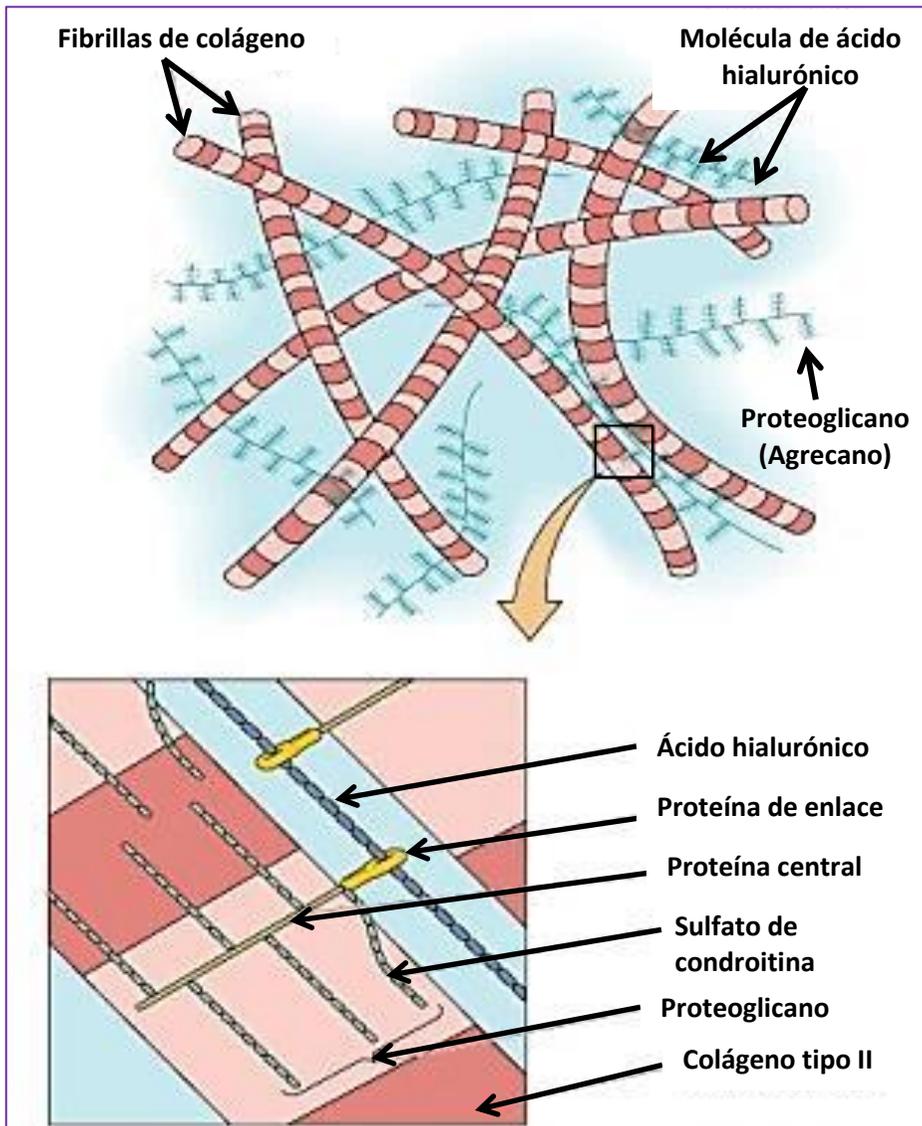


Figura 1.3. Esquema de la relación de moléculas de agregano con fibras de colágeno. El recuadro muestra una ampliación de la molécula de agregano que indica la proteína central de la molécula de proteoglicano a la cual se fijan los glicosaminoglicanos. La proteína central está unida al ácido hialurónico por proteínas de enlace. (Adaptado de Bloom & Fawcett, 1986).

El colágeno en esta situación es sometido por tanto a tensión, siendo el responsable de que el cartílago se arrugue cuando es separado del hueso subcondral (Maroudas, 1976; Broom y Poole, 1990; Maroudas y Grushko, 1990). Cuando el cartílago es sometido a presión, el agua intersticial absorbe una parte significativa de dicha presión (Soltz y Ateshian, 1998). El agua bajo esta situación, es forzada a salir fuera de la MEC, y la fricción entre el agua y los componentes de la MEC disipa la fuerza aplicada (Mansour y Mow, 1976; Ateshian et al., 1997). El cartílago se equilibra cuando la carga se equilibra con la presión osmótica. Cuando la carga cesa, el fluido intersticial (agua intersticial) es embebido de nuevo hacia el interior de la red de agregano. De este modo, el papel biomecánico del agregano en el cartílago es proporcionar rigidez frente a las fuerzas de compresión, proporcionar el efecto de la presión osmótica de Donnan, determinar la permeabilidad del cartílago al agua y regular el contenido de agua en la MEC (Ateshian et al., 1997).

En el cartílago articular, la decorina y el biglicano son sintetizados con condroitin sulfato o dermatan sulfato. La decorina es abundante en la MEC y se presenta unida a la fibronectina (Schmidt et al., 1994) y al TGF- β (Hildebrand et al., 1994). Parece retrasar la formación de las fibrillas de colágeno *in vitro* (Vogel y Trotter, 1987; Schmidt et al., 1991). El biglicano no parece interactuar con las fibrillas de colágeno (Brown y Vogel, 1989), y se localiza alrededor de la matriz pericelular

(Bianco et al., 1990). La fibromodulina se une específicamente al colágeno tipo II, y parece jugar un papel en la formación y mantenimiento de las fibrillas de colágeno (Hedlund et al., 1994).

1.2.6 Proteínas multiadhesivas

Se denominan también proteínas no colágenas y glicoproteínas no ligadas a proteoglicanos. Estas pequeñas proteínas con función reguladora y estructural median las interacciones entre los condrocitos y los demás componentes de la MEC, y tienen valor clínico como marcadores de recambio y degeneración del cartílago (Ross y Pawlina, 2007). Algunas de estas proteínas son la anchorina CII (anexina V del cartílago), proteína de 34 kDa que actúa como receptor del colágeno en los condrocitos (Ross y Pawlina, 2007), y la tenascina y la fibronectina, que median igualmente interacciones entre el condrocito y otros componentes de la MEC distintos del colágeno (Ross y Pawlina, 2007).

La tabla 1.1 resume los principales componentes menores presentes en el cartílago articular y sus principales funciones.

Tabla 1.1 Principales componentes menores presentes en el cartílago articular y sus posibles funciones. PM: peso molecular.

Proteína/Proteoglicano	PM (kDa)	Función
Anchorina	34	Unión del colágeno II
Biglicano	40	Regulación del crecimiento tisular
Chondroadherina	38	Desconocida
Decorina	39	Modula la formación de fibras de colágeno
Fibromodulina	59	Modula la formación de fibras de colágeno
Fibronectina	550	Adhesión de los condrocitos a la MEC
Proteínas de unión	45	Unión de proteoglicanos al hialuronan
Prolargina	58	Desconocida

Tabla 1.2. Composición cualitativa del cartílago hialino.

Agua

Colágenos (II,V,VI, IX, X, XI)

Proteoglicanos: Agrecanos

Condroitin sulfato

Queratán sulfato

Dermatán sulfato

Biglicano, Decorina, Fibromodulina

Hialuronato

Glicoproteínas:

Receptores

Estructurales

Moléculas de adhesión:

Calpactinas

Fibronectina

Laminina

Integrinas

Lípidos

Proteasas: Catepsinas

Serin-proteasas

Metaloproteasas

Inhibidores de proteinasas: α -2-macroglobulinas, TIMPs (Inhibidores tisulares de las metaloproteasas)

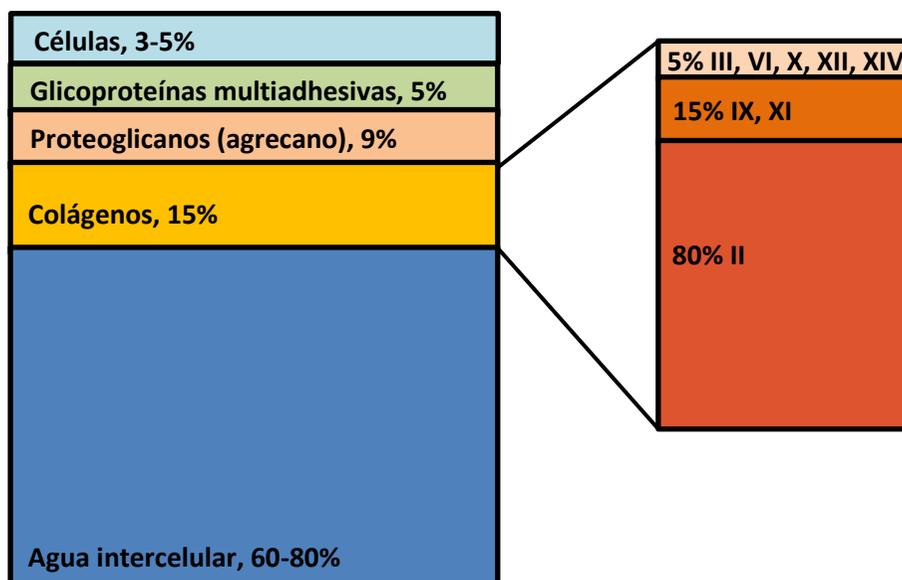


Figura 1.4. Composición porcentual media del cartílago articular (Adaptado de Ross y Pawlina, 2007)

1.2.7 Zonación del cartílago articular

El cartílago articular puede dividirse en cuatro zonas diferenciadas que difieren tanto en su composición como en sus propiedades mecánicas. Partiendo de la superficie articular, el cartílago puede dividirse en zona superficial, zona intermedia, zona profunda y zona calcificada (Fig. 1.5).

El contenido en proteoglicanos se incrementa desde un 15% (peso seco) en la zona superficial hasta un máximo de un 25% (peso seco) en la zona intermedia, disminuyendo hasta el 20% en la zona profunda. El contenido en colágeno varía desde un 86% (peso seco) en la zona superficial hasta un 67% (peso seco) en la zona profunda. El contenido en agua también disminuye linealmente con respecto a la

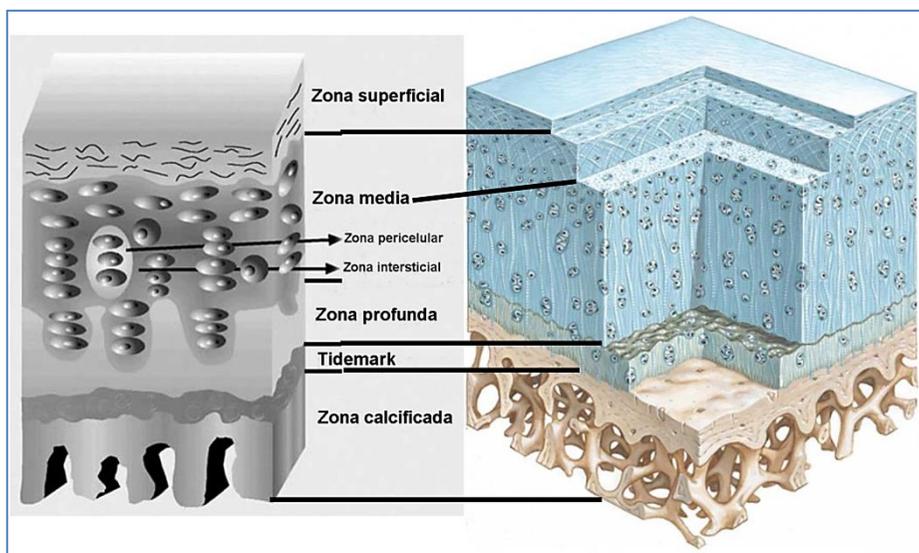


Figura 1.5. Esquemas gráficos que muestran la distribución en zonas del cartílago articular, así como las diferentes zonas dentro de la MEC. (Vega-Álvarez et al., 2002; Sopena et al., 2004)

profundidad, desde aproximadamente un 84% en la superficie a un 40-60% en la zona profunda (Maroudas, 1979). A causa de las diferencias en composición y organización de las distintas zonas, las propiedades mecánicas de las mismas también son diferentes, y los esfuerzos por replicar la función del cartílago usando la ingeniería de tejidos, deberían también estar encaminados a mimetizar la función de dichas zonas.

Cubriendo la zona superficial se encuentra la lámina splendens, una cubierta acelular compuesta de colágeno tipo II alineada en la dirección de la fuerza de cizalla que sirve como superficie de deslizamiento. La lámina splendens permite también la difusión de pequeñas moléculas, tales como la glucosa, mientras que retiene los

componentes de la MEC en el interior del cartílago. Al igual que la lámina splendens, la zona superficial contiene fibrillas de colágeno II densamente empaquetadas así como una densidad baja de condrocitos de morfología aplanada y elongada. Tanto los condrocitos como las fibrillas de colágeno están orientadas en la dirección de la fuerza de cizalla. La zona superficial, junto con la lámina splendens, comprende entre el 10-20% del grosor total del cartílago articular, y los colágenos y proteoglicanos presentes en ella, están fuertemente interconectados, posiblemente para soportar la tensión causada por el cizallamiento del cartílago durante el movimiento de la articulación (Buckwalter et al., 1991). El colágeno en la zona superficial también juega un papel en la permeabilidad del cartílago a los fluidos. Se ha observado que la permeabilidad se incrementa cuando la zona superficial del cartílago articular se elimina (Chu et al., 1995a,b) o cuando las fibrillas de colágeno se eliminan (Guilak et al., 1999). La zona intermedia contiene fibras de colágeno orientadas al azar, aunque esta aleatoriedad puede ser interpretada como una transición de la orientación tangencial a la orientación radial de las mismas. La zona intermedia posee el contenido más alto en proteoglicanos de todas las capas y es la más gruesa de todas, constituyendo entre el 40-60% del grosor total del cartílago. La zona intermedia puede contribuir mayoritariamente a la resistencia debida a fuerzas de compresión (Schinagl et al., 1997). Los condrocitos en esta zona

presentan morfología redondeada o esférica (Maroudas, 1979). En la zona profunda, fibras de colágeno orientadas radialmente se introducen dentro de la zona calcificada para reforzar la unión entre el cartílago y el hueso. La zona profunda está separada de la zona calcificada por una línea de calcificación diferenciable (*tidemark*). Los condrocitos en la zona profunda se encuentran alineados formando columnas orientadas radialmente y presentan morfología elíptica u ovalada (Maroudas, 1979). La zona calcificada es la única zona del cartílago que contiene colágeno tipo X, el cual está asociado con el proceso de mineralización. Los condrocitos en esta zona se piensa que son inertes, ya que se encuentran inmersos o atrapados dentro de la MEC calcificada (Annefeld, 1983). Sin embargo, los intentos llevados a cabo con éxito, de obtener *in vitro* cartílago calcificado, se han hecho utilizando condrocitos obtenidos de esta zona del cartílago (Kandel et al., 1997; Yu et al., 1997).

Aunque los condrocitos han sido clasificados como pertenecientes al mismo fenotipo, se han observado *in vitro* diferencias metabólicas transitorias entre condrocitos de diferente tamaño (Trippel et al., 1980) y afiliación zonal en el cartílago (Zanetti et al., 1985; Aydelotte et al., 1988; Aydelotte y Kuettner, 1988; Archer et al., 1990; Siczkowski y Watt, 1990). Los condrocitos de la zona superficial son más aplanados que los condrocitos del resto de las zonas, tienen menos orgánulos, y se asemejan a fibroblastos (Annefeld, 1983), sintetizan además un

proteoglicano específico de aproximadamente 345 kDa (Schumacher et al., 1994). Esta proteína de la zona superficial se ha comprobado que confiere propiedades lubricantes (Flannery et al., 1999). Los condrocitos de la zona superficial se ha observado que se adhieren al plástico de las placas de cultivo celular más lentamente que los condrocitos de las zonas profundas (Siczkowski y Watt, 1990). Los condrocitos de la zona profunda exhiben un marcaje intenso para la proteína vimentina (Ghadially, 1983; Chu et al., 1995a,b), una proteína del citoesqueleto cuya presencia se ha relacionado con la resistencia a la compresión que presentan los condrocitos (Peterson et al., 2000). La síntesis de keratan sulfato se ha comprobado que se incrementa gradualmente con la profundidad del cartílago (Zanetti et al., 1985; Aydelotte et al., 1988; Aydelotte y Kuettner, 1988; Archer et al., 1990; Siczkowski y Watt, 1990). Al igual que ocurre con muchos otros tipos celulares que pierden su fenotipo *in vitro*, estas diferencias zonales tanto morfológicas como bioquímicas disminuyen a medida que aumenta el tiempo de cultivo de los condrocitos en 2D (monocapa) (Siczkowski y Watt, 1990). Sin embargo, los condrocitos cultivados en agarosa (3D) retienen las diferencias morfológicas y de síntesis de proteoglicanos (Archer et al., 1990; Aydelotte et al., 1988; Aydelotte y Kuettner, 1988).

Aparte de en la orientación, las fibras de colágeno difieren también en densidad y diámetro en función de la profundidad del cartílago. El

diámetro de la fibra es más fino en la zona superficial y gradualmente se vuelve más grueso a medida que profundizamos en el cartílago. Estas diferencias indican una variación en la síntesis de la MEC, ya que el ensamblaje de las fibrillas de colágeno está dirigido e influenciado por los componentes de la misma, tales como los colágenos tipo IX y XI, y la decorina. Estas variaciones también indican diferencias en las propiedades mecánicas a través de las distintas zonas. Las tasas de producción del ARN mensajero de los colágenos tipo II, IX y XI en las diferentes zona del cartílago epifisario se ha comprobado que son diferentes (Balmain et al., 1995). Sin embargo, las tasas de producción de la decorina, el biglicano y la fibromodulina, proteínas todas implicadas en el ensamblaje de las fibrillas de colágeno, en las diferentes zonas no han sido hasta el momento investigadas.

1.3 Aspectos funcionales del cartílago articular

El cartílago articular puede experimentar cargas superiores a 18 MPa en la cadera al levantarnos de una silla, como demostró Hodge et al., (1989) utilizando una endoprótesis de cadera instrumentalizada. El grosor típico del cartílago está entre 0,5 y 5 mm, así que cuando se compara la cantidad de impactos o cargas que pueden ser absorbidas por los músculos y la energía absorbida por el hueso, mucho más grueso, la energía que puede absorber el cartílago tras un impacto es comparativamente infinitesimal. El cartílago entonces, sirve

únicamente para proporcionar una superficie articular auto-renovable que redistribuye las fuerzas. La capacidad del cartílago para funcionar está determinada por sus propiedades mecánicas, que son de enorme importancia, ya que pueden modular las fuerzas transmitidas a los condrocitos, alterando de esta manera los procesos de biosíntesis y en definitiva la composición del mismo.

1.3.1 Propiedades mecánicas del cartílago articular

El cartílago es un material viscoelástico que se deforma al aplicar una carga constante con relación al tiempo que actúa. El cartílago es permeable pues el agua fluye a través de él cuando se somete a un gradiente de presión, haciendo que el fluido salga del cartílago, determinado por la porosidad, la solidez y las cargas. Existe una relación directa entre la permeabilidad y el contenido de agua e inversa entre la permeabilidad y el contenido de proteoglicanos. La respuesta del tejido a una carga sigue un comportamiento viscoelástico dependiente del tiempo. Es decir, depende de la deformación de la MEC sólida, del fluido intersticial a través de los poros y de la permeabilidad de la MEC sólida en el tiempo. Cuando desaparecen las cargas, el cartílago reabsorbe el fluido exudado y recupera sus dimensiones iniciales. El contenido de agua en el cartílago es muy elevado como ya se mencionó al principio de este capítulo, en torno al 80% en humanos.

Desde el punto de vista mecánico, el cartílago es un material bifásico, formado por una fase sólida y otra líquida. La parte sólida se describe como porosa y permeable y la líquida tiene la capacidad de fluir a través de la fase sólida (Buckwalter et al., 1991). El agua constituye hasta un 80 % del peso húmedo del cartílago y su relación con las macromoléculas de la MEC incrementa las propiedades mecánicas del tejido. El fluido tisular contiene gases, pequeñas proteínas, metabolitos y una alta concentración de cationes que contrarrestan la carga negativa de los proteoglicanos. No es de extrañar que las propiedades mecánicas del cartílago articular estén relacionadas con la composición bioquímica y la permeabilidad del tejido. Las deformaciones del cartílago articular se producen por fuerzas de fricción interna. En los plásticos estas fuerzas de fricción se producen por el movimiento de largas cadenas de polímeros que rozan y se deslizan entre sí al deformarse el material. La MEC sólida de colágeno y proteoglicanos del cartílago exhibe cuando se deforma una respuesta viscoelástica similar a la de los materiales plásticos (Buckwalter et al., 1991).

El cartílago articular y el hueso subcondral actúan como una unidad mecánica (Ding et al., 1998). La degeneración del cartílago articular se asocia con cambios en las propiedades mecánicas del material, especialmente en su rigidez y elasticidad (Tkaczuk, 1986). La artrosis es consecuencia de un mecanismo multifactorial donde

intervienen aspectos mecánicos, bioquímicos y biofísicos que se relacionan entre sí. Las características del material cambian pues el contenido de agua es más bajo y, también la permeabilidad del tejido (Armstrong et al., 1982). También se pierde la relación entre la resistencia del cartílago y del hueso subcondral. Ding et al., (1998) observaron que las fisuras de la capa superficial del cartílago en los estadios iniciales de la osteoartrosis eran el resultado de los daños sufridos en la red de colágeno y de la reducción en la rigidez del tejido. La delgadez del cartílago es uno de los datos iniciales de la osteoartrosis que produce una rotura de las fibras de colágeno (Guilak, 1994) y, consecuentemente, de la unidad funcional del cartílago y el hueso subcondral, que presentan una respuesta inferior a las cargas mecánicas.

En la osteoartrosis la producción de colágeno se incrementa, pero el colágeno tipo II es reemplazado por colágeno tipo I, presente en el hueso subcondral. En cambio, el contenido de agregado disminuye y se modifica a formas no agregadas que afectan a la permeabilidad del tejido y por consiguiente a las propiedades mecánicas de la MEC (Pearle et al., 2005; Sun et al., 2012; Maldonado y Nam, 2013).

1.3.2 Variaciones en las propiedades mecánicas del cartílago articular

El cartílago articular exhibe varias propiedades mecánicas en las articulaciones que sirven para diferentes funciones y que han sido

descritas en el apartado anterior. Se ha observado que estas propiedades mecánicas varían en función de diferentes aspectos, en primer lugar el tipo de articulación (Athanasίου et al., 1991, 1994, 1995a,b). En segundo lugar, variaciones debidas a la zonación del cartílago articular. Debido a la composición diferente de las distintas zonas del cartílago articular, se ha comprobado que las propiedades mecánicas en dichas zonas son también diferentes (Mow et al., 1984; Guilak et al., 1994; Athanasίου et al., 1997; Schinagl et al., 1997; Narmoneva et al., 1999; Lee et al., 2003; Kim et al., 2017). En tercer lugar, se ha observado que la presencia o ausencia de ciertas hormonas esteroideas afectan a las propiedades mecánicas del cartílago (Turner et al., 1997; Cake et al., 2005; Bian et al., 2010; Lee et al., 2015). Por último, determinadas enfermedades como es el caso de la diabetes mellitus se ha observado que afectan la homeostasis del cartílago articular, llevando a un incremento en las lesiones del mismo con respecto a población sana de las mismas características (Moeckel et al., 1993; Arkkila et al., 1994; Athanasίου et al., 1999; King y Rosenthal, 2015; Eymard et al., 2015).

1.4 Lesión del cartílago articular

1.4.1 Tipos de lesiones y respuesta natural

La respuesta del cartílago articular a la lesión depende del tipo de lesión (Hunziker, 1999). Las lesiones del cartílago articular pueden ser imperceptibles, tales como una pérdida de proteoglicanos y otros

componentes de la MEC que confieren fuerza al tejido y le permiten ejercer su función. En este caso, los condrocitos detectan o reconocen esa alteración y responden con una sobreproducción de MEC. Mientras que la MEC que se pierde o se interrumpe sea menor o igual a la que los condrocitos son capaces de sintetizar o producir, estas lesiones o pérdidas se recuperan sin ocasionar problemas. De otra manera, los condrocitos estarán expuestos a una carga excesiva sin la protección de la MEC y el tejido eventualmente degenerará (Hunziker, 1999). Fisuras y socavones condrales, constituyen lesiones condrales que resultan de interrupciones focales de naturaleza mecánica. Rápidamente, después de este tipo de lesión, los condrocitos presentes en la zona proliferan y comienzan a sintetizar MEC. No obstante este aumento inicial de actividad cesa tras pocos días, antes de que la lesión o el defecto hayan sido reparados. Los condrocitos presentes en zonas más alejadas de la lesión no pueden migrar hasta ella para continuar el proceso de reparación, debido a la situación de aislamiento en la que se encuentran de forma natural, dadas las características propias del cartílago (Mobasheri et al., 2014; Cugat et al., 2015), lo que lleva a que las lesiones condrales sean generalmente permanentes. Por esta razón, si la lesión no compromete al hueso subcondral, la reparación espontánea es muy poco probable, ya que los condrocitos no pueden atravesar la MEC para acceder a la zona lesionada, y tampoco pueden hacerlo las MSC

presentes en la médula ósea subyacente (Buckwalter, 1998, Buckwalter et al., 2005; Hunziker, 2002). Las lesiones osteocondrales, penetran hasta el hueso subcondral, y en este caso las MSC presentes en la médula ósea pueden migrar al área lesionada para rellenar el defecto y producir la reparación de la misma, aunque generalmente el cartílago reparado en estas condiciones de forma natural presenta características de fibrocartílago y habitualmente en el 100% de los casos pierde la resiliencia mecánica propia del cartílago articular y acaba finalmente por romperse bajo el estrés mecánico (Buckwalter, 1998; Hunziker et al., 2015).

1.4.2 Aproximaciones clínicas en la reparación del cartílago articular

Ya que los defectos de espesor parcial no se reparan debido a una inadecuada respuesta de los condrocitos, se han empleado diferentes aproximaciones clínicas con el fin de proporcionar más células metabólicamente activas a la superficie articular. Los esfuerzos incluyen limpieza y microfractura del hueso subcondral, repavimentación de la superficie articular, trasplantes e ingeniería de tejidos (Hunziker et al., 2015). La microfractura de un defecto condral, permite a las MSC de la médula ósea repoblar el defecto, pero esto a menudo lleva a la formación de fibrocartílago, el cual es mecánicamente incompatible con la articulación (Menche et al., 1996; Buckwalter, 1998; Hunziker et al., 2015).

La repavimentación de la superficie articular se ha llevado a cabo utilizando diferentes metodologías. Actualmente constituye una estrategia terapéutica para el manejo de defectos del cartílago articular de pequeño y medio tamaño con ventajas y limitaciones frente a otras alternativas terapéuticas como la microfractura o el trasplante de condrocitos autólogos (Sherman et al., 2017; Schrock et al., 2017). Los trasplantes incluyen trasplantes de pericondrio, ricos en células progenitoras osteocondrales (O'Driscoll, 1999), tapones osteocondrales y trasplante de condrocitos autólogos (Brittberg et al., 1994; Carver y Heath, 1999; Minas y Peterson, 1999; Peterson et al., 2000; Bartlett et al., 2005). Estas técnicas han tenido éxito en grado variable, ya que la limitación de material donante, la falta de integración, la formación de fibrocartílago alrededor y sobre el trasplante, la pérdida del fenotipo condrocítico en mayor o menor medida y la constatación de que la función no es inmediatamente restaurada, son problemas asociados de forma general a la utilización de trasplantes. Debido a la falta de estabilidad funcional a largo plazo de los procedimientos quirúrgicos actuales, la mayoría de los esfuerzos en el tratamiento de los defectos condrales y osteocondrales se han dirigido por tanto hacia la ingeniería de tejidos.

1.4.3 Ingeniería de tejidos en la reparación del cartílago articular

El objetivo de diseñar y fabricar un cartílago articular funcional desde el punto de vista mecánico, ha sido abordado manejando cuatro

elementos principales, el tipo celular, el andamio o scaffold, factores de crecimiento, y fuerzas mecánicas.

1.4.3.1 Tipo celular

La elección más obvia de un tipo celular para implantar en un defecto articular sería la de condrocitos articulares diferenciados, ya que es éste el tipo celular presente en el cartílago y el responsable de la producción de la MEC. Puesto que las subpoblaciones de condrocitos presentan diferente morfología y actividad biosintética (Aydelotte et al., 1988 a,b), puede ser importante conservar la distribución zonal de las células cuando se aíslan. Por ejemplo, condrocitos de la zona profunda se han utilizado para regenerar cartílago con zonas mineralizadas y no mineralizadas (Yu et al., 1997). Subpoblaciones diferentes de condrocitos pueden también requerir diferentes estímulos mecánicos, como aplicación de fuerzas, para inducirlos a formar un tejido funcional, ya que la tasa de proliferación y síntesis de GAG de condrocitos de la zona superficial y la zona profunda han mostrado diferencias bajo las mismas condiciones de estimulación mecánica (Lee et al., 1998). No obstante, se ha observado una disminución del número de células con la edad en la zona superficial del cartílago articular, lo cual podría dificultar la utilización de este tipo celular. En cualquier caso, la ingeniería del cartílago articular, basada en la aplicación de condrocitos autólogos desde diferentes aproximaciones, ha sido exhaustivamente

investigada en los últimos años (Brittberg et al., 1994; Bartlett et al., 2005; Phull et al., 2016).

Las células de origen embrionario (ESC) o las células pluripotenciales inducidas (iPSC), procedentes de la sangre o la piel del propio paciente, podrían ser una fuente alternativa a los condrocitos autólogos por su gran capacidad de diferenciación celular y autorrenovación. Sin embargo, además de los problemas éticos asociados al uso de tejido embrionario, son células de difícil manejo con marcado potencial para el desarrollo de ciertos tumores como son los teratomas (Le Meng Bao et al., 2013; Tuan et al., 2013)

Otra alternativa a los condrocitos autólogos, es el uso de MSC derivadas de médula ósea, músculo, tejido adiposo y periostio (Hendrickson et al., 1994; Haleem et al., 2010; Ball et al., 2011; Vinardell et al., 2012; Fellows et al., 2016), que han sido utilizadas con mayor o menor éxito en la reparación de defectos críticos de cartílago. Sin embargo, las MSC disminuyen en número con la edad, y su pluripotencialidad puede resultar en la diferenciación de otros tipos celulares distintos a los de la línea condrogénica.

Otra alternativa aparecida recientemente como fuente potencial de células para la reparación de lesiones de cartílago, son las células progenitoras del cartílago articular (ACPCs), presentes en la zona superficial del cartílago articular y caracterizadas por su aparente resistencia a la hipertrofia (Neumann et al., 2015).

Paralelamente al uso de tipos celulares alternativos a los condrocitos autólogos, se han desarrollado las técnicas de ingeniería genética. Doherty et al., (1998) llevaron a cabo con éxito la transfección, con un vector derivado de adenovirus, de condrocitos, *in vitro* e *in vivo* tras ser trasplantados en un defecto de cartílago, abriendo así la puerta a la posibilidad del uso de terapia génica en ingeniería del cartílago articular. En la actualidad, la relevancia de las estrategias de terapia génica en combinación con matrices 3D, constituyendo lo que se conoce como "matrices génicas activadas (GAM)", permiten un suministro directo, local y sostenido de ácidos nucleicos que asegura una transfección eficiente y duradera, siendo considerada una importante modalidad terapéutica y técnica regenerativa (Raisin et al., 2016).

1.4.3.2 Andamios-matrices 3D-scaffolds

Los biomateriales para fabricar las matrices 3D se clasifican en cuatro grupos en función de su composición: polímeros a base de proteínas y polímeros a base de carbohidratos, ambos de origen natural; polímeros sintéticos y combinaciones de ambos (Jackson et al., 2001; Tuan et al., 2013).

Safran et al., (2008) enunciaron las cualidades que debe cumplir el sistema ideal para su aplicación en ingeniería del cartílago. Debe ser un sistema biodegradable que sea sustituido por la MEC producida por las células que alberga. Ha de ser biocompatible, no produciendo

citotoxicidad o rechazo, ni reacción inflamatoria. Debe ser además un sistema permeable, facilitando los procesos de adhesión, proliferación y diferenciación celular. La porosidad constituye también un factor importante facilitando la difusión de los factores de crecimiento y la producción de MEC. Los implantes se configuran tridimensionalmente, de tal manera que se adapten al tejido y resulten mecánicamente estables. Finalmente, el sistema más idóneo también ha de ser reproducible, accesible y versátil, ajustándose a diferentes formas, tamaños y tipos de defecto.

El polímero natural más estudiado para la ingeniería del cartílago articular es el colágeno. Los condrocitos proliferan sobre geles de colágeno (Schuman et al., 1995) y se ha observado que mantienen mejor su fenotipo sobre geles de colágeno tipo II que sobre geles de colágeno tipo I (Nehrer et al., 1997, 1998). En defectos críticos de cartílago, la formación de la línea de calcificación (*tidemark*) se ha visto que está ausente cuando se utilizan soportes de colágeno tipo I (Wakitani et al., 1994), lo cual es indicativo de pérdida de integración, sin embargo, el test de indentación muestra que el cartílago producido presenta propiedades mecánicas similares a las del cartílago nativo.

Por otro lado, cuando el hueso subcondral es reparado utilizando MSC, sembradas también sobre soportes de colágeno tipo I, el cartílago regenerado es más blando y no se acaba de integrar en el cartílago nativo o receptor (Caplan et al., 1997). Esta pérdida de

integración lleva eventualmente a una degeneración del tejido reparado. Otros soportes naturales, incluyen la agarosa, la cual presenta la ventaja de mantener el fenotipo condrogénico durante periodos largos (Hauselmann et al., 1994; Vinardell et al., 2012), sola o en combinación con otros materiales como la fibroína de la seda (Singh et al., 2016; Ruan et al., 2017), el pegamento de fibrina (van Susante et al., 1999; Kazemnejad et al., 2016), el ácido hialurónico (Solchaga et al., 1999; Whyte et al., 2016; Zhu et al., 2017), la gelatina (Echave et al., 2017), y el quitosano (Mattioli-Belmonte et al., 1999; Sancho-Tello et al., 2017; Kuo et al., 2017; Ruan et al., 2017). Dada la enorme importancia de los GAG en la condrogénesis *in vitro*, así como su papel en la composición y funcionalidad del cartílago articular, estos han sido utilizados en la elaboración de matrices 3D en ingeniería del cartílago, en diferentes tipos de construcciones (LaPorta et al., 2012; Huang et al., 2017).

Los poli (DL-ácido láctico) (PLA) y poli (ácido glicólico) (PGA) son polímeros sintéticos cuya biocompatibilidad ha sido estudiada exhaustivamente (Freed et al., 1993; Sittinger et al., 1996), y están aprobados por la FDA y la EMA para su uso en humanos. El PLA es más cristalino y más estable que el PGA, y ha sido más utilizado como material ortopédico. Sin embargo, los esfuerzos para generar cartílago utilizando PLA han sido inútiles debido a la baja producción de GAG sulfatados con este polímero, a diferencia de lo que ocurre con el PGA

(Freed et al., 1993) y a la presencia de colágeno tipo I cuando se cultivan células procedentes del pericondrio (Chu et al., 1995a,b). El copolímero de PLA y PGA, poli (D,L-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) es un polímero cuyas propiedades mecánicas, biocompatibilidad y técnicas de almacenamiento y esterilización han sido estudiadas exhaustivamente (Agrawal y Athanasiou, 1997; Agrawal et al., 1997; Athanasiou et al., 1996, 1998, 1999). La tasa de degradación y liberación de agentes bioactivos desde el PLGA ha sido estudiada también en presencia y ausencia de carga dinámica (Athanasiou et al., 1995a; Thompson et al., 1996). Aunque los productos de degradación del PLGA son de carácter ácido, se han desarrollado técnicas para el control del pH en y alrededor del implante (Agrawal y Athanasiou, 1997). De hecho, Spain et al., (1998) han creado un copolímero compuesto de una mezcla de tres copolímeros de PLGA 50:50 que ha mostrado una tasa de degradación baja, superior a 6 semanas. El PLGA, ha sido utilizado en diferentes combinaciones como componente de matrices 3D en ingeniería del cartílago (Zhu et al., 2011; Getgood et al., 2012; Ahmed et al., 2015).

Otros polímeros de origen sintético utilizados en la elaboración de matrices para ingeniería del cartílago han sido el teflón (Ishihara et al., 2014), el poli(p-xilileno) conocido comercialmente como parileno® (Franciozi et al., 2017) y la poli-caprolactona (Friedman et al., 2017) entre otros.

1.4.3.3 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento (FC) son un grupo de proteínas biológicamente activas producidas por el organismo, que regulan la proliferación, quimiotaxis y diferenciación celular, así como la síntesis de MEC (Cugat et al., 2015). En el cartílago articular, numerosos factores de crecimiento actúan en concierto para regular el desarrollo y la homeostasis del cartílago a lo largo de la vida del organismo (Goldring et al., 2006). Siendo así, los FC se muestran como tratamientos potenciales para intensificar la regeneración del cartílago en lesiones o defectos focales del cartílago articular o en lesiones más amplias tales como las producidas en la osteoartritis (OA). Numerosos FC anabólicos estimulan la síntesis de proteoglicanos, agregano y colágeno tipo II por los condrocitos, inducen la proliferación de sinoviocitos y MSC, inducen la diferenciación condrogénica de MSC y disminuyen los efectos catabólicos de citoquinas tales como la interleucina-1 y las metaloproteasas (MMP) de la MEC (Mollon et al., 2013).

Se clasifican en tres grandes grupos: la superfamilia del TGF- β (transforming growth factor β), los IGF (insulin-like growth factors) y los FGF (fibroblast growth factors). Fundamentalmente actúan como condroinductores y condroconductores.

El TGF- β promueve la proliferación de células inmaduras y la diferenciación de células determinadas, aunque existen datos

contradictorios sobre su efecto en los condrocitos. Se ha observado que el TGF- β disminuye la producción de proteoglicanos y cambia la expresión de colágeno tipo II a colágeno tipo I, ambos hechos, signos de dediferenciación de los condrocitos (Rosen et al., 1988). No obstante, se ha visto también que el TGF- β estimula la producción de ambos tipos de colágeno y de GAG (Rosen et al., 1986; Redini et al., 1988). Este aumento de la producción de MEC se ha ensayado en un modelo experimental de cabra, en el cual un defecto osteocondral se rellenó con PLGA (50:50) conteniendo 180 ng y 1800 ng de TGF- β 1. El cartílago reparado formado en el grupo conteniendo los implantes cargados con 1800 ng de TGF- β 1 mostró módulos de compresión y de cizalla más altos que el cartílago formado en los grupos control (defecto vacío), blanco (implante blanco) y PLGA (50:50) conteniendo 180 ng de TGF- β 1 (Athanasίου et al., 1997). Sin embargo, el TGF- β promueve el crecimiento de fibroblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno tipo I en el cartílago hialino (Tipton y Dabbous, 1998). No obstante, y a pesar de los datos contradictorios presentes en la literatura, son claras las evidencias que sugieren que el TGF- β desempeña un papel fundamental en la homeostasis y la correcta funcionalidad del cartílago articular y el hueso subcondral (Finsson et al., 2012; Zhen y Cao, 2014).

Los factores de crecimiento insulínicos (IGFs), estimulan la proliferación de condrocitos y la producción de MEC por parte de los

mismos durante los procesos de osteoartritis (Coutts et al., 1997) y de reparación condral (Griffin et al., 2016) y osteocondral (Zhang et al., 2017). Dentro de la familia del FGF, observamos efectos contrapuestos ya que pese a que estimulan la proliferación de los condrocitos, no siempre juegan a favor de la condrogénesis. En concreto, en situaciones de sobrecarga mecánica, el FGF-2 que se libera a la MEC, actúa inhibiendo los efectos anabólicos del IGF-I y de la BMP-7 (Vicent et al., 2004; Loeser et al., 2005; Tuan et al., 2013).

Por otra parte, el plasma rico en plaquetas (PRP) representa otra fuente de FC donde se concentran TGF- β 1, IGF-I, VEGF y PDGF, entre otros. Este plasma rico en FC se obtiene a partir de la sangre del propio paciente. Existen en el mercado diferentes dispositivos para llevar a cabo el proceso, lo que condiciona la composición química del plasma obtenido. Por esta razón los resultados obtenidos con esta técnica presentan gran variabilidad. El PRP muestra en general efecto antiinflamatorio y anabólico y favorece la homeostasis del cartílago articular (Cugat et al., 2015). Adicionalmente, se ha observado que el cultivo de MSC en PRP favorece su diferenciación osteogénica y condrogénica (Mollon et al., 2013).

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) constituyen un grupo de factores de crecimiento pertenecientes a la superfamilia del TGF- β , con acción osteoinductora que también tienen implicación en la condrogénesis. De hecho, han mostrado promover y mantener el

fenotipo condrogénico del cartílago articular (Sailor et al., 1996), por lo que han sido usadas en defectos críticos de cartílago mostrando rápida formación de hueso subcondral y mejorando la apariencia histológica del cartílago articular reparado (Sellers et al., 1997, 2000; Cook et al., 2003; Carreira et al., 2014).

En la práctica clínica, las formas recombinantes de la BMP-2 (rhBMP-2) y BMP-7 (rhBMP-7) están aprobadas por la FDA y la EMA. La rhBMP-2, está indicada para fracturas abiertas de tibia y pseudoartrosis de columna lumbar posterolateral, en paciente con esqueleto maduro (Cheng et al., 2003). La rh-BMP-7 está indicada para la fusión vertebral lumbar posterolateral en pacientes adultos con espondilolistesis en los que el autoinjerto ha fracasado o está contraindicado.

En estudios experimentales, el grupo de Sellers et al., (2000) confirmaron que, en conejos a los que se había practicado un defecto osteocondral crítico, después de un año de la cirugía los resultados histológicos eran superiores en el grupo implantado con esponjas de colágeno conteniendo rhBMP-2. En otro estudio, Cook et al., (2003) mostraron la capacidad condrogénica de la rhBMP-7 en un modelo experimental de perro, empleando implantes de colágeno tipo I con resultados estables después de un año del tratamiento.

Sin embargo, aparte de estos, son escasos los estudios sobre la BMP-2 en la reparación de defectos críticos de cartílago articular,

siendo los resultados obtenidos hasta el momento controvertidos en cuanto a la eficacia de la misma (Sellers et al., 1997, 2000; van der Kraan et al., 2010; Salazar et al., 2016).

Teniendo en cuenta la actividad osteogénica y condrogénica de las BMP, se deduce que su aplicación a dosis adecuadas en defectos osteocondrales permitiría una reparación íntegra del hueso subcondral y la superficie articular (Miljkovic et al., 2008; Menendez et al., 2011).

1.4.4 Tendencias actuales en ingeniería de tejidos en la reparación del cartílago articular

Los retos en la actualidad en ingeniería de tejidos del cartílago articular implican la optimización de distintos parámetros, los cuales incluyen la selección del tipo o tipos celulares apropiados, la selección de un andamio o scaffold adecuado tanto desde el punto de vista químico como desde el punto de vista mecánico, la selección y aplicación de varios FC y la determinación de cómo las fuerzas mecánicas han de aplicarse para optimizar los procesos de biosíntesis en el tejido en regeneración. Todas estas variables deben trabajar juntas para producir un tejido que sea estable desde el punto de vista funcional. Si bien la elección de todos y cada uno de los factores mencionados es de enorme importancia para lograr un cartílago estable y funcional, quizás uno de los puntos más relevantes en relación con la aplicación de factores de crecimiento, sea la forma en que éstos son presentados. Teniendo en cuenta que durante el

proceso natural de lesión y reparación las células producen y liberan una serie de moléculas, entre ellas FC, con una secuencia temporal determinada (Dimitriou et al., 2005), es de suma importancia que durante el uso terapéutico de los mismos, se intente en la medida de lo posible mimetizar esta secuencia temporal de aparición, logrando de esta manera una acción secuencial y coordinada. La utilización de andamios o scaffolds, permite que éstos, además de actuar como soporte o guía que facilita el proceso de reparación tisular en grado variable, actúen como vehículo, por un lado de diferentes tipos de células (MSC o condrocitos) en el caso de la terapia celular (Fragonas et al., 2000; Shao et al., 2006; Richter, 2009; Guo et al., 2010; Mazor et al., 2014; Dewan et al., 2014; Grässel y Lorenz, 2014; Wang et al., 2015; Caldwell y Wang, 2015;) y por otro de FC (Tokuhara et al., 2010; Fortier et al., 2011; Henning et al., 2014), de manera que sólo actúen localmente en el lugar de la lesión, evitando así una exposición sistémica y con ello la aparición de posibles efectos secundarios indeseables. Además, en el caso de los FC, es posible mediante el uso de diferentes estrategias, controlar la liberación de los mismos desde el scaffold en el lugar de la lesión, logrando concentraciones adecuadas y una acción sostenida durante periodos de tiempo variables.

Objetivos

2. Hipótesis de trabajo y objetivos

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, nuestra hipótesis de trabajo se basó en demostrar el uso potencial de la proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2) como factor condrogénico y la importancia de la cinética de presentación de la misma en el lugar de la lesión, frente a otros FC con potencial condrogénico demostrado como el TGF- β 1, y frente al uso de terapia celular con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (MSC) y condrocitos autólogos. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos.

Objetivos del proyecto

El objetivo global de este trabajo es el desarrollo, caracterización y optimización de scaffolds conteniendo FC, células o combinaciones de ambos para reparar el cartílago dañado en un defecto osteocondral induciendo la formación de cartílago hialino funcional. Para ello abordaremos los siguientes objetivos específicos:

1.- Elaboración y evaluación de la eficacia reparadora de dos sistemas de doble capa, conteniendo BMP-2 o TGF- β 1 en una formulación de liberación controlada, en un defecto osteocondral crítico en rodilla de conejo. El sistema se elabora con dos tipos de biomateriales y con características estructurales diferentes para que se acoplen y se integren tanto a la fase ósea como a la fase condral. La diferencia entre ambos sistemas se encuentra en el biomaterial de la capa condral que sería en un caso un poliuretano segmentado (SPU) y en otro una

esponja de alginato. La capa destinada a la fase ósea es un cilindro poroso de PLGA. El objetivo de esta etapa es, en función de los resultados, optimizar la composición del sistema a utilizar en la segunda etapa.

2.- Elaboración de un sistema de triple capa, similar al de alginato de la etapa anterior pero con doble capa condral de alginato. En la segunda capa de alginato se incorporan los FC pre-encapsulados y la nueva capa, dirigida hacia la zona condral, actúa como matriz para el sembrado de células. Histológica e histomorfométricamente se evalúa la capacidad condrogénica del tratamiento con MSC, condrocitos autólogos (rbC), FC, y combinaciones de ambos. El objetivo global en esta etapa es identificar el tratamiento más eficaz.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1 Ensayos de doble capa

3.1.1 Preparación de las microesferas

Las microesferas de poliláctico-co glicólico, PLGA 50:50 (Resomer® RG504; Boehringer-Ingelheim, Alemania) conteniendo BMP-2 (Biomedal Life Sciences, Spain) o TGF-β1 (Chemicon) se prepararon por el método de doble emulsión (agua/aceite/agua). Para ello, 180 µg de rhBMP-2 o bien 3 µg de TGF-β1 en 20 µL de alcohol polivinílico (PVA, PM: 30.000-70.000 89% hidrolizado) al 0,07 % (fase interna acuosa) se añadieron a la fase oleosa, formada por 2 mL de PLGA a una concentración de 50 mg/mL en diclorometano. La mezcla se agitó durante 3 minutos en el Vortex (Genie® 2, posición 7), se vertió sobre la fase externa acuosa de PVA al 0,1 % (100 mL) y se dejó durante 2 horas bajo agitación magnética y en campana de extracción para favorecer la evaporación del diclorometano. Una vez eliminado el disolvente, las microesferas se recogieron por filtración a vacío (filtro Supor® 450 de 0,45 µm, Pall Corporation, 47 mm), se liofilizaron y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Se prepararon varios lotes con ¹²⁵I-BMP-2 y ¹²⁵I-TGF-β1 (Perkin-Elmer) para determinar el rendimiento de encapsulación de ambas proteínas y su perfil de cesión.

La eficiencia de encapsulación de la BMP-2 y el TGF-β1 se determinó midiendo los niveles de radiactividad en tres alícuotas de

microesferas, usando un contador gamma (Cobra II, Packard). Las microesferas fueron también caracterizadas en cuanto a morfología, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) previo recubrimiento con plata. El tamaño de las mismas se determinó por difracción de luz láser usando un Mastersizer 2000 (Malvern Instruments).

3.1.2 Preparación de los scaffolds o implantes de doble capa ALG-PLGA y SPU-PLGA

En primer lugar, la capa en contacto con el hueso subcondral (capa subcondral), consistió en una estructura cilíndrica porosa de PLGA (50:50; Resomer[®] RG504, Boehringer-Ingelheim) que se fabricó según el método descrito por Yoon y Park (2001) con algunas modificaciones. El procedimiento consistió en añadir 100 mg de bicarbonato de amonio pulverizado, como formador de poros (porogen), a 1 mL de una disolución de PLGA en acetona (300 mg/mL). La mezcla se realizó en un soporte de teflón y se mantuvo a 40°C para conseguir la evaporación parcial del disolvente, obteniéndose una pasta. Para formar los cilindros, la pasta se introdujo en una jeringa de polietileno abierta (4,5 mm de diámetro interno) y se extruyó sobre una disolución al 40% (p/v) de ácido cítrico para inducir la formación de gas y la creación de poros en el sistema. Después de 24 horas bajo agitación orbital suave los cilindros se cortaron en unidades de 2 mm de longitud y se incubaron de nuevo

durante 3 días más en la disolución de ácido cítrico, en agitación, para asegurar la completa disolución del porogen. Transcurrido este tiempo las unidades se lavaron con agua Milli-Q, y se mantuvieron en tampón fosfato pH 7,4 otras 24 horas en agitación. Finalmente y tras controlar el pH del medio, se lavaron con agua Milli-Q, se liofilizaron y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. El sistema osteocondral se montó en el mismo molde. En concreto, 6 mg ó 3 mg de microesferas conteniendo 5 µg ó 2,5 µg de BMP-2, respectivamente o bien, en el caso del TGF-β1, una dosis de 50 ng en 2,5 mg de microesferas que se completaron en todos los casos hasta 10 mg con microesferas blancas, fueron dispersadas en 30 µL de una disolución acuosa de alginato al 1,5% (Pronova UP MVG, Novomatrix, Noruega). La fabricación de la estructura se completó con la reticulación o entrecruzado de las cadenas de alginato con 150 µL de una disolución de CaCl₂ (0,73%) y finalmente se liofilizó. En la presentación del sistema final de alginato-PLGA (ALG-PLGA) ambas capas se mantuvieron unidas (véase figura 4.2 sección resultados).

De forma similar, el scaffold de doble capa de poliuretano segmentado-PLGA (SPU-PLGA) se montó en un molde cilíndrico, en el que previamente se había colocado la capa subcondral de PLGA. En este caso los 10 mg de microesferas se mezclaron con 10 mg de SPU formándose una pasta que fue introducida en el molde, quedando el montaje del scaffold completado (véase figura 4.11).

sección resultados). El SPU utilizado en este trabajo fue sintetizado por el Grupo de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (CSIC, Madrid) y caracterizado por nuestro grupo de investigación (Rodríguez-Évora et al., 2013).

El tamaño de las partículas de bicarbonato de amonio, previamente pulverizado y tamizado, se midió en acetona (Mastersizer 2000 con Hydro 2000 SM, Malvern Instruments Ltd). La distribución de tamaños (μm) fue la siguiente: <52,9 (10%), <155,0 (50%) y <348,3 (90%).

La porosidad de la estructura cilíndrica de PLGA correspondiente a la capa subcondral, se determinó por porosimetría de intrusión de mercurio (Autopore IV 9500, Micromeritics) y mediante la ecuación 1, determinando la densidad real por picnometría de helio (AccuPyc 1330, Micromeritics).

$$\text{Porosidad (\%)} = \frac{\text{Densidad real} - \text{Densidad aparente}}{\text{Densidad real}} \cdot 100 \quad \text{ec. 1}$$

En cuanto al sistema completo las características morfológicas así como su estructura interna se observaron con un microscopio estereoscópico (Leica M205 C) y Leica LAS, software v3.

La capacidad de captación de agua del sistema, fue determinado después de 15 minutos en incubación en tampón fosfato, por diferencia entre peso húmedo y peso seco inicial.

3.1.3 Ensayos de cesión *in vitro* de BMP-2 y TGF- β 1

Los ensayos de cesión *in vitro* se realizaron por triplicado utilizando los lotes elaborados con los factores de crecimiento (FC) marcados con ^{125}I . Cada implante se incubó por separado en 3 mL de medio, una disolución de PVA (0,1%) con azida sódica (0,02%) en tampón fosfato pH 7,4, a 37°C bajo agitación a 50 rpm. La cantidad de FC cedido se calculó midiendo, a tiempos pre-establecidos, la radiactividad (Cobra® II, Packard) en 1 mL de medio, que fue inmediatamente repuesto con medio fresco. La estabilidad del marcaje con ^{125}I -FC en el medio de liberación se comprobó por cromatografía en capa fina (TLC) (De la Riva et al., 2010). La cromatografía en capa fina se llevó a cabo en silicagel (60 F₂₅₄, Merck) utilizando como fase móvil una disolución acuosa de metanol al 85%, donde el $^{125}\text{I}^-$ libre alcanzó el frente de avance y el ^{125}I -FC quedó retenido en el punto de aplicación de la muestra.

3.1.4 Bioactividad de la BMP-2 y del TGF- β 1

Para determinar la actividad biológica de la BMP-2 y el TGF- β 1 cedidos desde el sistema (scaffold) se llevaron a cabo ensayos sobre la actividad *in vitro* en cultivos celulares. La actividad biológica de la BMP-2 cedida se ensayó midiendo la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en células mesenquimales de médula ósea de rata (MSC) (Huang et al., 2010). Se sembraron 2×10^5 células en pase 2 en placas de 6 pocillos en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle

Medium) completo con suero bovino fetal (FBS) (PAA, Linz, Austria) a concentración final del 20%. Después de 24 y 72 horas el medio de cultivo fue reemplazado con medio DMEM suplementado al 10% con FBS. Además, al medio de cultivo se le añadieron disoluciones estándar de BMP-2 en el intervalo de concentraciones de 50-300 ng/mL, o medio procedente de los ensayos de cesión conteniendo la BMP-2 liberada. La actividad ALP se midió después de 6 días de tratamiento con el FC, usando un kit comercial (Sensolyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit, AnaSpec, Fremont, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las MSC se obtuvieron de ratas Sprague-Dawley macho postnatales de 6 semanas. Las células se aislaron mediante centrifugación en gradiente según el protocolo descrito por Dobson et al., (1999). Se preparó un pool de médula ósea a partir de fémures de 4 ratas, que fue resuspendido en medio DMEM conteniendo 4,5 g/L de glucosa y 25 mM de HEPES (Biochrom, Cambridge, UK) y suplementado con FBS a concentración final del 20%, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 200 mM de L-glutamina estabilizada (PAA, Linz, Austria). Las células se sembraron y se expandieron hasta confluencia bajo incubación a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂. Cada 3 días, el medio de cultivo fue sustituido por medio fresco. Una vez expandidas, las células fueron despegadas y congeladas hasta su uso.

La actividad biológica del TGF- β 1 cedido, se ensayó, de forma similar, cuantificando su actividad antiproliferativa en una línea celular epitelial de pulmón de visón (Mv-1-Lu) (Kim et al., 2002). Se sembraron 1×10^4 células en una placa de 24 pocillos en medio DMEM completo, suplementado con disoluciones estándar de TGF- β 1 en el intervalo de concentraciones de 0,01-1 ng/mL, o con el medio conteniendo la TGF- β 1 liberada en el ensayo de cesión. Después de 6 días, la viabilidad celular se cuantificó usando el ensayo colorimétrico del XTT tetrazolio (Roche diagnostics, Mannheim, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. El número de células se expresó como porcentaje relativo a las células no tratadas.

3.1.5 Procedimiento quirúrgico

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la directriz europea EC (2010/63/UE) y las directrices españolas sobre cuidado y usos de animales de experimentación (R.D. 1201/2005). Además, los experimentos animales fueron previamente aprobados por el comité de ética de la Universidad de La Laguna. El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo bajo estrictas condiciones de asepsia.

El modelo animal empleado en el desarrollo del trabajo experimental de esta tesis doctoral fue un defecto osteocondral crítico practicado en rodilla trasera de conejos de raza New Zeland. Aunque existen modelos animales más grandes, como el perro, la cabra y el

caballo, con una articulación que se asemeja más a la humana, el conejo es el modelo animal experimental de pequeño tamaño, más ampliamente aceptado para la evaluación de implantes conteniendo diferentes agentes terapéuticos para el tratamiento de lesiones del cartílago articular (Sellers et al., 1997, 2000; Holland et al., 2005, 2007; Shao et al., 2006; Qi et al., 2009, 2012; Im y Lee, 2010; Jiang et al., 2010; Tokuhara et al., 2010; Wang et al., 2010; Chen et al., 2011; Yang et al., 2011; Vayas et al., 2017).

El defecto osteocondral se practicó a 70 conejos adultos machos de seis meses de edad con un peso aproximado entre 3 y 4 kilogramos. Los animales fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de ketamina (35 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg). La pata derecha de cada animal se afeitó y desinfectó. Se administró una dosis de enrofloxacino, (Alsir®) por vía subcutánea (s.c.) entre 5-15 mg/kg como profilaxis antibiótica, y como profilaxis analgésica, una dosis de buprenorfina (Buprex®) entre 0,05-0,1 mg/kg 30 minutos antes de la intervención. Se realizó una incisión medial parapatelar en la rodilla y se provocó la luxación de la articulación para permitir el acceso quirúrgico a los cóndilos femorales. Se realizó un defecto de 4,5 mm de diámetro y 4 mm de profundidad con una fresa dental, en el área proximal del espacio intercondíleo (Fig. 3.1a). El scaffold de doble capa se insertó en el defecto practicado (Fig. 3.1b), tras la

implantación, la patela y el tendón patelar fueron reducidos, la herida quirúrgica fue suturada por planos y la piel se cerró con grapas.

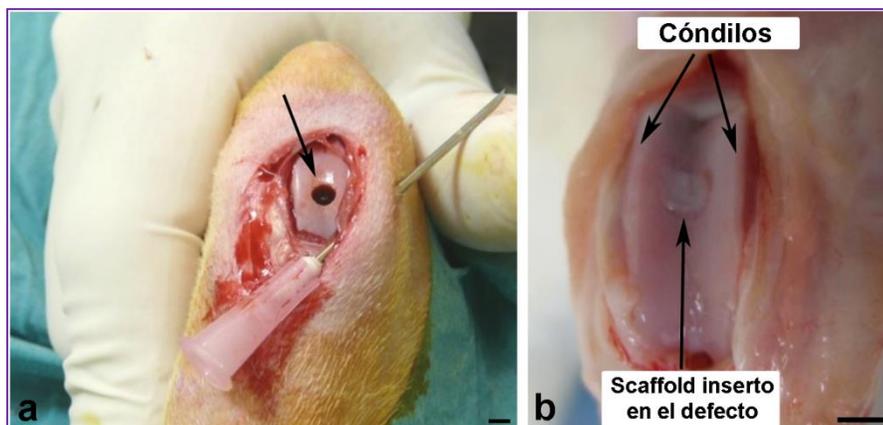


Figura 3.1. Imagen que muestra el defecto osteocondral practicado (flecha) en la zona intercondílea del fémur de conejo (a). Imagen que muestra el defecto osteocondral tras la colocación del implante (flecha) (b). Barras de escala = (a,b) 4,5 mm.

Tras la recuperación de la cirugía, entre 20 y 30 minutos, los animales fueron colocados en sus jaulas y se les permitió moverse libremente, así como libre acceso a agua y alimento. Como analgésico y antiinflamatorio durante la noche post-intervención los animales recibieron 2-5 mg/kg, s.c de ketoprofeno y posteriormente buprenorfina cada 12 horas durante 72 horas.

3.1.6 Experimentos de cesión *in vivo* y biodistribución de BMP-2 y TGF- β 1

Las cinéticas de cesión de BMP-2 y TGF- β 1 fueron determinadas implantando los sistemas, cargados con las microesferas de los FC marcados con ^{125}I , en dos grupos de 5 animales, uno para cada factor (ver Tabla 3.1). La disminución de la radiactividad en el lugar de

administración permite calcular la cantidad de BMP-2 o TGF- β 1 liberada desde el sistema. La radiactividad en el lugar del defecto fue monitorizada utilizando un método no invasivo descrito y validado previamente por nuestro grupo de investigación (Delgado et al., 2006). Este método permitió, usando una sonda externa (Captus®, Nuclear Ibérica), medir periódicamente la radiactividad remanente en el lugar del defecto. A tiempos pre-establecidos se realizaron 5 medidas de 1 minuto cada una y la media fue tomada como cantidad de radiactividad remanente. Las medidas a tiempo 0 se asumieron como el total de dosis administrada (100%).

Para determinar la biodistribución de los FC, se extrajeron muestras de sangre a partir de la vena marginal de la oreja de cada animal, a cada punto de tiempo de muestreo. Tras la toma de la última muestra, los animales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de tejido de un área de 3 cm² alrededor de la zona del implante, en las que se determinó el nivel de radiactividad con un contador gamma (Cobra® II, Packard).

3.1.7 Evaluación y puntuación histológica

La evaluación histológica se llevó a cabo en 5 grupos experimentales para cada uno de los sistemas de doble capa, ALG-PLGA y SPU-PLGA (ver Tablas 3.1 y 3.2).

Tabla 3.1. Grupos experimentales para el sistema de ALG-PLGA.

Grupos	Animales	Descripción
Ensayos de cesión		
BMP-2	5	¹²⁵ I-BMP-2/BMP-2 en microesferas contenidas en implantes de alginato
TGF-β1	5	¹²⁵ I-TGF-β1/TGF-β1 en microesferas contenidas en implantes de alginato
Análisis histológico		
Grupo Control (C)	12	Defecto vacío
Grupo Blanco (B)	12	Microesferas blancas contenidas en implantes de alginato
BMP-2 (2,5 µg)	12	2,5 µg de BMP-2 en microesferas contenidas en implantes de alginato
BMP-2 (5 µg)	12	5 µg de BMP-2 en microesferas contenidas en implantes de alginato
TGF-β1 (50 ng)	12	50ng de TGF-β1 en microesferas contenidas en implantes de alginato

Tabla 3.2. Grupos experimentales para el sistema de SPU-PLGA.

Grupos	Animales	Descripción
Ensayos de cesión		
BMP-2	5	¹²⁵ I-BMP-2/BMP-2 en microesferas contenidas en implantes de SPU
TGF-β1	5	¹²⁵ I-TGF-β1/TGF-β1 en microesferas contenidas en implantes de SPU
Análisis histológico		
Grupo Control (C)	12	Defecto vacío
Grupo Blanco (B)	12	Microesferas blancas contenidas en implantes de SPU
BMP-2 (2,5 µg)	12	2,5 µg de BMP-2 en microesferas contenidas en implantes de SPU
BMP-2 (5 µg)	12	5 µg de BMP-2 en microesferas contenidas en implantes de SPU
TGF-β1 (50 ng)	12	50ng de TGF-β1 en microesferas contenidas en implantes de SPU

Los animales, 3 por grupo experimental y por punto de tiempo, se sacrificaron a las 2, 6, 12 y 24 semanas postimplantación (p-i). Los fémures fueron extraídos y se prepararon para análisis histológico, histomorfométrico e inmunohistoquímico. Las muestras se fijaron en

formalina al 10% en disolución tamponada (pH 7,4) y se descalcificaron posteriormente en una disolución de ácido fórmico al 10%, tras lo cual se procedió a su inclusión en parafina. Para ello, las muestras se cortaron longitudinalmente y se incluyó únicamente la región de la epífisis del fémur que contenía el defecto. La inclusión se realizó por deshidratación de las muestras en alcoholes de gradación creciente, posteriormente se realizó el aclaramiento de las muestras en toluol para eliminar el alcohol y permitir la entrada de la parafina. Tras 3 baños consecutivos en parafina (Paraplast®) se realizaron los bloques a partir de los cuales se obtuvieron los cortes histológicos. Se realizaron secciones longitudinales entre 3 y 5 μm de grosor a lo largo de todo el defecto en cada uno de los animales (Fig. 3.2), utilizando un micrótopo de rotación (Shandon Finesse 325).

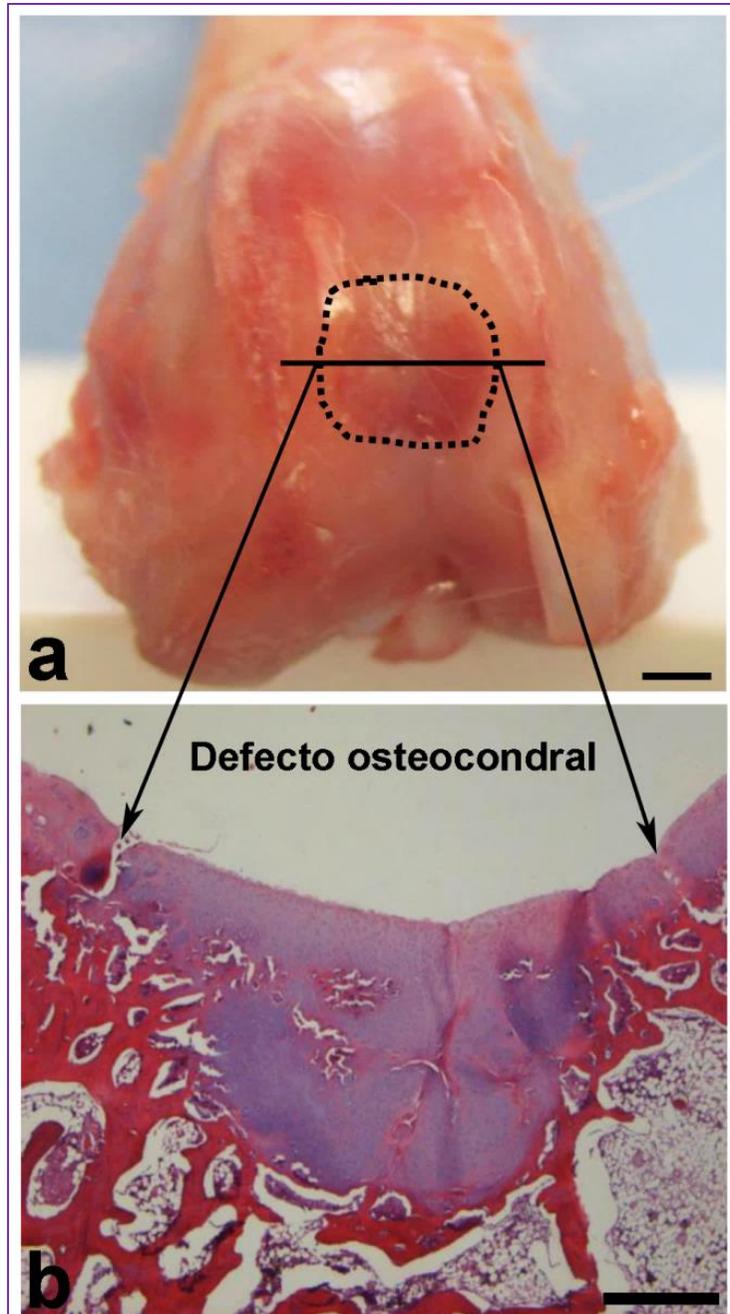


Figura 3.2. Imagen que muestra el defecto osteocondral (línea discontinua) a las 24 semanas (p-i) en un animal tratado con BMP-2. La línea continua indica el plano de corte utilizado para la obtención de las secciones histológicas (a). Sección histológica a nivel del plano de corte teñida con hematoxilina-eritrosina (H-Er) en la que se observan claramente los márgenes del defecto (flechas) (b). Barras de escala = (a) 2 mm, (b) 1 mm.

La figura 3.3, muestra en sección histológica, las características del defecto osteocondral a tiempo cero.

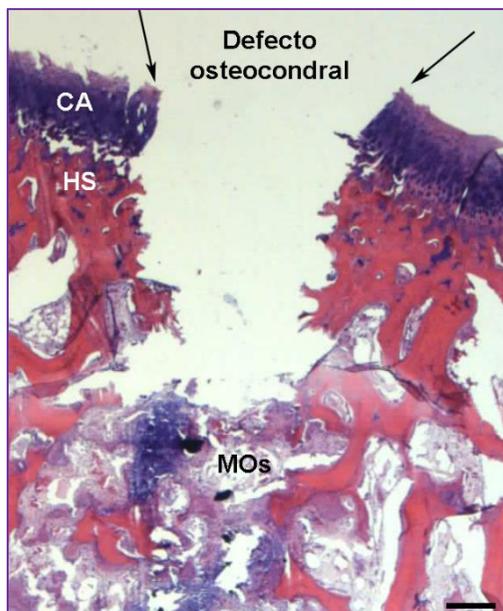


Figura 3.3. Imagen en sección longitudinal que muestra el defecto osteocondral crítico a tiempo cero. CA: Cartílago articular. HS: Hueso subcondral. MOs: Médula ósea. Barra de escala = 1 mm.

Las secciones se recogieron sobre portaobjetos adherentes y, tras el desparafinado e hidratación de las mismas, se tiñeron con hematoxilina-eritrosina (H-Er) y azul de toluidina (AT) para su posterior análisis y evaluación de la respuesta reparadora. Las muestras se examinaron utilizando un microscopio óptico (Leica DM 4000B) con cámara digital acoplada (Leica DFC 300FX). Los resultados histológicos fueron semi-cuantificados y se les asignó una puntuación utilizando un sistema de puntuación para reparación osteocondral descrito por Wakitani et al., (1994) y modificado por Tokuhara et al., (2010) (ver Tabla 3.3) en el que se valoran 6 parámetros, 5

parámetros de reparación condral y uno para reparación del hueso subcondral.

Tabla 3.3. Escala de puntuación histológica de Wakitani et al., (1994) y Tokuhara et al., (2010).

Grado	Descripción
A. Morfología celular/tisular	
4	Cartílago hialino
3	Mayoritariamente cartílago hialino
2	Mayoritariamente fibrocartílago
1	Mayoritariamente no cartílago
0	No cartílago
B. Tinción de la matriz extracelular (MEC) (Metacromasia)	
3	Normal (Igual al cartílago adyacente)
2	Ligeramente reducida
1	Significativamente reducida
0	Ausencia de tinción
C. Regularidad de la superficie^a	
3	Lisa (>3/4)
2	Moderada (1/2 a 3/4)
1	Irregular (1/4 a 1/2)
0	Muy irregular (<1/4)
D. Grosor del neocartílago^b	
2	>2/3
1	1/3 a 2/3
0	<1/3
E. Integración del neocartílago en el cartílago normal adyacente	
2	Ambos extremos integrados
1	Un extremo integrado
0	Ningún extremo integrado
F. Grosor del hueso subcondral^c	
4	>100%
3	75-100%
2	50-75%
1	25-50%
0	<25%

a. Total del área regular en el cartílago reparado comparada con el área total de cartílago lesionada.

b. Grosor medio del cartílago reparado comparado con el grosor del cartílago normal adyacente.

c. Grosor medio del hueso subcondral reparado comparado con el grosor del hueso subcondral circundante.

Los parámetros evaluados fueron: morfología celular/tisular con puntuaciones entre 0 y 4; grado de tinción de la matriz extracelular con puntuaciones entre 0 y 3; regularidad de la superficie con puntuaciones entre 0 y 3; grosor del cartílago con puntuaciones entre 0 y 2; integración del cartílago reparado en el cartílago adyacente con puntuaciones entre 0 y 2; y grosor del hueso subcondral con puntuaciones entre 0 y 4. La puntuación total más alta, 18 puntos, se asume como cartílago hialino de buena calidad y hueso subcondral totalmente reparado.

3.1.8 Inmunohistoquímica

Las células inmunoreactivas frente a los antisueros anti-colágeno I, anti-colágeno II, anti-colágeno IX y anti- colágeno X, y frente al anticuerpo anti- agregano, presentes en la zona del defecto se cuantificaron con el fin de confirmar el fenotipo del tejido reparado y confirmar uno de los parámetros del sistema de puntuación histológica, concretamente la morfología celular. Para ello, se utilizaron secciones a diferentes niveles del defecto osteocondral sobre las que se realizó una técnica inmunohistoquímica indirecta utilizando antisueros policlonales frente al colágeno I (Col I), colágeno II (Col II), colágeno IX (Col IX) y colágeno X (Col X), y un anticuerpo monoclonal frente al agregano (Millipore, Barcelona, Spain). Las secciones se desparafinaron en toluol y a continuación se hidrataron en alcoholes de gradación decreciente hasta agua destilada y

finalmente tampón Tris salino (TBS) 0,1 M, pH 7,4, el cual se usó para todos los lavados e incubaciones posteriores. Las secciones se sometieron a un proceso de desenmascaramiento antigénico en tampón Tris-EDTA 10:1 mM, pH 9 a 65°C durante 20 min, posteriormente se bloquearon con FBS al 2% en TBS-tritón X-100 al 0,2%. La reacción inmunohistoquímica indirecta se llevó a cabo incubando las secciones o/n a 4°C con los antisueros anti-Col I (1/100), anti-Col II (1/100), anti-Col IX (1/100) y anti-Col X (1/100), y con el anticuerpo anti-agrecano (1/100). Tras la incubación, se realizaron varios lavados y se incubaron las secciones, durante 60 min, secuencialmente con sendos anticuerpos 2^{os} frente a IgG de conejo (Donkey anti-rabbit) (Millipore, Barcelona, Spain) para los antisueros policlonales frente a los colágenos y frente a IgG de ratón (Donkey anti-mouse) (Millipore, Barcelona, Spain) para el anticuerpo monoclonal frente a agrecano, ambos conjugados a biotina, a dilución (1/1000). Posteriormente las secciones se incubaron, durante 60 min, con un complejo de streptavidina conjugado a peroxidasa (Millipore, Barcelona, Spain) a dilución (1/1000). Tras una serie de lavados, la actividad peroxidasa se reveló utilizando una disolución de 4-Cl-1-naftol (Sigma, Poole, UK) al 0,004% y peróxido de hidrógeno al 0,01% en tampón Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,6. Tras el revelado, las secciones se lavaron exhaustivamente y se montaron con glicerina tamponada para su posterior análisis. La especificidad de la reacción

inmunohistoquímica se comprobó reemplazando los antisueros específicos por FBS normal y verificando la ausencia de marcaje bajo estas condiciones.

3.1.9 Análisis cuantitativo

Las células Col I, Col II, agregano, Col IX y Col X inmunoreactivas (ir) por unidad de área ($1000 \mu\text{m}^2$) se cuantificaron usando el software de análisis de imagen Leica Q-Win (Analysis Image System Leica Q-Win, Barcelona, Spain). Se analizaron 10 secciones a lo largo del defecto en todos los animales de cada grupo. Solamente los perfiles celulares con marcaje citoplasmático y núcleo no marcado se contabilizaron. Los fragmentos marcados y los artefactos fueron excluidos de la medida aplicando un tamaño de objeto mínimo. La intensidad del marcaje, evaluada en unidades arbitrarias en una escala de grises con rango de valores desde 1 (negro) a 256 (blanco), se usó como criterio para medir la inmunoreactividad celular. Las células se consideraron inmunoreactivas con valores superiores al valor de las secciones control.

3.1.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS 18.0. Los diferentes tratamientos en cada punto de tiempo, se analizaron mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney. El nivel de significación estadística establecido por defecto fue de $p < 0.05$. Los resultados se expresaron como el valor medio \pm DS.

3.2 Ensayo de triple capa

3.2.1 Preparación de las microesferas

Las microesferas de PLGA se prepararon según se ha descrito en el apartado 2.1.1

3.2.2 Preparación del scaffold o implante de triple capa alginato-PLGA.

El scaffold osteocondral de triple capa se preparó según se ha descrito previamente en la sección 3.1.2 de este capítulo. En este caso, la segunda capa se preparó con 6 mg de microesferas conteniendo BMP-2 dispersas en 20 μ L de alginato al 1,5%. La tercera capa se preparó separadamente y fue similar a la segunda, excepto por contener 4 mg de microesferas blancas. Esta capa se usó para sembrar las células (rbC y MSC).

Las imágenes de la morfología y la estructura interna del scaffold de triple capa fueron tomadas con un microscopio estereoscópico (Leica M205 C) y Leica LAS, software v3 (véase figura 4.20 sección resultados).

3.2.3 Células

Con el fin de evitar múltiples intervenciones en un mismo animal, tanto las células mesenquimales derivadas de médula ósea (MSC) como los condrocitos (rbC) de conejos de raza New Zeland, sanos, se aislaron a partir de otros animales de la misma camada (6 meses de edad) de los animales a ser implantados. Ambos tipos de células se

expandieron en fase de crecimiento logarítmico y se sub-cultivaron hasta aproximadamente un 80% de confluencia. Las células expandidas se congelaron hasta su posterior uso. A menos que se especifique, todo el material de cultivo celular utilizado procedió de PAA (Linz, Austria) y todo el material plástico de cultivo de Nunc (Langenselbold, Germany).

3.2.3.1 Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea de conejo (MSC)

Se utilizó una aguja espinal (Polymedic®, Barcelona, Spain) con un introductor de 25 G y 103 mm de longitud y una aguja interna de 21 G y 38 mm de longitud; esta última aguja se conectó a una jeringa de 10 mL para recoger el aspirado, el cual se transfirió inmediatamente a un tubo de centrifuga estéril con 5 mL de medio de cultivo completo, suplementado con 100 UI/mL de heparina. La disolución se diluyó con tampón fosfato salino (PBS) pre-calentado y se dejó reposar durante 10 min. Seguidamente, la capa de grasa separada se aspiró. Las células mononucleares se recogieron tras una centrifugación en gradiente de densidad (Biocoll, Cultek, Madrid, Spain) a 300 g durante 30 min. Tras un lavado con PBS, las células se sembraron en plástico en medio completo, compuesto de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (4,5 g/L glucosa), 20% de FBS, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y estabilizado con 200 mM de L-glutamina. Después de 5 días de cultivo, las células flotantes

presentes en el medio se eliminaron con un lavado suave con PBS. Se realizaron entonces cambios de medio cada 3-4 días. Los cultivos fueron divididos mediante una incubación corta de 4 min con tripsina/EDTA (1:250), lo cual favoreció el despegue selectivo de las MSC dejando adheridas las células fagocíticas. Se necesitaron dos pasos de división expansiva para eliminar por completo las células contaminantes presentes en el cultivo.

3.2.3.2 Aislamiento y cultivo de condrocitos de conejo (rbC)

La obtención de los condrocitos, se realizó a partir de la articulación de rodilla de conejos blancos sanos de raza neozelandesa. Tras ser sacrificados, se procedió a la extracción inmediata de láminas de cartílago en condiciones asépticas. Las láminas fueron incubadas en una disolución de tripsina/EDTA (1:250) al 0,05% a 37°C en agitación (50 rpm) durante 15 min. Tras este periodo, se centrifugó durante 5 min a 500 g y el pellet resultante se resuspendió en una disolución de colagenasa IV 1 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA) en medio DMEM (4,5 g/L glucosa) suplementado con 10% de FBS ("FCS Gold", PAA, Linz, Austria), y se incubó durante 150 min en las condiciones descritas anteriormente. Tras esta segunda incubación, se eliminó el tejido no digerido y el sobrenadante se centrifugó durante 5 min a 500 g. El pellet obtenido se resuspendió y se sembró en plástico 2D en medio DMEM, suplementado con 10% de FBS, 110 mg/L de piruvato sódico (BioWhittaker, Walkersville, MD,

USA), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y estabilizado con 200 mM de L-glutamina.

3.2.3.3 Carga de las células en el scaffold y tratamiento

Los stocks congelados de MSC se descongelaron y se precultivaron en plástico 2D durante 3-4 días, tras lo cual se despegaron con tripsina para sembrar en el scaffold. La lámina de alginato con microesferas blancas, seleccionada para contener las MSC, se incubó overnight a 4°C en FBS puro y seguidamente se centrifugó sobre mallas de nylon de 100 µm de tamaño de poro (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) a 100 g durante 2 min para eliminar el exceso de líquido.

Las láminas de alginato se colocaron en placas de Petri y sobre cada una de ellas se gotearon 10 µL de MSC en fase 3, conteniendo 2×10^6 células/mL y se incubaron a 37°C en incubador de CO₂ durante 90 min para permitir la adhesión de las células al scaffold. Posteriormente, las láminas cargadas con las MSC se cultivaron en placas de 24 pocillos con 1 mL de medio completo durante 5 días a 37°C. El medio se cambió después de 3 días.

En el caso de los condrocitos, la carga con 2×10^6 rbC/mL en fase 3 se realizó de forma similar exceptuando el tratamiento previo de las láminas con FBS, que no se realizó. Además, el medio de cultivo para los scaffold cargados con rbC se suplementó con 10 ng/mL de FGF-2 recombinante humano (Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA), el

cual se renovó con el cambio de medio. Igualmente, las células se expandieron sobre las capas de alginato/microesferas de PLGA durante 5 días en placas de 24 pocillos.

Un total de 13 láminas de alginato-microesferas por tipo celular se sembraron, destinados 6 a implantación, 4 para la cuantificación de células viables y 3 para la determinación de células muertas para cada una de las dos rondas de cirugía realizadas.

Siete scaffolds o implantes control para cada tipo celular se cultivaron junto con los dos juegos de 6 implantes seleccionados para aplicación *in vivo*.

3.2.3.4 Tinción con Ioduro de propidio (PI)

Las células muertas se determinaron en 3 láminas, controles individuales, mediante captación espontánea de ioduro de propidio (PI) (4 mg/mL en PBS).

Por otro lado, todas las células adheridas a las láminas se visualizaron mediante tinción con PI. Para ello, las 4 láminas previamente utilizados para el ensayo del XTT para cuantificación celular, se lavaron con PBS y se fijaron en formaldehído al 4% en PBS a 4°C durante toda la noche (o/n), posteriormente se lavaron y se permeabilizaron con una disolución de Tritón X-100 al 0.2% en PBS a temperatura ambiente durante 30 min. Tras otro lavado con PBS, las células se tiñeron con una disolución de PI (4 mg/mL en PBS) a temperatura ambiente protegidas de la luz durante 15 min. La

inspección visual se realizó con un microscopio invertido Aixover 40 CFL (Jena, Germany) y las fotografías con una cámara digital Canon PowerShot A620 (Tokyo, Japan).

3.2.3.5 Cuantificación de células adheridas al scaffold

Para estimar el número de células viables adheridas al scaffold tras 5 días de pre-cultivo *in vitro*, se realizó el ensayo colorimétrico del XTT tetrazolio (Roche, Madrid, Spain) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuatro scaffolds control por ronda quirúrgica y tipo celular se transfirieron a una placa de 48 pocillos y se incubaron en la disolución de marcaje XTT bajo agitación orbital suave a 100 rpm (Plataforma orbital de agitación POS-300, Grant-bio, Grant Instruments, Cambridge, UK) a 37°C en el incubador de CO₂. Idéntico número de células a las sembradas en los scaffolds, sembradas en plástico y cultivadas durante 2 horas en incubador de CO₂ para permitir su adherencia, se utilizaron como referencia de número de células sembradas. Alícuotas del producto coloreada formazan, resultante de la metabolización del tetrazolio por acción de las deshidrogenasas mitocondriales, se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 492 nm/referencia 690 nm en un lector de placa Synergy HT (Bio Tek, Winooski, VT, USA).

3.2.4 Procedimiento quirúrgico. Evaluación histológica, histomorfométrica e inmunohistoquímica.

El defecto se practicó en 3 animales por grupo experimental y por punto de tiempo (6 y 12 semanas). Se realizaron 7 grupos experimentales para su evaluación histológica (ver Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Grupos experimentales para el sistema de triple capa ALG-PLGA.

Grupos	Animales	Descripción
Análisis histológico		
Grupo Control (C)	6	Defecto vacío
Grupo Blanco (B)	6	Microesferas blancas contenidas en implantes de alginato
BMP-2 (5 µg)	6	5 µg de BMP-2 en microesferas contenidas en implantes de alginato
Grupo MSC	6	Implantes precultivados con MSC (Células madre mesenquimales de conejo)
Grupo rbC	6	Implantes precultivados con rbC (Condrocitos de conejo)
Grupo BMP-MS	6	5 µg de BMP-2 en implantes precultivados con MSC
Grupo BMP-rbC	6	5 µg de BMP-2 en implantes precultivados con rbC

Tanto el procedimiento quirúrgico como los análisis histológicos, histomorfométricos e inmunohistoquímicos, la metodología utilizada para la cuantificación de la respuesta y el análisis estadístico han sido previamente descritos en el capítulo anterior 3.1, apartados 3.1.5, 3.1.7, 3.1.8, 3.1.9 y 3.1.10 respectivamente.

Resultados

4. Resultados

4.1. Caracterización de las microesferas y del cilindro poroso de PLGA

Las microesferas conteniendo BMP-2 o TGF- β 1 presentaron un diámetro medio en volumen de $227,9 \pm 50 \mu\text{m}$ y $250,2 \pm 50 \mu\text{m}$ respectivamente, con una superficie lisa y muy poco porosa (Fig. 4.1). El rendimiento de encapsulación en las microesferas fue del $60,5 \pm 4,5\%$ para la BMP-2 y del $65 \pm 6,3\%$, para el TGF- β 1.

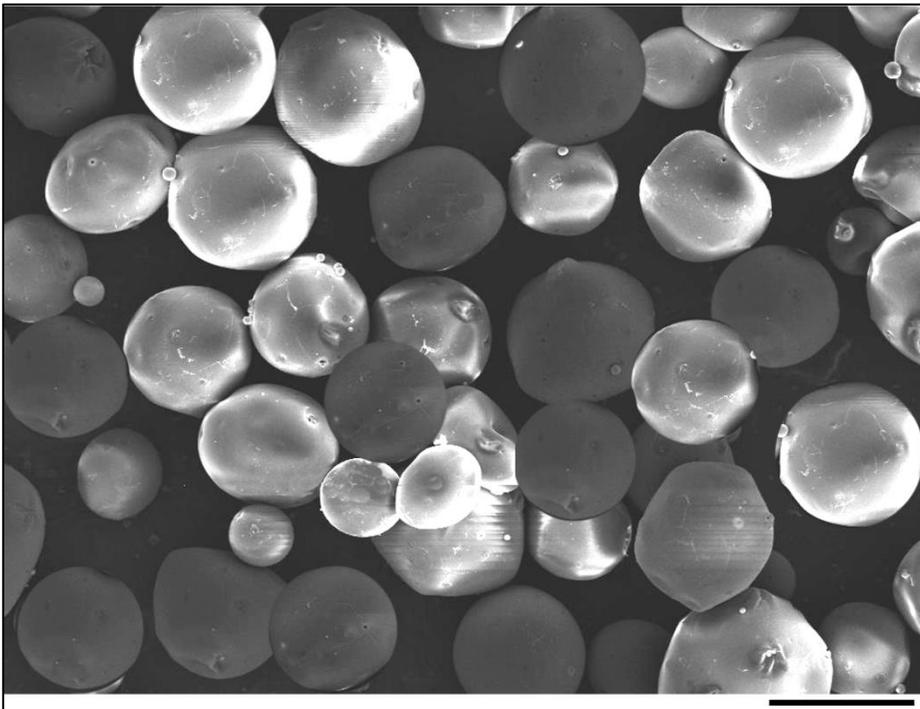


Figura 4.1. Imagen representativa de microscopía electrónica de barrido (SEM) en la que se muestra el tamaño y la morfología de las microesferas de PLGA. Barra de escala = $250 \mu\text{m}$.

En cuanto a la porosidad del cilindro de PLGA, correspondiente a la capa subcondral, ésta fue del 71,3% determinada por porosimetría de mercurio (poros entre 3,6 nm y 360 μm de diámetro). El valor de porosidad total estuvo bastante próximo, siendo del $77,3 \pm 2,2\%$.

4.2 Scaffold de doble capa ALG-PLGA

4.2.1 Caracterización del sistema

El tamaño de los sistemas de ALG-PLGA fue aproximadamente de 4,5 mm de diámetro x 4 mm de alto con un peso medio de $22,5 \pm 2,5$ mg. La morfología y estructura interna del scaffold de doble capa se muestra en la figura 4.2. La variabilidad en dosis de FC, determinada midiendo niveles de radiactividad en los sistemas individualmente fue de 4,8%, lo que indica uniformidad en las dosis administradas a los animales. La captación de agua de la capa de ALG conteniendo las microesferas fue de $130 \pm 20\%$, consecuencia de la gran capacidad de las esponjas de ALG para captar agua.

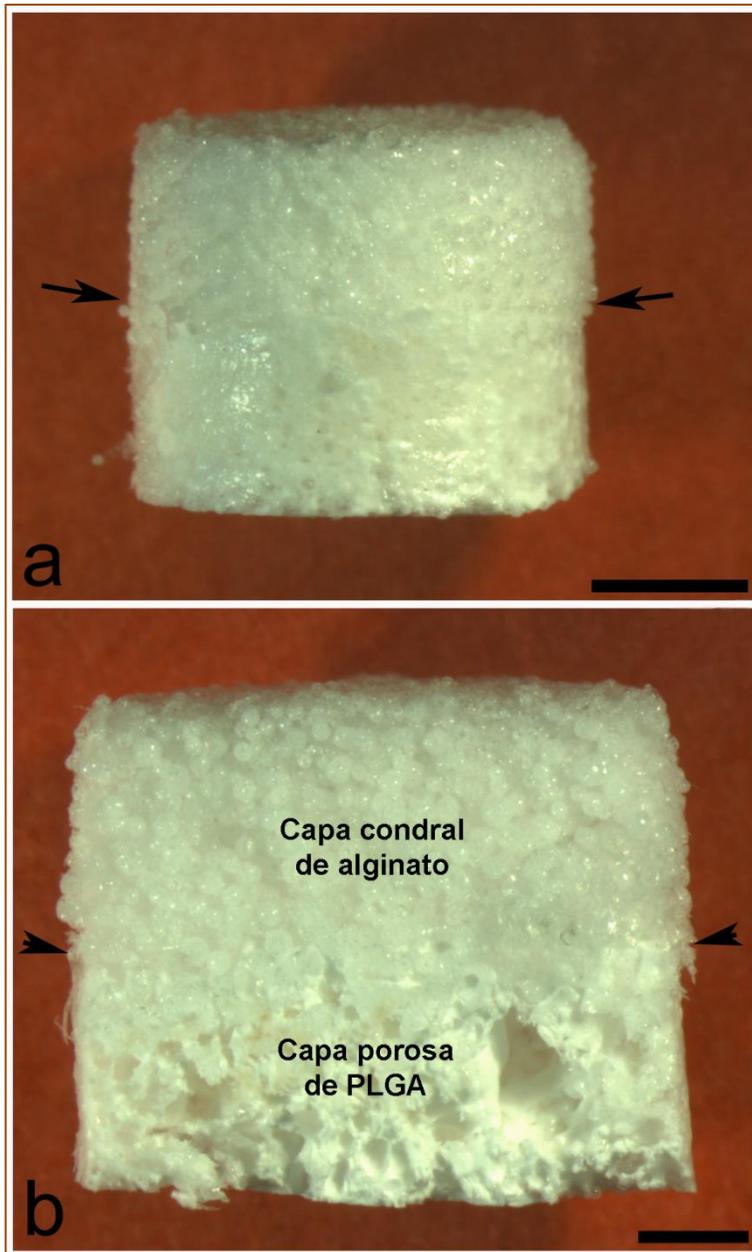


Figura 4.2. Scaffold/andamio/implante de doble capa de ALG-PLGA para el defecto osteocondral (a). Vista en sección transversal del scaffolds (b). Las flechas y puntas de flecha señalan la interface entre las capas del scaffold. Barras de escala = (a) 2 mm, (b) 1 mm.

4.2.2 Cesión *in vitro* de BMP-2 y TGF- β 1

Los perfiles de cesión *in vitro* de ^{125}I -BMP-2 y ^{125}I -TGF- β 1 desde los dos sistemas fueron paralelos (Fig. 4.3). Durante el primer día, se produjo una liberación inmediata o “burst” moderado, de un 14% y 24% para el TGF- β 1 y la BMP-2 respectivamente. Durante los 9 días siguientes, se cede aproximadamente un 17% más y a partir de este momento, las tasas de cesión disminuyeron hasta alcanzar, después de 8 semanas, aproximadamente un 40% del contenido en TGF- β 1 y un 60% del total de BMP-2 en el sistema. Por último, solamente un 12-14% de ^{125}I fue detectado en el sobrenadante al final del ensayo de liberación lo que indica que la unión ^{125}I -FC fue estable y se mantuvo en niveles aceptables durante todo el periodo de estudio.

4.2.3 Bioactividad de la BMP-2 y el TGF- β 1

En el caso de la BMP-2 se estableció una relación lineal dosis-respuesta medida como actividad fosfatasa alcalina (ALP) en cultivos de MSC, en el intervalo de dosis de 50 a 300 ng/mL. Por el contrario, con el TGF- β 1 se obtuvo una relación logarítmico-lineal entre las dosis en el intervalo de dosis de 0,01 a 1 ng/mL y la actividad antiproliferativa en cultivos de células epiteliales de pulmón de visón (Mv-1-Lu). La bioactividad de los FC se expresó como porcentaje de la respuesta celular observada respecto a disoluciones patrón. La concentración de dichas disoluciones patrón se fija de acuerdo a los porcentajes liberados, previamente determinados por radiactividad, en

los ensayos de cesión *in vitro*. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la bioactividad inducida por BMP-2 o TGF- β 1 después de 1 y 7 días de incubación y las correspondientes disoluciones patrón, incubadas bajo las mismas condiciones. Estos resultados indican que la BMP-2 y el TGF- β 1 no sufren pérdidas significativas de bioactividad durante el proceso de preparación de los scaffolds o durante el ensayo de cesión *in vitro*, al menos durante una semana.

4.2.4 Cesión *in vivo* de BMP-2 y TGF- β 1

Las cinéticas de liberación de BMP-2 y TGF- β 1 desde los sistemas implantados en el defecto osteocondral se monitorizaron midiendo la radiactividad remanente en los scaffolds durante 6 semanas (Fig. 4.3). Los perfiles de cesión de los FC mostraron una liberación durante las primeras 24 horas de aproximadamente el 20% de BMP-2 y el 15% de TGF- β 1. Los perfiles de cesión de ambos FC presentaron dos fases caracterizadas cada una de ellas por una velocidad de liberación constante, ambos segmentos se ajustan a una cinética de orden cero. La BMP-2 fue cedida a una velocidad de 5.2%/día durante la primera fase que abarca las primeras 2 semanas, seguida por una liberación lenta de aproximadamente 0,67%/día durante las últimas semanas. Prácticamente la totalidad de la dosis (98%) de la BMP-2 encapsulada fue cedida a lo largo del periodo de monitorización. El perfil de cesión del TGF- β 1 fue similar, siendo ligeramente más lenta la velocidad de

cesión durante las primeras semanas que en el caso de la BMP-2. La primera fase duró unas 3 semanas, y se liberó un 3,6% de TGF- β 1/día. La segunda fase se caracterizó por una menor velocidad de liberación, aproximadamente un 0,65%/día, alcanzando el 93% al final de la sexta semana.

Como se aprecia en la figura 4.4, se ha establecido una correlación lineal entre los porcentajes de liberación *in vivo-in vitro* que se ajustan a las ecuaciones 1 y 2 para BMP-2 y TGF- β 1, respectivamente.

$$y = 2,79x - 50,64 \quad (R^2 = 0,9923) \quad (\text{ec.1})$$

$$y = 3,28x - 45,47 \quad (R^2 = 0,8739) \quad (\text{ec. 2})$$

Las diferencias entre los perfiles de cesión *in vitro* e *in vivo* se reflejan en la pendiente de la recta, con un valor superior a 1, en ambos casos, lo que indica que *in vivo* las proteínas se liberan más rápidamente que *in vitro* (Fig. 4.4).

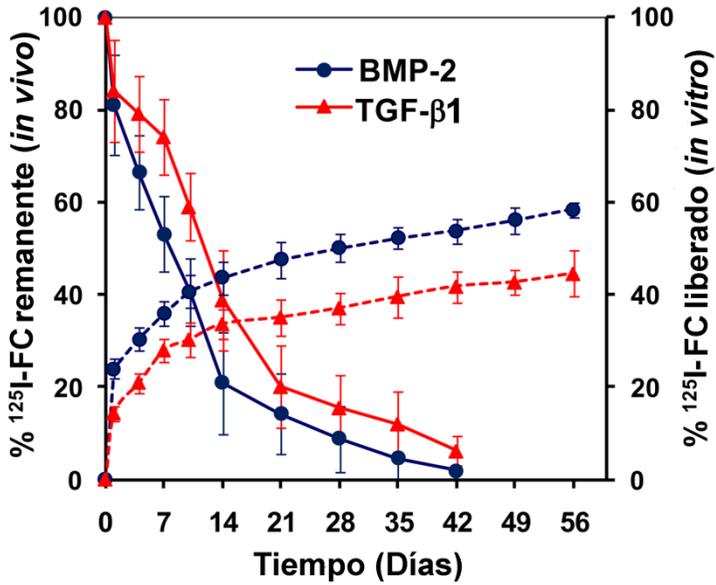


Figura 4.3. Porcentajes de factor de crecimiento (FC) remanente en el lugar de implantación (líneas continuas) tras la colocación de los scaffolds de doble capa ALG-PLGA en el defecto osteocondral en fémur de conejo. Perfiles de cesión acumulativos de los factores de crecimiento (líneas discontinuas) obtenidos a partir de scaffolds incubados en PBS.

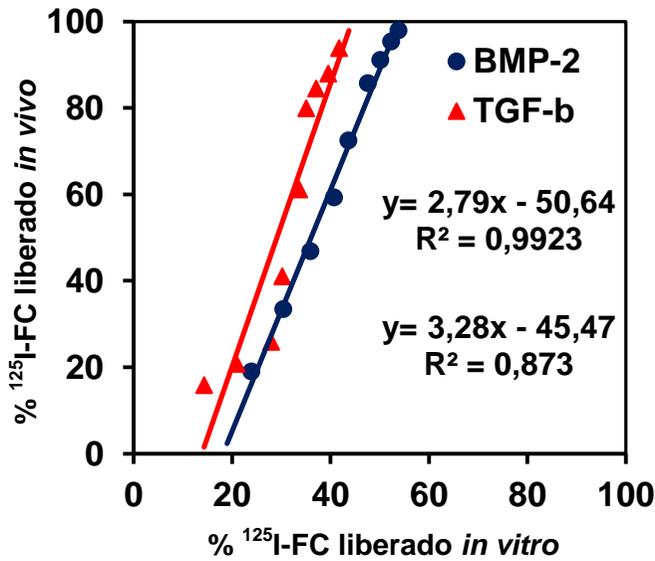


Figura 4.4. Correlación *in vivo-in vitro* de los perfiles de liberación de los FC desde el sistema de ALG-PLGA.

4.2.5 Biodistribución de la BMP-2 y el TGF- β 1

La distribución del TGF- β 1 y la BMP-2 liberados *in vivo* se analizó en sangre y en los tejidos óseo y muscular próximos al lugar del defecto. Después de 6 semanas de liberación, los niveles de TGF- β 1 y la BMP-2 en las diferentes muestras de tejido, mostraron que los FC permanecieron localizados alrededor del lugar de implantación. Los niveles fueron indetectables a medida que se incrementaba la distancia al lugar de implantación. Los niveles de radiactividad en las muestras de sangre no se distinguieron del ruido de fondo a lo largo de todo el periodo experimental, indicando ausencia completa de exposición sistémica.

4.2.6 Análisis histológico

Durante el proceso quirúrgico, los sistemas implantado en el lugar del defecto, absorbieron sangre y sustancias procedentes de la médula ósea subyacente (Fig. 4.5 a). De hecho, el análisis histológico de las muestras procedentes de animales tras 2 semanas de implantación mostró que los implantes habían sido infiltrados por MSC y por contenido hemático (Fig. 4.5 b-d). Se observó asimismo la presencia de pequeños vasos sanguíneos entre las microesferas de PLGA (Fig. 4.5 e).

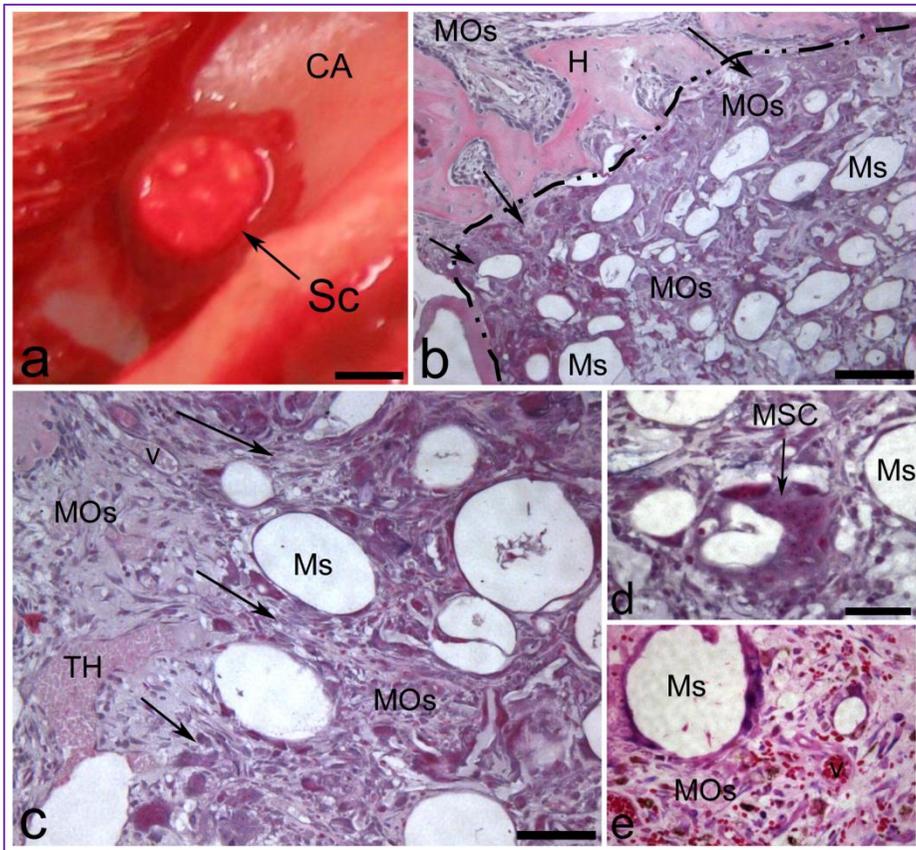


Figura 4.5. Vista macroscópica mostrando el scaffold de ALG-PLGA después de su implantación en el defecto osteocondral. El scaffold aparece impregnado con sangre procedente de la médula ósea subyacente (a). Imágenes representativas en sección horizontal de un animal, 2 semanas p-i, mostrando la zona del scaffold (línea discontinua) en contacto con tejido adyacente. La presencia de elementos celulares (flechas) entre las microesferas, pone de manifiesto, la infiltración del scaffold por el tejido medular (b). Detalle a mayor aumento del proceso de infiltración del scaffold (c). Detalles a mayor aumento mostrando la presencia de un pequeño grupo de MSC (flecha) alrededor de una microesfera (d), y la presencia de células de la médula ósea y vasos sanguíneos (v) en el interior de la estructura del scaffold. CA: Cartilago articular; H: Hueso; MOs: Médula ósea; TH: Tejido hemático; Ms: Microesferas; MSC: Células madre mesenquimales; Sc: Scaffold/andamio/implante; v: Vaso sanguíneo. Barra de escala = (a) 3 mm; (b) 100 μ m; (c) 65 μ m; (d, e) 30 μ m.

En el grupo control (C) no se observaron signos de reparación a las 2 semanas p-i (Fig. 4.6 a,a'), mientras que en el grupo blanco (B) el defecto aparecía relleno de tejido conjuntivo (Fig. 4.6 b,b'). En la

mayoría de los animales de ambos grupos, se observó la presencia de uno o ambos bordes del defecto (Fig. 4.6 a,a',b,b' y Fig. 4.7 e,e'), así como un aumento de grosor del hueso subcondral (Fig. 4.6 a,a',b,b' y Fig. 4.7 e,e').

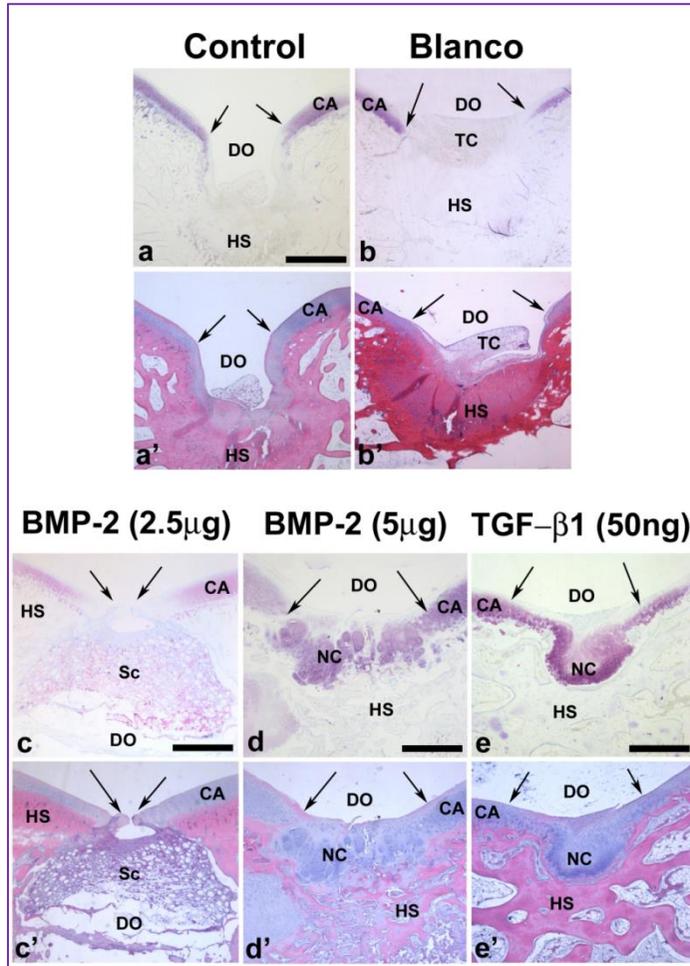


Figura 4.6. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto parcialmente reparado con el sistema de ALG-PLGA en fémur de conejo, 2 semanas p-i, donde se muestran diferencias entre los animales del grupo control (Grupo C) (a, a') y los del grupo blanco (Grupo B) (b, b'), y diferencias entre los animales del grupo BMP-2 (2,5 µg) (c, c') frente a los animales de los grupos BMP-2 (5 µg) (d, d') y TGF-β1 (e, e'). CA: Cartílago articular; TC, tejido conjuntivo; NC: Neocartílago; DO: Defecto osteocondral; HS: Hueso subcondral; Sc: Scaffold/andamio/implante. Barras de escala = (a,a',b,b') 1,5 mm, (c,c'-e,e') 2 mm.

A las 6 semanas p-i, el tejido conjuntivo en la zona del defecto había disminuido, siendo sustituido por fibrocartílago en la mayoría de los animales de ambos grupos (C y B) como pudo observarse tanto en las muestras de hematoxilina-eritrosina (H-Er) como en las de azul de toluidina (AT) (Fig. 4.7 f,f'). Se observó también integración, en uno o ambos extremos, del cartílago reparado con el cartílago normal adyacente en la mayoría de los animales (Fig. 4.7 f). En la región del hueso subcondral se detectaron procesos activos de remodelado, pudiendo observarse la morfología característica del hueso esponjoso (Fig. 4.7 f).

A las 12 semanas p-i, la presencia de fibrocartílago en la zona del defecto había aumentado en la mayoría de los animales de los grupos C y B. Una intensa tinción con AT se observó en la zona más profunda del defecto, cercana al hueso subcondral, indicando mayor presencia de neocartílago en algunos de los animales (Fig. 4.7 g,g'). Después de 24 semanas, la mayoría de los animales de los grupos C y B presentaban aún, un grado deficiente de reparación del defecto. En algunos animales, los bordes del defecto eran evidentes, observándose en algunos casos la presencia de fisuras de gran tamaño (Fig. 4.7 h,h'). Hay que señalar, la ausencia de tejido conjuntivo en la zona del defecto en la mayoría de los animales de ambos grupos (C y B).

La evolución del defecto, en los animales implantados con scaffolds conteniendo FC fue completamente distinta de la de los animales pertenecientes a los grupos C y B. Aunque en algún punto del análisis se observaron variaciones entre los grupos tratados con FC, se observó en general una tendencia similar en el grado de reparación a lo largo de todo el experimento. De forma excepcional, los animales implantados con la dosis de 2,5 μg de BMP-2 exhibieron marcadas diferencias histológicas en comparación con los otros dos grupos tratados con FC, dosis de 5 μg de BMP-2 y 50 ng de TGF- β 1 (Fig. 4.6 c,c',d,d',e,e').

El defecto en los animales pertenecientes a los grupos TGF- β 1 y BMP-2 (5 μg) aparecían completamente rellenos a las 2 semanas p-i, principalmente con fibrocartílago y tejido conjuntivo, presente este último sobre todo en los márgenes del defecto. La tinción con AT puso de manifiesto la formación de elementos de cartílago bien definidos en zonas profundas del defecto, en contacto con el hueso subcondral (Fig. 4.7 i,i'). Asimismo, se observó continuidad entre el cartílago reparado y el cartílago normal adyacente, superficies más o menos regulares y ausencia de hendiduras o fisuras (Fig. 4.7 i,i'). En el grupo BMP-2 (5 μg), se detectaron islotes de tejido cartilaginoso entre el tejido conjuntivo (Fig. 4.7 m, m'). Los márgenes del defecto fueron evidentes en algunos casos, estando unidos al cartílago normal adyacente mediante tejido conjuntivo (Fig. 4.7 m,m'). Ambos grupos,

TGF- β 1 y BMP-2 (5 μ g), exhibieron una delgada capa de tejido conjuntivo en la superficie del defecto (Fig. 4.7 i,i',m,m'). Curiosamente, apenas se observó tejido conjuntivo en estos dos grupos experimentales en comparación con los demás grupos, siendo más evidente la ausencia del mismo en el grupo BMP-2 (5 μ g). A pesar de las similitudes, la apariencia histológica del cartílago reparado, fue mejor en el grupo BMP-2 (5 μ g), que en el grupo TGF- β 1 (Figs. 4.6 d,d',e,e', 4.7 i,i', m,m'). Por el contrario, no se observaron signos de reparación en el grupo BMP-2 (2,5 μ g) en este punto de análisis (2 semanas p-i) (Fig. 4.6 c,c'). El defecto no se rellenó, siendo evidentes los márgenes, así como una gran hendidura en el centro del mismo (Fig. 4.6 c,c'). En algunos de los animales, pudo observarse la presencia del scaffold en el interior del defecto (Fig. 4.6 c,c'). Se observaron signos de reparación en el hueso subcondral desde las 2 semanas p-i siendo evidente en la mayoría de los casos la morfología característica del hueso esponjoso (Fig. 4.7 i, i',m,m'). Tras 6 semanas p-i, todos los grupos tratados con FC mostraron claros signos de reparación, con reparación completa del hueso subcondral y presencia de neocartílago con buenas características histológicas en la mayoría de los animales (Fig. 4.7 j,j',n,n').

Tras 12 semanas p-i, todos los grupos tratados con FC mostraron un alto grado de reparación del defecto, exhibiendo un cartílago neoformado de mayor grosor que el cartílago normal adyacente en la

zona central del defecto, pero no en la zona de los márgenes (Fig. 4.7 k,k',o,o'). Las células presentaban la morfología característica de los condrocitos del cartílago hialino y una superficie bastante regular caracterizada por un alto grado de uniformidad (Fig. 4.7 k,k',o,o').

Tras 24 semanas p-i, final del periodo experimental, todos los grupos tratados con FC mostraron características similares a las observadas a las 12 semanas, excepto en lo referente al grosor del cartílago neoformado, el cual se asemejaba al del cartílago normal adyacente (Fig. 4.7 a-d), siendo más delgado que a las 12 semanas p-i (Fig. 4.7 l,l',p,p').

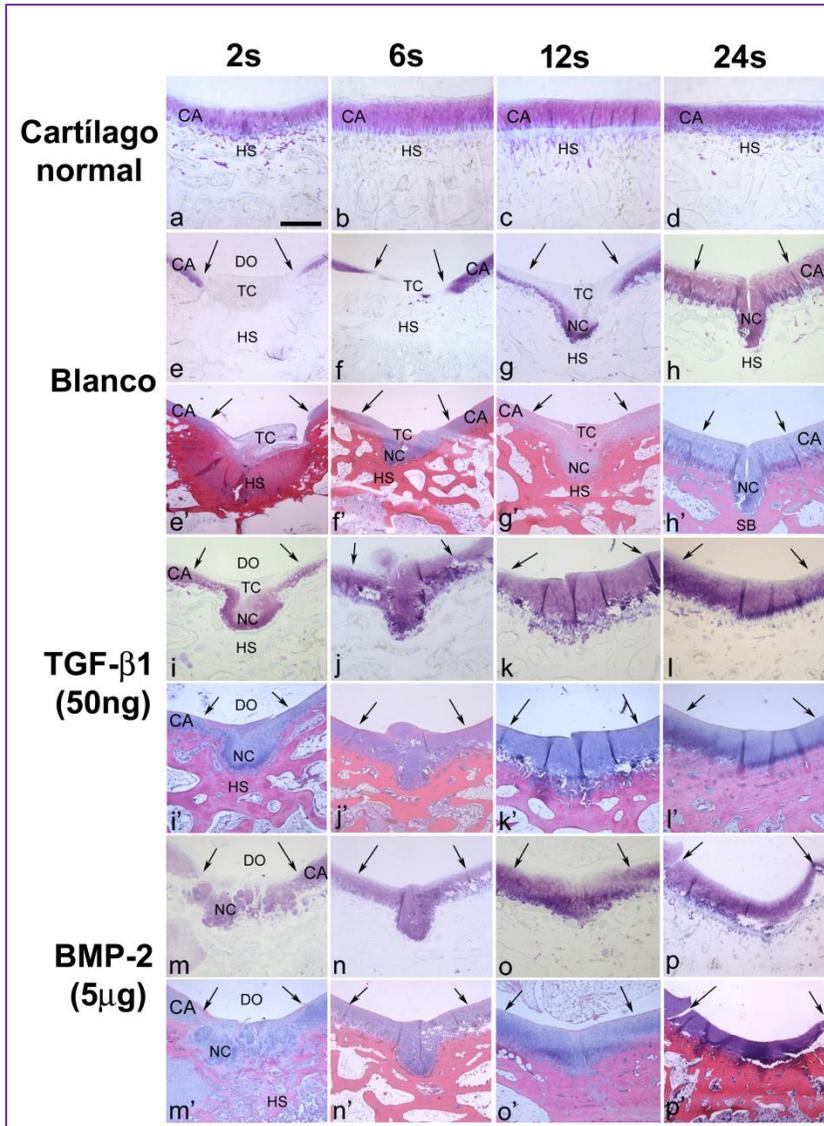


Figura 4.7. Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo mostrando el cartilago articular normal correspondiente a la pata no intervenida (a-d, tinción con AT), el defecto osteocondral en los distintos puntos de análisis con el sistema de ALG-PLGA en los animales del grupo blanco (grupo B) (e-h, tinción con AT; e'-h' tinción con H-Er), en los animales del grupo TGF-β1 (i-l, tinción con AT; i'-l', tinción con H-Er) y en los animales del grupo BMP-2 (5 μg) (m-p, tinción con AT; m'-p', tinción con H-Er). Las flechas indican la extensión aproximada del defecto osteocondral. CA: Cartilago articular; TC: Tejido conjuntivo; NC: Neocartilago; DO: Defecto osteocondral; HS: Hueso subcondral; s: Semanas; Barra de escala = 2 mm.

En general, se observaron diferentes respuestas celulares en las distintas capas del scaffold. En la capa condral de ALG, se observó proliferación y diferenciación condrogénica, mientras que en la capa subcondral de PLGA se observó proliferación y diferenciación osteogénica.

4.2.7 Puntuación histológica

La puntuación de los resultados histológicos según la escala de Wakitani et al., (1994), modificada por Tokuhara et al., (2010), no reveló signos aparentes de reparación del defecto osteocondral en los grupos C y B tras 2 y 6 semanas p-i, con puntuaciones de 0 a 4 (Fig. 4.8 a). Tras 12 y 24 semanas, leves signos de reparación se observaron en ambos grupos, con puntuaciones entre 4 y 7 (Fig. 4.8 a).

A las 2 semanas p-i, la apariencia del defecto en los animales tratados con BMP-2 (2,5 µg) no difirió significativamente de lo observado en los grupos C y B, con puntuaciones en torno a 3, mientras que los grupos tratados con BMP-2 (5 µg) y TGF-β1 mostraron claros signos de reparación, con puntuaciones entre 8 y 11, y diferencias significativas ($p < 0.001$) con el resto de los grupos (C, B y BMP-2 (2,5 µg)) (Fig. 4.8 a). Aunque las diferencias entre los grupos BMP-2 (5 µg) y TGF-β1 no fueron estadísticamente significativas, el grupo de BMP-2 (5 µg) presentó una puntuación más alta (10) que el grupo TGF-β1 (8,3).

Tras 6 semanas p-i, el análisis de todos los grupos tratados dio puntuaciones entre 9 y 12, mostrando diferencias significativas con los grupos C y B. Se observaron también diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo BMP-2 (2,5 μg), y los grupos BMP-2 (5 μg) y TGF- β 1 (Fig. 4.8 a).

La puntuación histológica a las 12 y 24 semanas, dio valores entre 12 y 17 en todos los grupos tratados, con diferencias significativas ($p < 0.001$) frente a los grupos C y B. Una diferencia sutil aunque estadísticamente significativa ($p < 0.05$) se observó entre los dos grupos tratados con BMP-2 a las 12 semanas p-i (Fig. 4.8 a).

No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con FC al final del periodo experimental (24 semanas p-i).

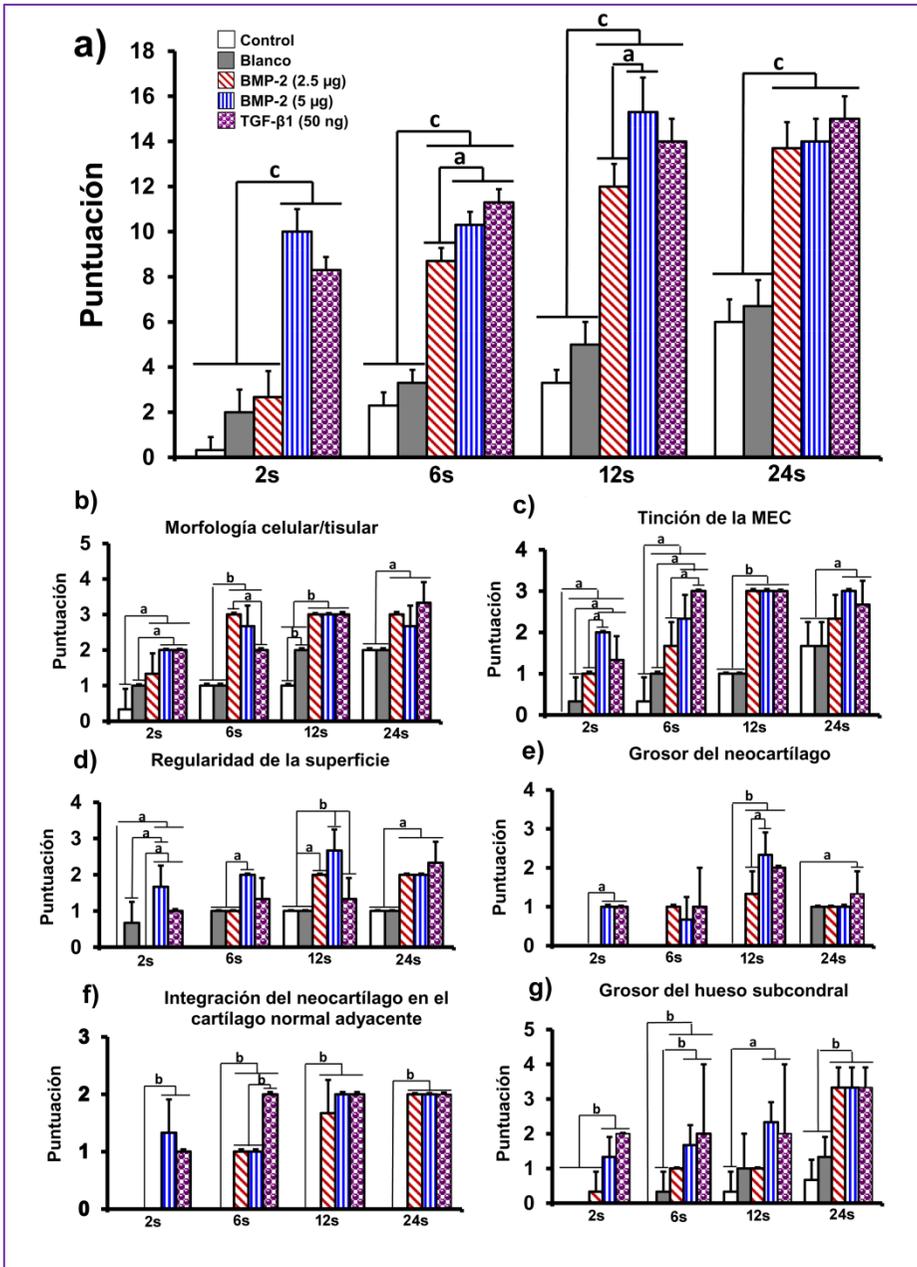


Figura 4.8. Puntuación histológica total del proceso de reparación del defecto osteocondral con el sistema de ALG-PLGA (a). Puntuación histológica de los distintos parámetros osteocondrales evaluados en cada uno de los grupos experimentales (b-g). s: semanas. Los histogramas representan la media \pm DS; ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ y ^c $p < 0.001$.

La puntuación histológica en relación a la morfología celular/tisular y al grado de tinción de la MEC (Fig. 4.8 b,c) se corroboró mediante la detección inmunohistoquímica de diferentes proteínas osteogénicas y condrogénicas en la zona del defecto (Fig. 4.9), y la cuantificación del número de células inmunoreactivas (ir) para cada una de ellas (Fig. 4.10). La cuantificación reveló una disminución progresiva del número de células Col I-ir (fibroblastos) en todos los grupos desde las 2 a las 24 semanas p-i (Fig. 4.10 a), mientras que se produjo un aumento progresivo del número de células Col II-ir y agrecano-ir (condrocitos) (Figura 4.10 b,c). A pesar de no mostrar diferencias estadísticamente significativas, el grupo BMP-2 (5 µg) presentó un número ligeramente mayor de células Col II-ir y agrecano-ir que el grupo TGF-β1. En el caso del colágeno tipo IX, se detectó mayor número de células inmunoreactivas en los grupos tratados con FC con respecto a los grupos C y B desde las 2 semanas p-i, si bien las diferencias no fueron significativas con respecto al grupo BMP-2 (2,5 µg). Los resultados para el colágeno tipo X, mostraron un número bajo de células inmunoreactivas en todos los grupos a lo largo del periodo experimental, estando generalmente la inmunoreacción restringida a la zona de cartílago calcificada (Fig. 4.9).

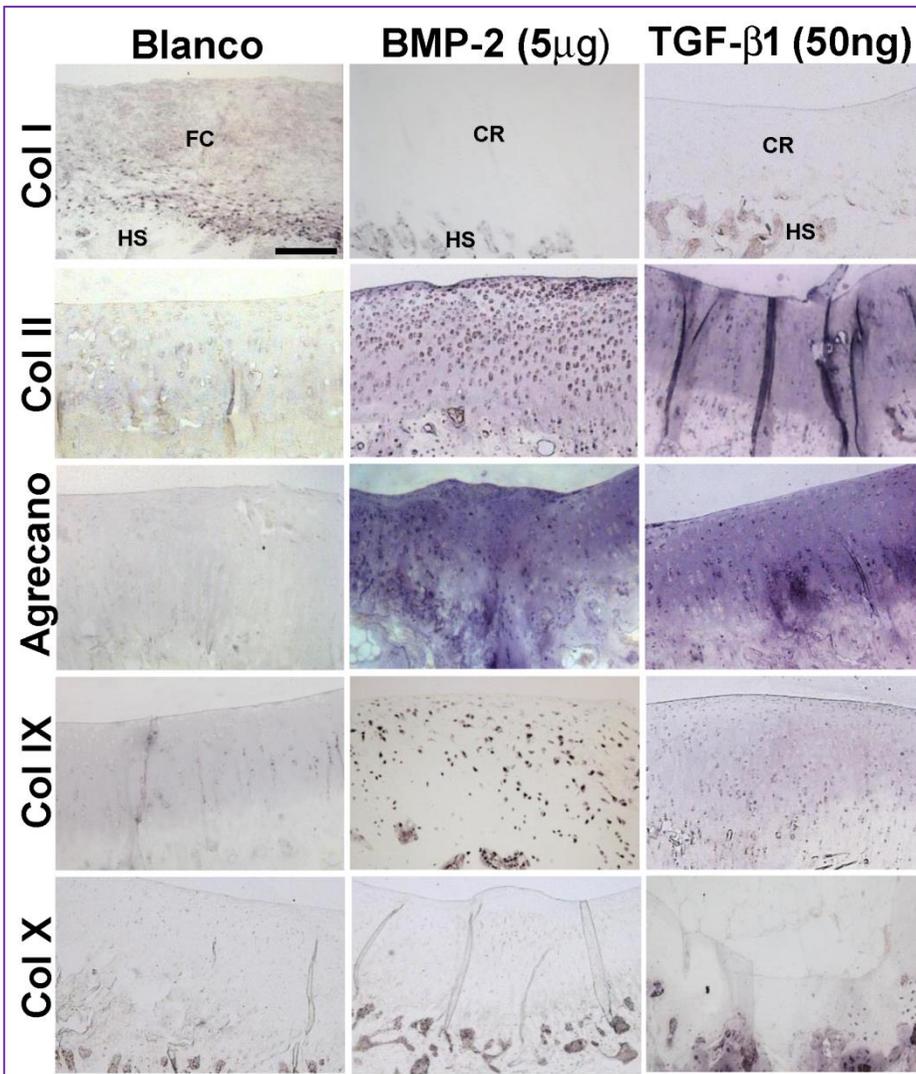


Figura 4.9. Imágenes representativas que muestran la inmunoreacción para el colágeno tipo I, colágeno tipo II, agrecano, colágeno tipo IX y colágeno tipo X en el defecto osteocondral de animales implantados con el sistema de ALG-PLGA de los grupos B, BMP-2 (5 μ g) y TGF- β 1 (50 ng) a las 24 semanas p-i. CR: Cartílago reparado, FC: Fibrocartílago, HS: Hueso subcondral. Barra de escala = 180 μ m.

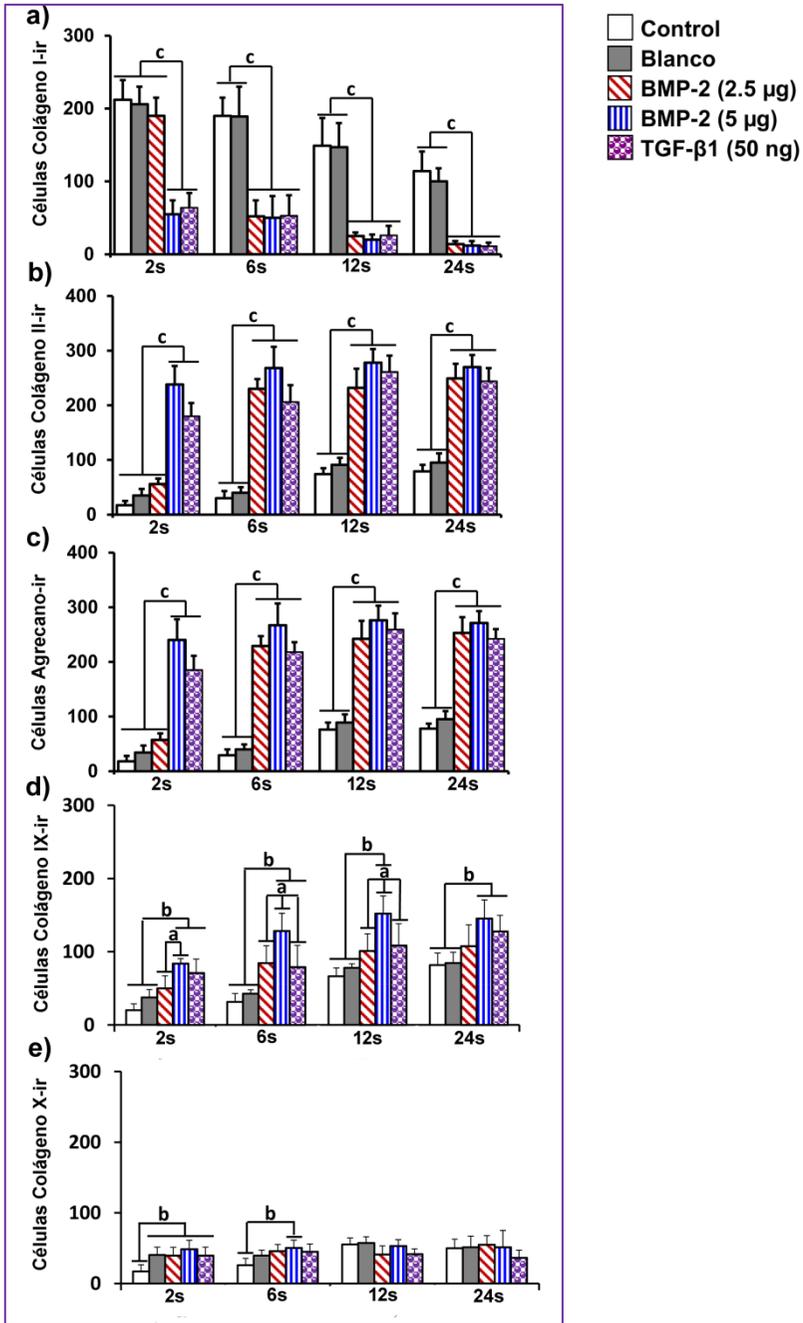


Figura 4.10. Número de células Col I-ir (a), Col II-ir (b), agrecano-ir (c), Col IX-ir (d) y Col X-ir (e) en los diferentes grupos implantados con el sistema de ALG-PLGA a lo largo de todo el periodo experimental. Los histogramas representan la media de células inmunoreactivas (ir) por unidad de área (1000 μm²) ± DS; ^ap<0.05, ^bp<0.01 y ^cp<0.001.

4.3 Scaffold de doble capa SPU-PLGA

4.3.1 Caracterización del sistema

El tamaño aproximado de los sistemas fue de 4,3 mm de diámetro x 4 mm de alto con un peso medio de $28,7 \pm 3,8$ mg. La morfología y la estructura interna del scaffold de doble capa al estereomicroscopio, se muestran en la figura 4.11.

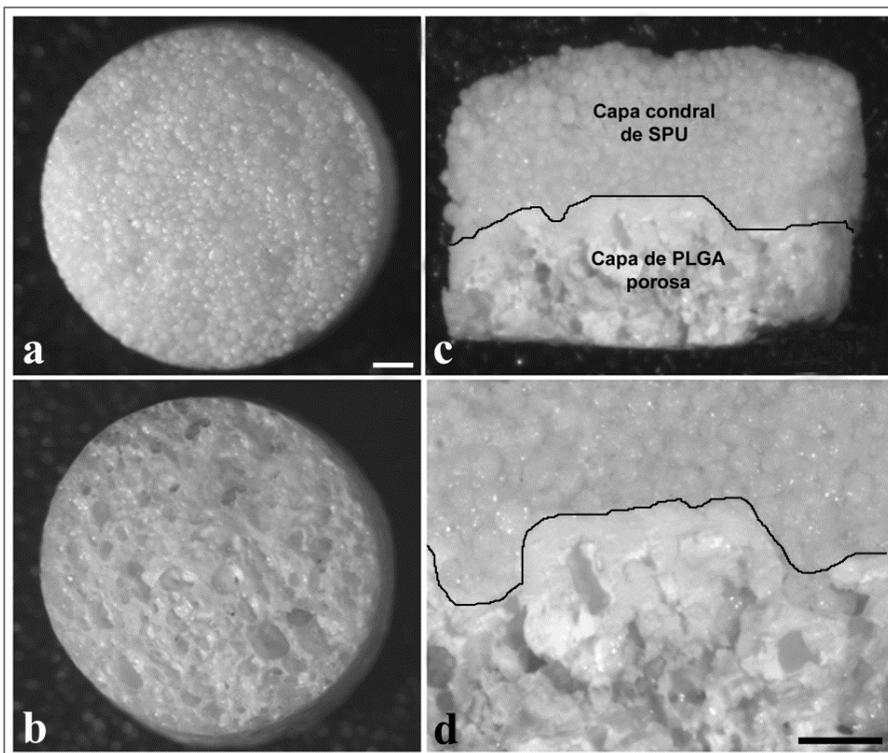


Figura 4.11. Implante de doble capa SPU-PLGA para defecto osteocondral. Visión desde arriba de la capa de SPU conteniendo las microsferas (a) y PLGA (b). Visión en sección transversal (c) y detalle de la interface entre ambas capas (d). Las líneas continuas en las imágenes c y d señalan la interface entre las dos capas del scaffold. Barra de escala = 0,75 mm.

4.3.2 Cesión *in vitro* de BMP-2 y TGF- β 1

La BMP-2 y el TGF- β 1 exhibieron una cesión *in vitro* extremadamente lenta, al menos durante las 8 semanas que se prolongó el ensayo de cesión (Fig. 4.12). Aproximadamente, el 30% de la BMP-2 se liberó durante la primera semana, seguida por una velocidad de liberación de 3,9% por semana. El perfil de cesión del TGF- β 1 fue similar; durante la primera semana, se cedió aproximadamente un 20%. La segunda fase de liberación de TGF- β 1 se caracterizó por una velocidad de cesión más lenta que la observada para la BMP-2, concretamente de 2,8% por semana. Al final de la octava semana, aproximadamente un 60% y un 40% de la cantidad total encapsulada de BMP-2 y TGF- β 1, respectivamente, se habían cedido.

Se detectó aproximadamente un 12% de 125 I libre, indicando buena estabilidad del marcaje durante los ensayos.

Además, al igual que con los sistemas de ALG-PLGA, las proteínas mantienen su actividad durante el proceso de elaboración y al menos durante la primera semana de incubación en el medio de cesión.

4.3.3 Cesión *in vivo* de BMP-2 y TGF- β 1

Los perfiles de cesión de ambos FC fueron virtualmente paralelos y no mostraron signos de un efecto “burst” o pico inicial de liberación. Durante las primeras 24 horas, solamente se liberó el 1,6% de BMP-2

y el 5,4% de TGF- β 1. La cinética de liberación se ajusta a una cinética de orden cero con una velocidad de cesión constante del 21% de BMP-2 por semana durante 4 semanas y del 18,5% de TGF- β 1 por semana durante 5 semanas (Fig. 4.12). Además, más del 90% de cada uno de los FC encapsulados fue cedido al final de la sexta semana. En la figura 4.12 se aprecia claramente las diferencias de los perfiles de liberación *in vivo* e *in vitro*.

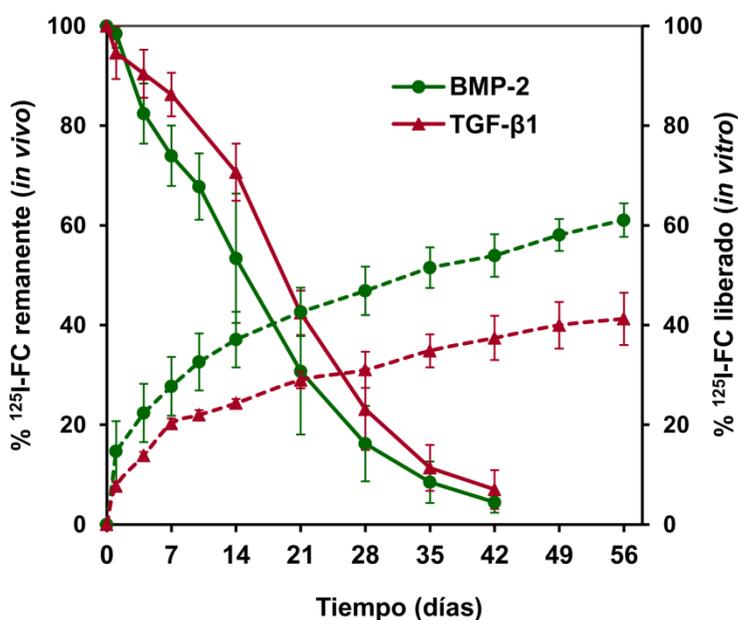


Figura 4.12. Porcentajes de factor de crecimiento remanente en el lugar de implantación (líneas continuas) tras la colocación de los scaffolds de doble capa de SPU-PLGA en el defecto osteocondral en conejo. Perfiles de cesión acumulativos de los FC (líneas discontinuas) obtenidos a partir de scaffolds incubados en PBS.

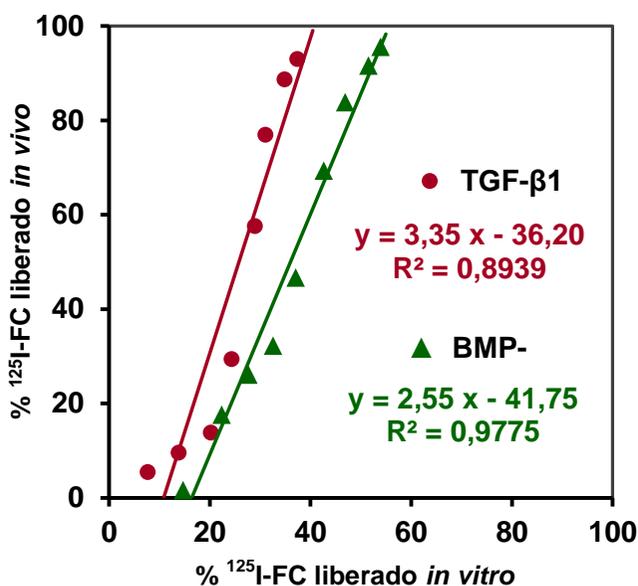


Figura 4.13. Correlación *in vivo-in vitro* de los perfiles de liberación de los FC desde el sistema de SPU-PLGA.

Y en la figura 4.13, nuevamente se pone de manifiesto que la velocidad de liberación *in vivo* es mayor, aproximadamente el triple, que *in vitro*, con pendientes mayores de la unidad y liberaciones completas que raramente se observan *in vitro*.

4.3.4 Biodistribución de la BMP-2 y el TGF-β1

Al igual que con los sistemas de ALG-PLGA los FC permanecieron localizados alrededor del lugar de implantación. No se detectaron niveles de radiactividad procedentes de los sistemas conteniendo ¹²⁵I-TGF-β1 o ¹²⁵I-BMP-2 en sangre periférica durante todo el periodo de ensayo, ni en el tejido óseo y muscular próximo al defecto, 6 semanas p-i.

4.3.5 Análisis histológico

Se observaron diferencias entre el grupo control (C) y el grupo blanco (B) únicamente a las 2 semanas p-i. El análisis histológico no reveló signos de reparación en el grupo C (Fig. 4.14 a,a'), mientras que los defectos en el grupo B mostraron la presencia de tejido conjuntivo denso con abundante MEC (Fig. 4.14 b,b'). En la mayoría de los animales de ambos grupos, se observaron claramente los límites del defecto (Fig. 4.14 a,a',b,b'). Además, la región de hueso subcondral correspondiente al defecto presentó mayor grosor (Fig. 4.14 a,a',b,b' y 4.15 e,e'). Al final de la sexta semana p-i, la presencia de tejido conjuntivo en los grupos C y B fue menor y se observó por primera vez la presencia de fibrocartílago en la mayoría de los animales (Fig. 4.15 f,f'). Asimismo, la transición entre el tejido reparado y el cartílago normal adyacente mostró continuidad en la mayoría de los animales (Fig. 4.15 f,f'). La zona de hueso subcondral correspondiente al defecto mostró un proceso activo de remodelado (Fig. 4.15 f,f'). Tras 12 semanas p-i, el fibrocartílago presente en la zona del defecto, observado en la mayoría de los animales de los grupos C y B, fue reemplazado por neocartílago en algunos de ellos, invadiendo en casi todos los casos la zona subcondral. El neocartílago observado, se caracterizó, no obstante, por presentar una baja calidad histológica (Fig. 4.15 g,g'). Después de 24 semanas p-i, la mayoría de los animales de los grupos C y B exhibieron un grado variable y

limitado de reparación en la zona del defecto. En algunos animales, los bordes o límites del defecto, fueron evidentes mientras que en otros se observaron hendiduras o fisuras en el cartílago reparado (Fig. 4.15 h h').

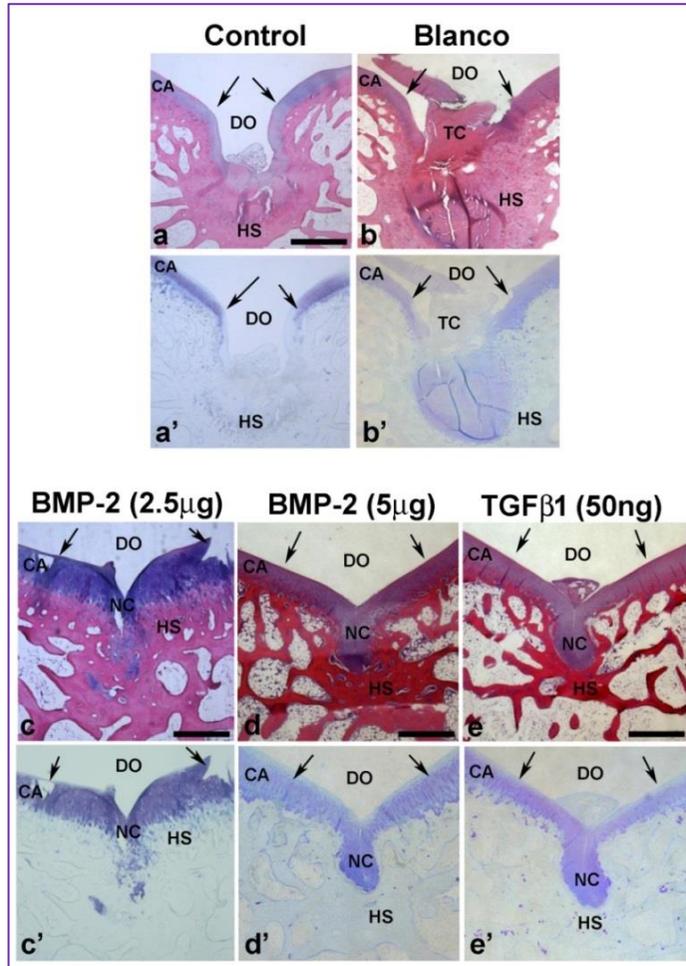


Figura 4.14. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto parcialmente reparado con el sistema de SPU-PLGA en fémur de conejo, 2 semanas p-i, donde se muestran diferencias entre los animales del grupo control (Grupo C) (a, a') y los del grupo blanco (Grupo B) (b, b'), y diferencias entre los animales del grupo BMP-2 (2,5 µg) (c, c') frente a los animales de los grupos BMP-2 (5 µg) (d, d') y TGF-β1 (e, e'). CA: Cartílago normal adyacente; TC: Tejido conjuntivo; NC: Neocartílago; DO: Defecto osteocondral; HS: Hueso subcondral; Sc: Scaffold/andamio/implante. Barras de escala = (a,a',b,b') 1,5 mm, (c,c'-e,e') 2 mm.

La respuesta en los grupos de animales implantados con scaffolds conteniendo FC fue claramente superior a la observada en los animales de los grupos C y B. A pesar de algunas variaciones, dependientes del momento de análisis, se observó una tendencia similar en cuanto al nivel de reparación a lo largo de todo el experimento. De forma excepcional, tras 2 semanas p-i, los animales implantados con 2,5 µg de BMP-2 (grupo BMP-2 (2,5 µg)) mostraron algunas diferencias histológicas, en relación a la calidad de cartílago reparado (neocartílago), con respecto a los otros grupos tratados con TGF-β1 y BMP-2 (5 µg), (Fig. 4.14 c,c',d,d',e,e').

El defecto en los animales de los grupos TGF-β1 y BMP-2 (5 µg) apareció ocupado por fibrocartílago a las 2 semanas p-i aunque en algunos animales se observó ya la presencia de neocartílago con características de cartílago hialino (Fig. 4.15 i,i',m,m'). La transición entre el cartílago neoformado y el cartílago normal adyacente mostró continuidad y la zona reparada exhibió una superficie bastante regular (Fig. 4.15 i,i',m,m'), aunque en alguno de los animales se observó la presencia de pequeñas fisuras. Es de destacar la ausencia casi completa de tejido conjuntivo en la mayoría de los animales pertenecientes a estos dos grupos tratados con FC, (TGF-β1 y BMP-2 (5 µg)). A pesar de estas similitudes, las características histológicas del tejido reparado, en los animales del grupo BMP-2 (5 µg), fueron ligeramente superiores (Figs. 4.14 c,c',d,d',e e' y 4.14 i,i',m,m'). Por el

contrario, el grupo BMP-2 (2,5 µg) mostró un reparación deficiente en este punto de análisis (Fig. 4.14 c,c'). Desde este momento, 2 semanas p-i, el hueso subcondral experimentó un remodelado continuo, observándose un hueso subcondral de características histológicas casi normales (Fig. 4.15 i,i',m,m'). A las 6 semanas p-i, se observó la presencia de un hueso subcondral completamente reparado y cartílago neoformado con buenas características histológicas, en la mayoría de los animales tratados con FC (Fig. 4.15 j,j',n,n'). A las 12 semanas p-i, todos los grupos tratados con FC mostraron un alto grado de reparación presentando un cartílago reparado ligeramente más delgado que el cartílago normal adyacente (Fig. 4.15 k,k',o,o'), con células morfológicamente similares a los condrocitos del cartílago hialino y superficie uniforme (Fig. 4.15 k,k',o,o'). A las 24 semanas p-i, Las características histológicas del cartílago reparado en los grupos tratados con FC no difirieron de las observadas a las 12 semanas p-i (Fig. 4.15 l,l',p,p'). El cartílago reparado tras 24 semanas p-i, se asemejaba en gran medida al cartílago normal adyacente (Fig. 4.15 a-d).

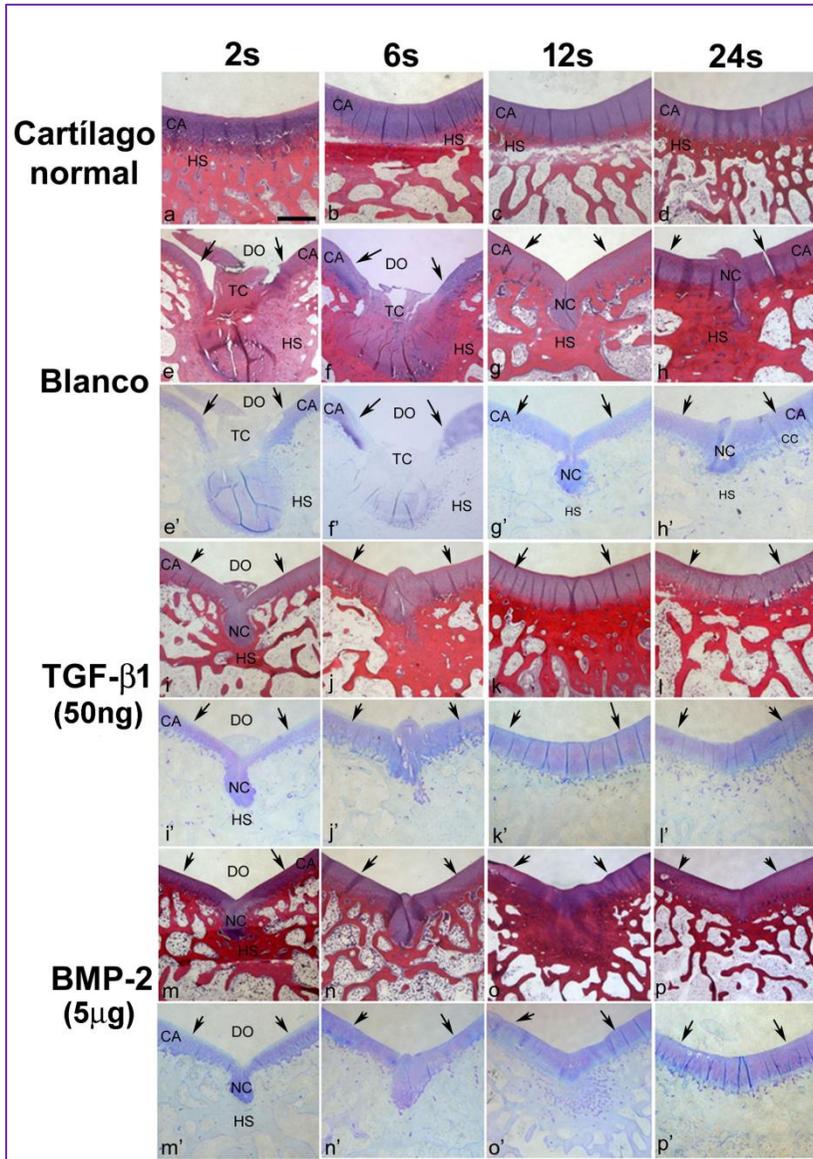


Figura 4.15. Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo mostrando el cartilago articular normal correspondiente a la pata no intervenida (a-d, tinción con H-Er), el defecto osteocondral en los distintos puntos de análisis en los animales implantados con el sistema de SPU-PLGA del grupo blanco (grupo B) (e-h, tinción con H-Er; e'-h' tinción con AT), en los animales del grupo TGF- β 1 (i-l, tinción con H-Er; i'-l' tinción con AT) y en los animales del grupo BMP-2 (5 μ g) (m-p, tinción con H-Er; (m'-p', tinción con AT). Las flechas indican la extensión aproximada del defecto osteocondral. CA: Cartilago articular; TC: Tejido conjuntivo; NC: Neocartilago; DO: Defecto osteocondral; HS: Hueso subcondral; Sc: Scaffold (soporte); s, semanas. Barra de escala = 1,5 mm.

Los scaffolds conteniendo FC mostraron infiltración por MSC presentes en la médula ósea, y contenido hemático, pudiendo observarse vasos sanguíneos de pequeño calibre entre las microesferas de PLGA (Fig. 4.16 a). A las 2 semanas p-i, se observó en algunos animales, la presencia de la capa intacta de SPU en el lugar del defecto (Fig. 4.16 b). Fragmentos de la capa condral de SPU se observaron a lo largo de todo el periodo experimental en la mayoría de los animales. Los fragmentos se localizaron en el hueso esponjoso subyacente a la zona del defecto (Fig. 4.16 c). El tamaño de los fragmentos observados disminuyó progresivamente a lo largo del periodo experimental (Fig. 4.16 d,e). También se observaron de forma aislada células fagocíticas multinucleadas rodeando fragmentos de SPU (Fig. 4.16 f).

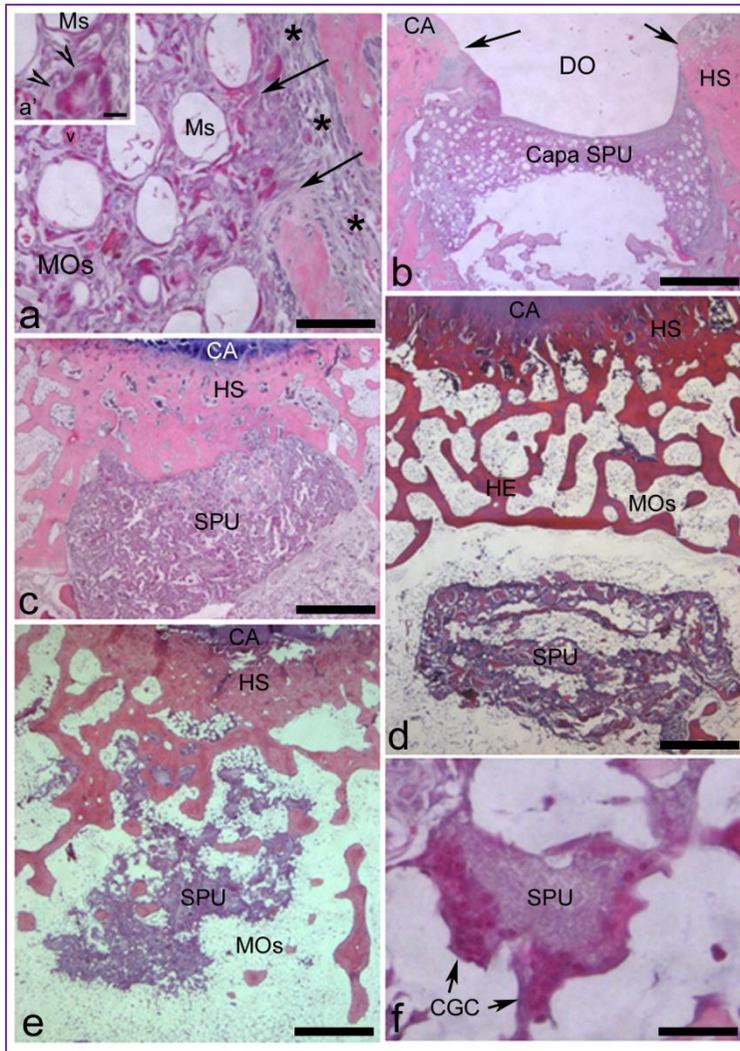


Figura 4.16. Imagen representativa en sección horizontal 2 semanas p-i, mostrando un detalle de la zona de contacto del scaffold de SPU-PLGS con el tejido hospedador (asteriscos). Células de la médula ósea (flechas) y vasos sanguíneos invaden el interior del scaffold, observándose entre las microsferas de PLGA (a); El inserto en la esquina superior izquierda muestra la presencia de MSC (puntas de flecha) en el interior del scaffold entre las microsferas de PLGA (a'). Posición inicial del scaffold en el interior del defecto osteocondral (flechas) (b); desplazamiento del scaffold hacia la zona subcondral en un animal a las 6 semanas p-i (c), donde es progresivamente reabsorbido, aunque continúa siendo evidente a las 12 (d) y 24 (e) semanas p-i. Detalle a gran aumento, que muestra la presencia de dos células multinucleadas (flechas), rodeando un fragmento de SPU. CA: Cartílago articular; HE: Hueso esponjoso; MOs: Médula ósea; Ms: Microesferas; CGC: Células fagocíticas multinucleadas; HS: Hueso subcondral; SPU: poliuretano segmentado; v: vaso sanguíneo. Barras de escala = (a) 25 µm; (a') 12 µm; (b) 1,5 mm; (c-e) 1 mm; (f) 10 µm.

4.3.6 Puntuación histológica

En los grupos C y B tras 2 y 6 semanas p-i. (Fig. 4.17 a) las puntuaciones histológicas entre 0 y 4 indicaron ausencia de reparación osteocondral. Tras 12 y 24 semanas p-i en ambos grupos (C y B) se observaron leves signos de reparación y las puntuaciones medias aumentan manteniéndose en el intervalo entre 4 y 7 (Fig. 4.17 a).

Al final de la 2 semana p-i, los grupos tratados con BMP-2 (5 µg) y TGFβ1 exhibieron claros signos de reparación con puntuaciones entre 8 y 11, sin embargo la puntuación del grupo tratado con BMP-2 dosis de 2,5 µg fue de 6, reflejando un grado de reparación inferior al de los otros dos grupos tratados con FC. Todos los grupos tratados con FC difirieron significativamente ($p<0.001$) de los grupos C y B; el grupo de BMP-2 (2,5 µg) mostró también diferencias significativas ($p<0.05$) con respecto al grupo BMP-2 (5 µg) (Fig. 4.17 a). Aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos BMP-2 (5 µg) y TGF-β1, el grupo BMP-2 (5 µg) obtuvo una puntuación ligeramente superior (9,33) a la del grupo TGF-β1 (8,33), reflejando mejores características histológicas tal y como se había descrito en el apartado anterior. Todos los grupos tratados con FC dieron puntuaciones entre 8,33 y 10 tras 6 semanas p-i y mostraron claras diferencias ($p<0.001$) con los grupos C y B (Fig. 4.17 a). La evaluación a las 12 y 24 semanas p-i dio puntuaciones entre 13,67 y 15,67 (ligeramente inferiores a las 24

semanas p-i) en todos los grupos tratados con FC, mostrando igualmente diferencias significativas ($p < 0.001$) con respecto a los grupos C y B (Fig. 4.17 a).

Los grupos tratados con FC no mostraron diferencias significativas entre sí, salvo la observada a las 2 semanas p-i entre los grupos tratados con BMP-2 (Fig. 4.17 a).

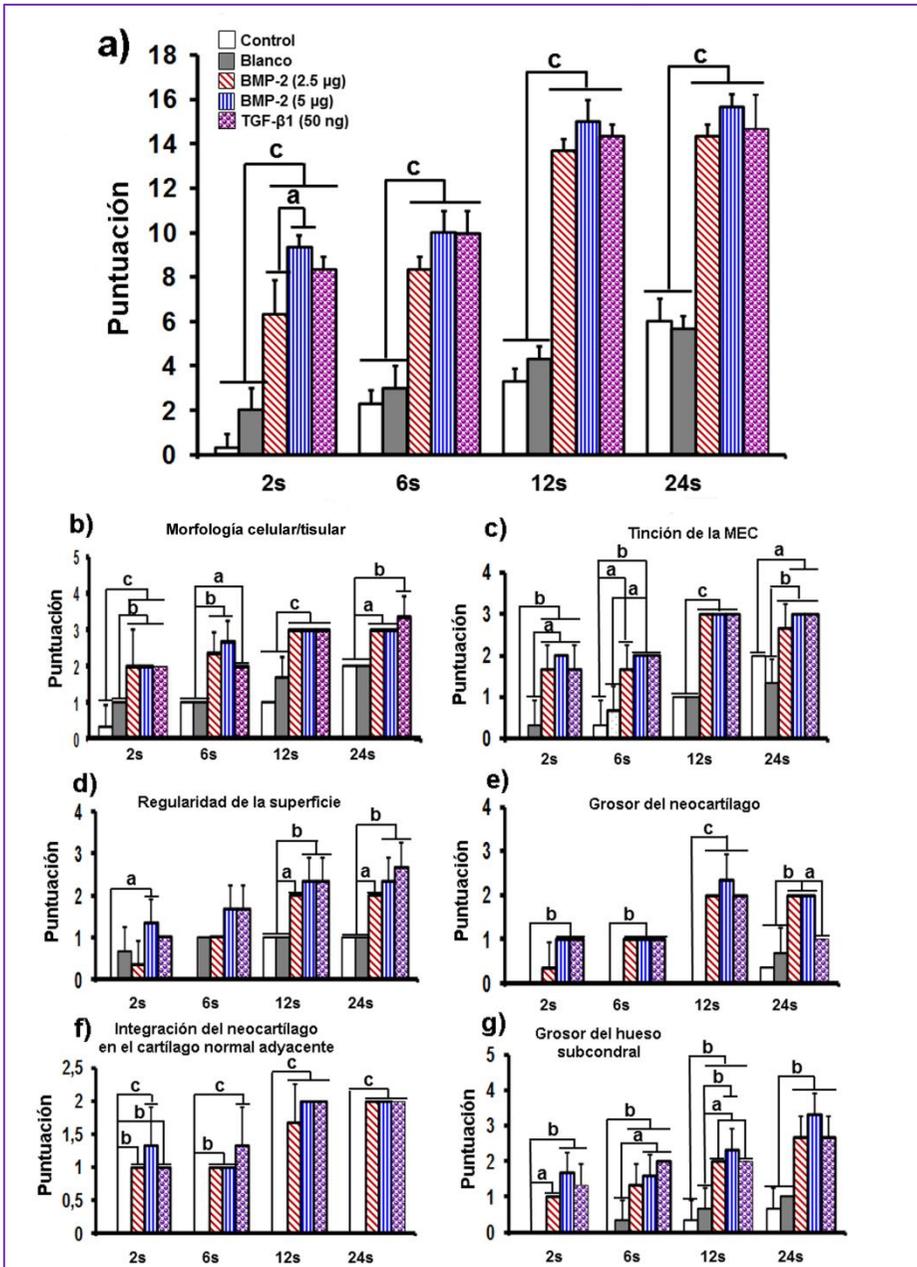


Figura 4.17. Puntuación histológica global del proceso de reparación del defecto osteocondral con el sistema de SPU-PLGA (a). Puntuación histológica de los distintos parámetros osteocondrales evaluados en cada uno de los grupos experimentales (b-g). s: semanas. Los histogramas representan la media \pm DS; ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ y ^c $p < 0.001$.

La puntuación histológica en relación a la morfología celular/tisular y al grado de tinción de la MEC (Fig. 4.17 b,c) se constató estudiando la presencia en la zona del defecto de diferentes proteínas osteogénicas y condrogénicas (Fig. 4.18) , y cuantificando el número de células inmunoreactivas (ir) para cada una de ellas (Fig. 4.19). La cuantificación reveló una disminución progresiva del número de células Col I-ir (fibroblastos) en todos los grupos a lo largo del periodo experimental, con valores altos en los grupos C y B y valores bajos en los grupos tratados con FC (Fig. 4.19 a). Por el contrario, células Col II-ir, agrecano-ir y Col IX-ir (fenotipo condrogénico) aumentaron progresivamente, con valores bajos en los grupos C y B y valores altos en los grupos tratados con FC (Fig. 4.19 b,c,d). A las 6 y 12 semanas p-i, se detectaron diferencias significativas en el número de células Col IX-ir entre los grupos BMP-2 (5 μ g) y TGF- β 1, comparables a las diferencias observadas en el número de células agrecano-ir entre estos grupos a las 2 y 6 semanas p-i. Aunque no se observó ninguna diferencia estadística, el número de células Col II-ir fue ligeramente más elevado en el grupo BMP-2 (5 μ g), que en el grupo TGF- β 1 a lo largo de todo el experimento (Fig. 4.19). Solamente se detectó escaso número de células Col X-ir en todos los grupos a lo largo del ensayo (Fig. 4.19 e), principalmente localizadas en el límite inferior del cartílago articular, concretamente en la zona de cartílago calcificado o hipertrófico, que marca la transición con el hueso

subcondral (Fig. 4.19 e). La inmunoreacción para el Col II, el agrecano y el Col IX se observó en el cartílago reparado en los grupos tratados con FC. Tanto los condrocitos como la MEC presentaron inmunoreacción frente al antisuero anti-Col II y al anticuerpo anti-agrecano (Fig. 4.18). No obstante, solamente los condrocitos exhibieron inmunoreacción frente al antisuero anti-Col IX, no observándose marcaje en la MEC (Fig. 4.18), debido a que el antisuero anti-Col IX reconoce únicamente la forma intracelular del procolágeno IX.

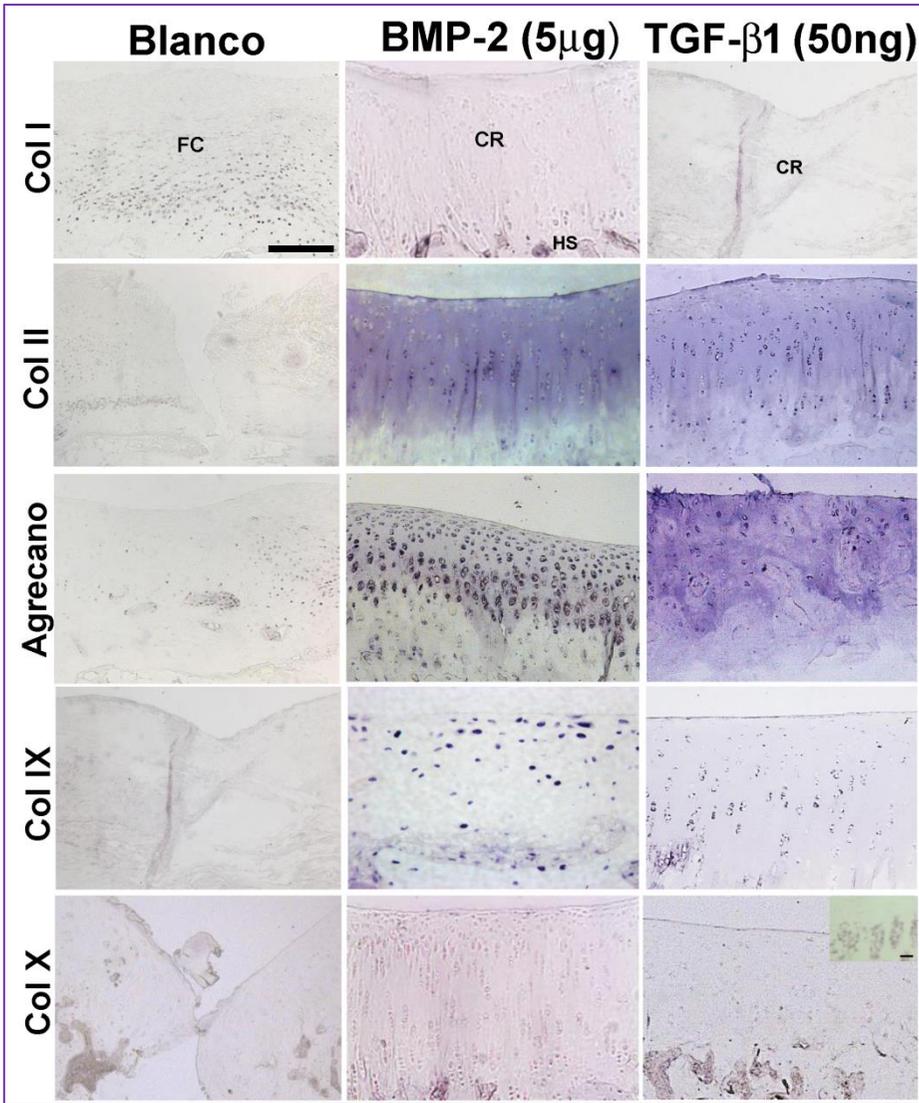


Figura 4.18. Imágenes representativas que muestran la inmunoreacción para el colágeno tipo I, colágeno tipo II, agregcano, colágeno tipo IX y colágeno tipo X en el defecto osteocondral de animales implantados con el sistema de SPU-PLGA de los grupos B, BMP-2 (5 μ g) y TGF- β 1 (50 ng) a las 24 semanas p-i. El inserto en la imagen inferior derecha representa un control positivo para el colágeno tipo X que muestra inmunoreacción en el cartílago de crecimiento, en la zona de osificación endocondral. CR: Cartílago reparado, FC: Fibrocartilago, HS: Hueso subcondral. Barra de escala = 180 μ m. Inserto = 30 μ m.

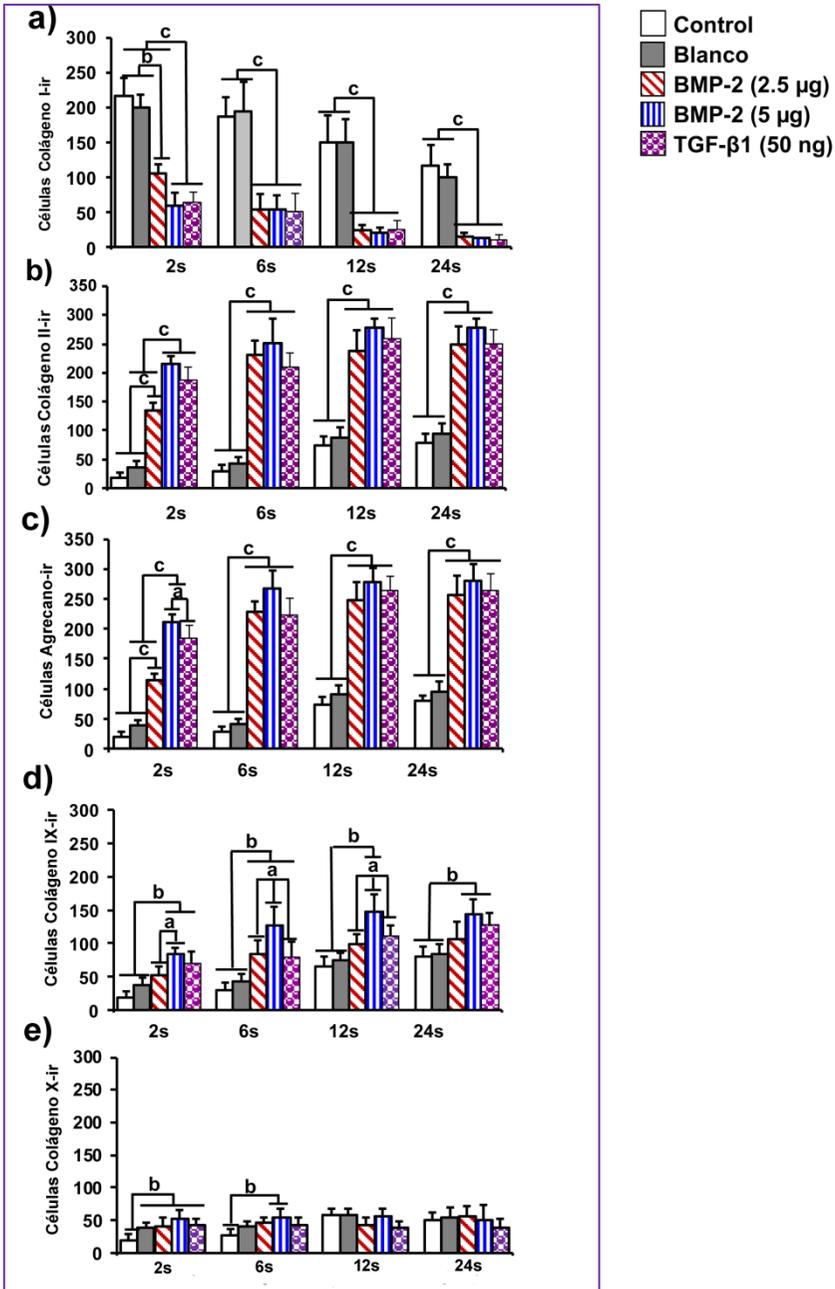


Figura 4.19. Número de células Col I-ir (a), Col II-ir (b), agrecano-ir (c), Col IX-ir (d) y Col X-ir (e) en los diferentes grupos experimentales correspondientes al sistema SPU-PLGA a lo largo del periodo ensayado. Los histogramas representan la media de células inmunoactivas por unidad de área (1000 µm²) ± DS; ^ap<0.05, ^bp<0.01 y ^cp<0.001.

4.4 Scaffold de triple capa ALG-PLGA

4.4.1 Caracterización del sistema

El tamaño y peso del sistema de triple capa ALG-PLGA fue similar al mismo sistema de doble capa. La morfología y estructura interna del scaffold de triple capa se muestra en la figura 4.20.

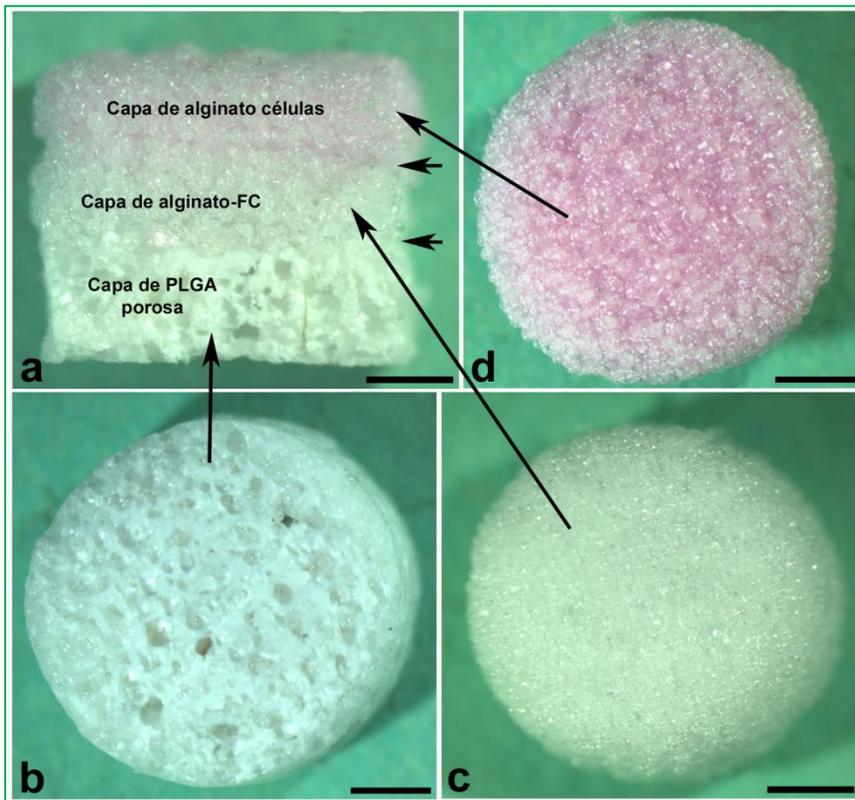


Figura 4.20. Scaffold de tres capas de ALG-PLGA para la reparación de un defecto osteocondral. (a) Sección transversal mostrando las 3 capas. (b) Capa porosa de PLGA dirigida hacia el hueso. (c) Capa de ALG conteniendo microesferas de PLGA con BMP-2. (d) Capa de ALG con microesferas de PLGA dirigida hacia el cartilago conteniendo células (rBC o MSC). Esta última capa ha sido intencionadamente teñida para poder diferenciar las 2 capas de ALG conteniendo microesferas de PLGA. Las flechas en la parte derecha de la figura (a) indican la interface entre las capas. Barra de escala = 1 mm.

4.4.2 Condiciones de cultivo de MSC y condrocitos para ser expandidas en el scaffold

Los primeros ensayos, para optimizar la carga de células en el scaffold y las condiciones de cultivo, revelaron que pocas MSC se adherían y proliferaban sobre la capa de ALG con microesferas de PLGA. La pre-incubación de los scaffolds en FBS puro mejoró la adherencia y proliferación de las MSC. Por el contrario, la proliferación de rbC no aumentó con el pre-tratamiento con FBS que contiene no solo albúmina sérica bovina sino también colágenos solubles, y fibronectina entre otros componentes. No obstante, la estimulación con FGF-2 favoreció significativamente ($p < 0.05$) la expansión de los rbC sobre la superficie de los scaffolds nativos (Fig. 4.21 a). Por lo tanto, los rbC fueron finalmente cultivados bajo suplementación con FGF-2 sobre las capas originales de ALG con microesferas de PLGA, mientras que las MSC fueron sembradas sobre capas de ALG con microesferas de PLGA pre-tratadas con FBS y mantenidas en medio completo sin factor de crecimiento adicional.

Tras los ensayos de viabilidad celular por XTT, realizados a los implantes control en el momento de la implantación, el porcentaje de células presente en los scaffolds fue aproximadamente de un 50% en el caso de las MSC y un 70% para los rbC, en relación al número de células sembradas inicialmente (Fig. 4.21 b). Adicionalmente, se sometieron los scaffolds a un tratamiento con yoduro de propidio (PI)

para la captación espontánea del mismo por parte de las células muertas, y posteriormente se sometieron nuevamente a tinción con yoduro de propidio tras la fijación y permeabilización de los mismos para visualizar las células “vivas” adheridas. Solamente se detectaron de 1 a 2 células muertas por scaffold ($1 \pm 0,8$), mediante microscopía de fluorescencia, al final del 5^o día de cultivo *in vitro*.

La tinción de MSC totales mostró, preferentemente sobre las fibras de ALG, la presencia de células adheridas de morfología redondeada con cromatina condensada, signo indicativo de que se encuentran en proliferación (Fig. 4.21 c). Tanto en el caso de las MSC (Fig. 4.21 c) como en el caso de los rbC (Fig. 4.21 d), se observaron células aisladas y en pequeños grupos. Se observaron células con diferente morfología en los scaffolds cargados con rbC; hay que señalar la presencia de células de morfología fusiforme adheridas a las fibras de ALG (Fig. 4.21 d) que podrían ser condrocitos en proceso de migración.

Por otro lado, las células de morfología esférica observadas en los scaffolds podrían ser condrocitos diferenciados mientras que los diversos agregados de células de morfología esférica podrían ser células en proliferación en un estadio poco diferenciado tipo condroblasto.

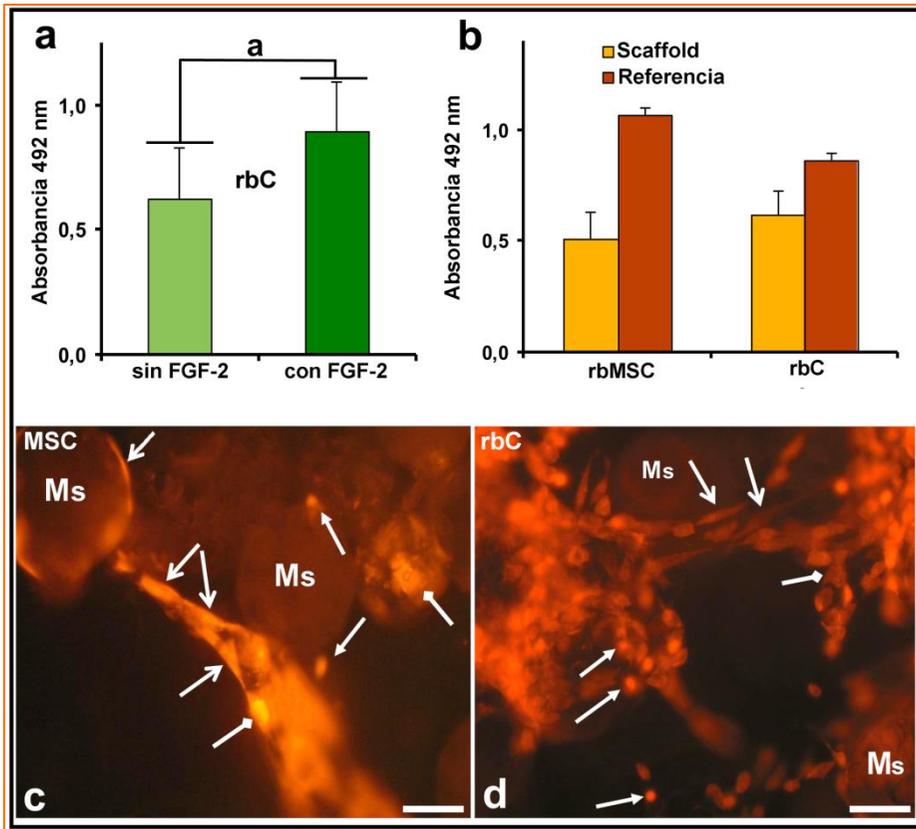


Figura 4.21. Células cultivadas *in vitro* sobre la capa de ALG con microesferas de PLGA, para implantación *in vivo*. (a) Actividad metabólica de rbC viables sobre scaffolds nativos en ausencia versus presencia de FGF-2 (10ng/mL) tras 5 días de cultivo. Ensayo tetrazolio XTT (absorbancia 492 nm). ^a $p < 0.05$, $n = 5$. (b) Actividad metabólica de las células sembradas sobre el scaffold en el momento de la implantación (tras 5 días de cultivo *in vitro*) y sus siembras de referencia 2 horas después de la adhesión a la placa de cultivo. Ensayo XTT tetrazolio, $n = 8$. (c) Microfotografías de fluorescencia de MSC permeabilizadas y teñidas con yoduro de propidio sobre scaffolds pretratados con FBS tras 5 días de cultivo *in vitro* (momento de la implantación). Células adheridas a las fibras de ALG y a las microesferas (Ms) (puntas de flecha abiertas), células de morfologías extendida (aplanada) (puntas de flecha romboides), y células de morfología esférica con cromatina condensada (puntas de flecha cerradas). (d) Microfotografías de fluorescencia de rbC permeabilizadas y teñidas con yoduro de propidio sobre scaffolds nativos tras 5 días de cultivo *in vitro* (momento de la implantación) en medio suplementado con 10 ng/mL de FGF-2. Células de morfología fusiforme (puntas de flecha abiertas), adheridas a las fibras de ALG; células de morfología esférica con cromatina condensada (puntas de flecha cerradas), y células de morfología aplanada (puntas de flecha romboides) adheridas a todas las estructuras del scaffold. Barras de escala: (c) = 20 μm , (d) = 30 μm .

4.4.3 Análisis histológico

Los animales con defectos vacíos (grupo C) y los implantados con scaffolds blancos (libres de células y BMP-2) (grupo B) no presentaron diferencias entre ellos a ninguno de los tiempos analizados (6 y 12 semanas). El análisis histológico no reveló signos de reparación en los grupos C y B. A las 6 semanas p-i los defectos se encuentran rellenos con un tapón de tejido fibroso (Fig. 4.22 b,b',c,c') y a las 12 semanas p-i con una mezcla de tejido conjuntivo y fibrocartilago (Fig. 4.23 a,a',b,b'). La mayoría de los animales exhibieron discontinuidad entre uno o ambos bordes o límites del defecto y el cartilago normal adyacente (Fig. 4.22 b,b',c,c', Fig. 4.23 a,a',b,b'). Un área extensa de hueso subcondral bajo el tejido conjuntivo, se observó en la mayoría de los animales control y blancos (Fig. 4.22 b,b',c,c', Fig. 4.23 a,a',b,b'). Las figuras 4.22 y 4.23 incluyen imágenes de cartilago normal que permiten la comparación con el tejido reparado (Fig. 4.22 a,a' y Fig. 4.23 a,a').

El defecto en los animales conteniendo implantes o scaffolds cargados con BMP-2 (5 µg) difirieron sensiblemente de los grupos C y B tras 6 semanas p-i. Los defectos tratados con BMP-2 mostraron un cartilago parcialmente reparado con características histológicas similares a las del cartilago hialino. Sin embargo, también se observó presencia de cartilago en la región de hueso subcondral y una

superficie irregular del cartílago reparado en la mayoría de los animales (Fig. 4.22 d,d').

La reparación del defecto en animales conteniendo implantes cargados con células (MSC o rbC) y combinación de células con BMP-2 (grupos BMP-MSC y BMP-rbC) difirieron sensiblemente de los grupos C y B pero también del grupo BMP-2 tras 6 semanas p-i. Los cuatro grupos (MSC, rbC, BMP-MSC y BMP-rbC) exhibieron un alto grado de reparación con formación de un tejido con características similares al cartílago normal adyacente. Sin embargo, en este primer punto de análisis, se observó cierta variabilidad en la respuesta. En algunos animales, los bordes o límites del defecto no fueron fácilmente identificables, mientras que en otros el grado de reparación no fue tan bueno (Fig. 4.22 e,e'-4.22 h,h'). Igualmente, la superficie del cartílago articular reparado exhibió en algunos animales pequeñas irregularidades, mientras que en otros, estas fueron más evidentes (Fig. 4.22 d,d'-4.22 g,g'). El grosor del cartílago fue bastante similar al del cartílago normal adyacente. La reparación observada en el hueso subcondral fue completa (Fig. 4.22 d,d'-4.22 h,h'). No se observaron restos del scaffold ni signos de reacción inflamatoria en la zona del defecto en ninguno de los animales.

Tras 12 semanas p-i, la reparación observada en el grupo BMP-2 fue completa y se puso de manifiesto un aumento del grado de reparación con respecto a las 6 semanas p-i (Fig. 4.23 d,d'). El tejido

reparado en los grupos tratados con células o combinaciones de células con BMP-2 (MSC, rbC, BMP-MSC y BMP-rbC) mostró características histológicas similares a las observadas a las 6 semanas p-i (Fig. 4.23 e,e'-4.23 h,h'). No se observaron diferencias entre estos grupos.

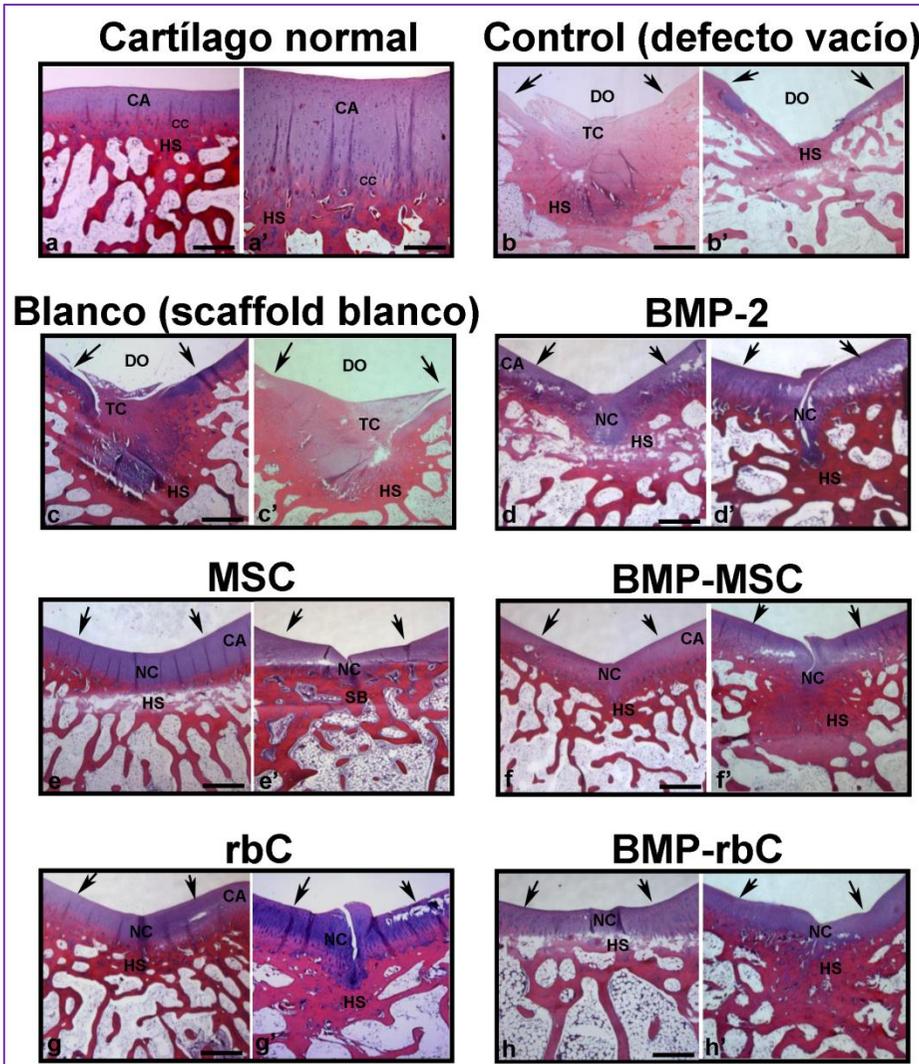


Figura 4.22. Microfotografías del defecto osteocondral a las 6 semanas p-i con el sistema triple capa ALG-PLGA. Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo, teñidas con hematoxilina-eritrosina, mostrando el defecto osteocondral 6 semanas p-i en el mejor (b-h) y el peor (b_i-h_i) espécimen reparado del grupo control (defecto vacío; b, b_i'), el grupo blanco (scaffold blanco; c, c_i'), y en los grupos tratados con BMP-2 (d, d_i'), MSC (e, e_i'), rbC (f, f_i'), BMP-MSC (g, g_i') y BMP-rbC (h, h_i'). Las imágenes a y a' muestran el cartilago articular normal a diferentes aumentos. Las flechas indican la extensión aproximada del defecto. CA: Cartilago articular; TC: Tejido conjuntivo; NC: Neocartilago; DO: Defecto osteocondral; HS: Hueso subcondral. Barras de escala: a, b, b_i'-h, h_i' = 1,3 mm, a' = 150 μ m.

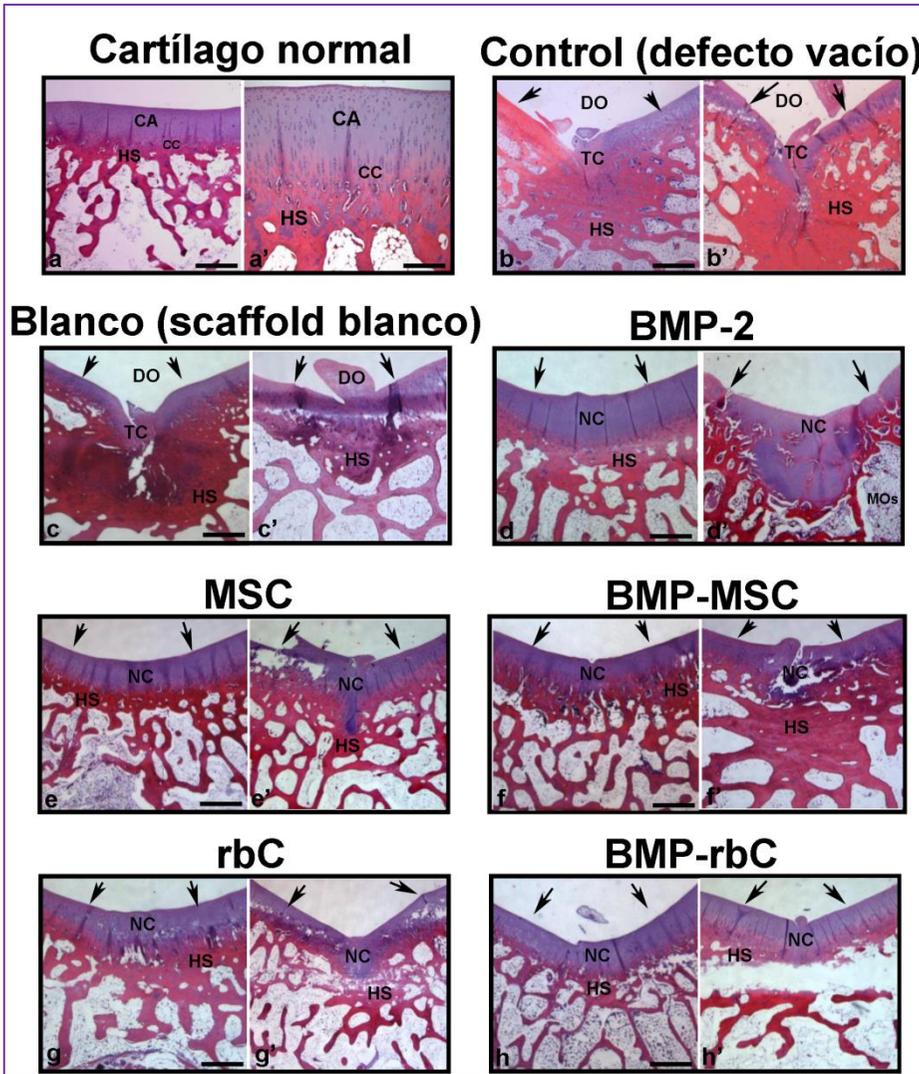


Figura 4.23. Microfotografías del defecto osteocondral a las 12 semanas p-i con el sistema triple capa ALG-PLGA. Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo, teñidas con hematoxilina-eritrosina, mostrando el defecto osteocondral 12 semanas p-i en el mejor (b-h) y el peor (b_i-h_i) espécimen reparado del grupo control (defecto vacío; b, b_i), el grupo blanco (scaffolds solo; c, c_i), y en los grupos tratados con BMP-2 (d, d_i), MSC (e, e_i), rbC (f, f_i), BMP-MSC (g, g_i) y BMP-rbC (h, h_i). Las imágenes a y a_i muestran el cartilago articular normal a diferentes aumentos. Las flechas indican la extensión aproximada del defecto. CA: Cartilago articular; TC: Tejido conjuntivo; NC: Neocartilago; DO: Defecto osteocondral; HS: Hueso subcondral. Barras de escala: a, b, b_i-h, h_i = 1,3 mm, a_i = 150 μ m.

La figura 4.24 muestra, en todos los grupos experimentales, detalles de la zona de integración con el cartílago normal adyacente (Fig. 4.23 a) y de la superficie del tejido reparado (Fig. 4.23 b) tras 6 y 12 semanas p-i.

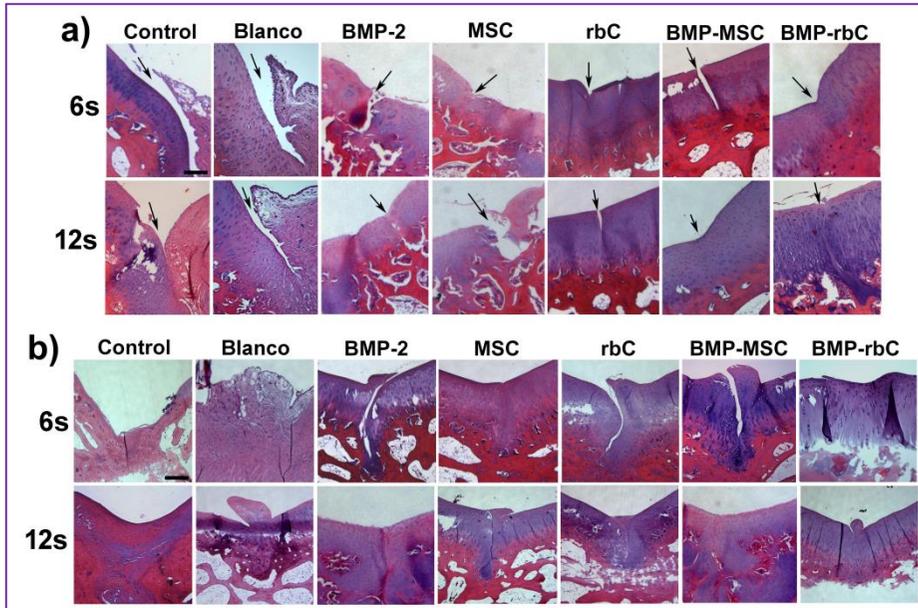


Figura 4.24. Microfotografías de detalle del defecto osteocondral a 6 y 12 semanas p-i con el sistema triple capa ALG-PLGA. Imágenes del defecto osteocondral mostrando (a), uno de los límites del defecto (flecha) y (b) la superficie en la zona central del defecto en todos los grupos experimentales. Barra de escala = 200 μ m.

4.4.4 Puntuación histológica

La puntuación de los resultados histológicos no mostró reparación osteocondral en los grupos C y B, después de 6 y 12 semanas con puntuaciones entre 2,3 y 5 (Fig. 4.25 a-g).

Al final de la sexta semana, los defectos en animales tratados con BMP-2 difirieron significativamente ($p < 0.01$) de los de los grupos C y

B, con una puntuación media de 10,33. También, los grupos MSC, rbC, BMP-MSC y BMP-rbC presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$) con respecto a los grupos C y B con puntuaciones medias entre 13,67 y 16,33. Solamente el grupo tratado con MSC mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo tratado con BMP-2 (Fig. 4.25 a-g).

La puntuación histológica a las 12 semanas p-i mostró valores medios entre 15,33 y 16,67 en todos los grupos tratados (BMP-2, MSC, rbC, BMP-MSC y BMP-rbC) con diferencias significativas ($p < 0.001$) con respecto a los grupos C y B. No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados en este punto de tiempo (Fig. 4.25 a-g).

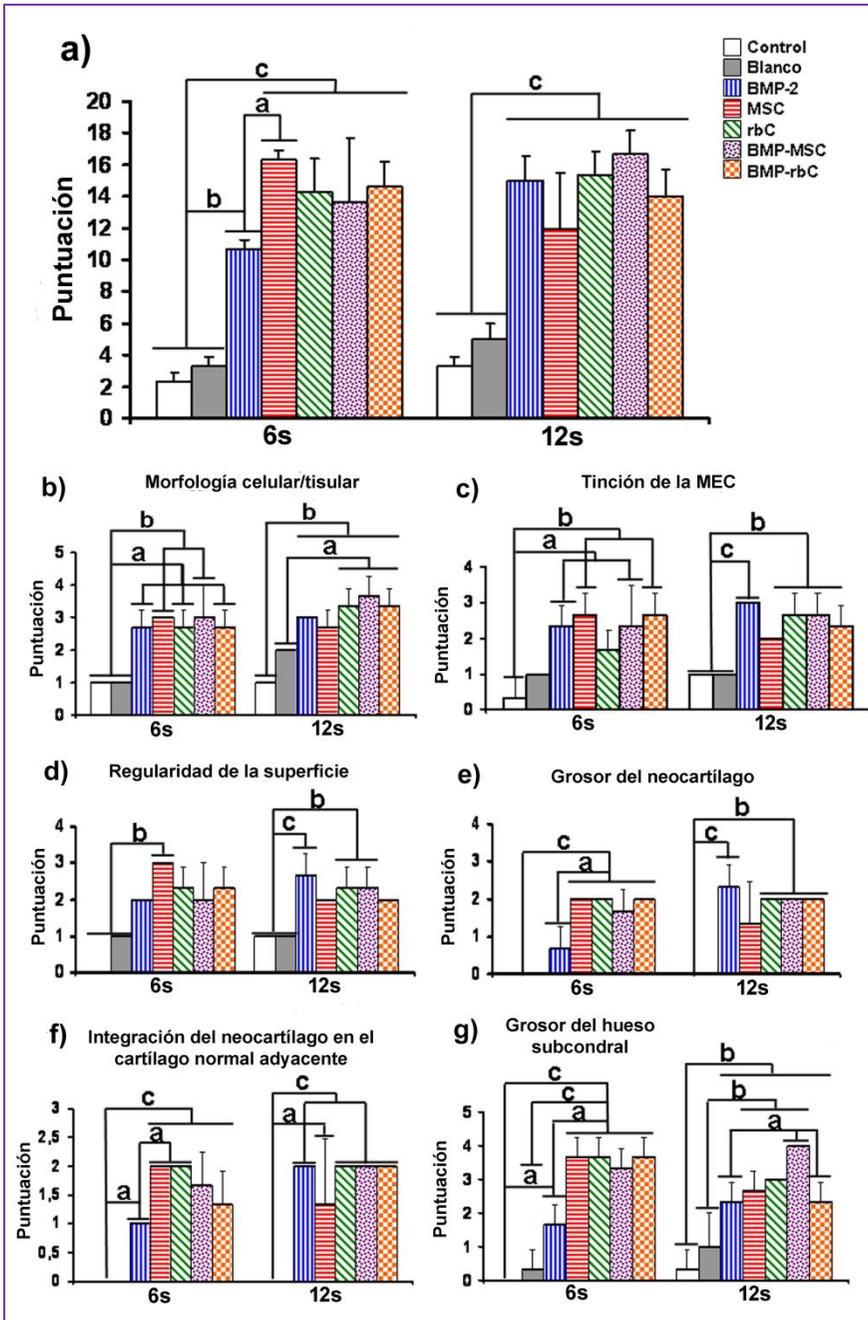


Figura 4.25. Puntuación histológica obtenida con el sistema triple capa ALG-PLGA. Puntuación histológica total del proceso de reparación osteocondral (a). Puntuación histológica de los distintos parámetros osteocondrales evaluados en cada uno de los grupos experimentales (b-g). s: semanas. Los histogramas representan la media \pm DS; ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ y ^c $p < 0.001$.

Los análisis de la morfología celular/tisular y del grado de tinción de la MEC (Fig. 4.25 b,c) se confirmaron estudiando la presencia de diferentes proteínas osteogénicas y condrogénicas en la zona del defecto (Fig. 4.26) y cuantificando el número de células inmunoreactivas para cada una de las mismas (Fig. 4.27). Los resultados revelaron diferencias significativas en el número de células Col I-ir (fenotipo fibroblástico) entre los grupos C y B y los grupos tratados con BMP-2, células o la combinación de ambos elementos tanto a las 6 como a las 12 semanas p-i (Fig. 4.27 a). El análisis de las diferentes proteínas condrogénicas mostró en el caso del colágeno tipo II y el agregcano, diferencias altamente significativas en el número de células inmunoreactivas entre los grupos C y B y los grupos tratados con BMP-2, células o la combinación de ambos elementos tras 6 y 12 semanas p-i (Fig. 4.27 b,c). El número de células Col IX-ir reveló diferencias significativas entre los grupos tratados con BMP-2, células o la combinación de ambos elementos a las 12 semanas p-i (Fig. 4.27 d), mientras que a las 6 semanas p-i, solamente el grupo tratado con MSC (MSC) mostró diferencias significativas con respecto al resto de los grupos salvo el grupo tratado con BMP-2 (Fig. 4.27 d). El número de células Col X-ir fue muy bajo en todos los grupos a lo largo del periodo experimental, no observándose entre ellos diferencias significativas (Fig. 4.27 e).

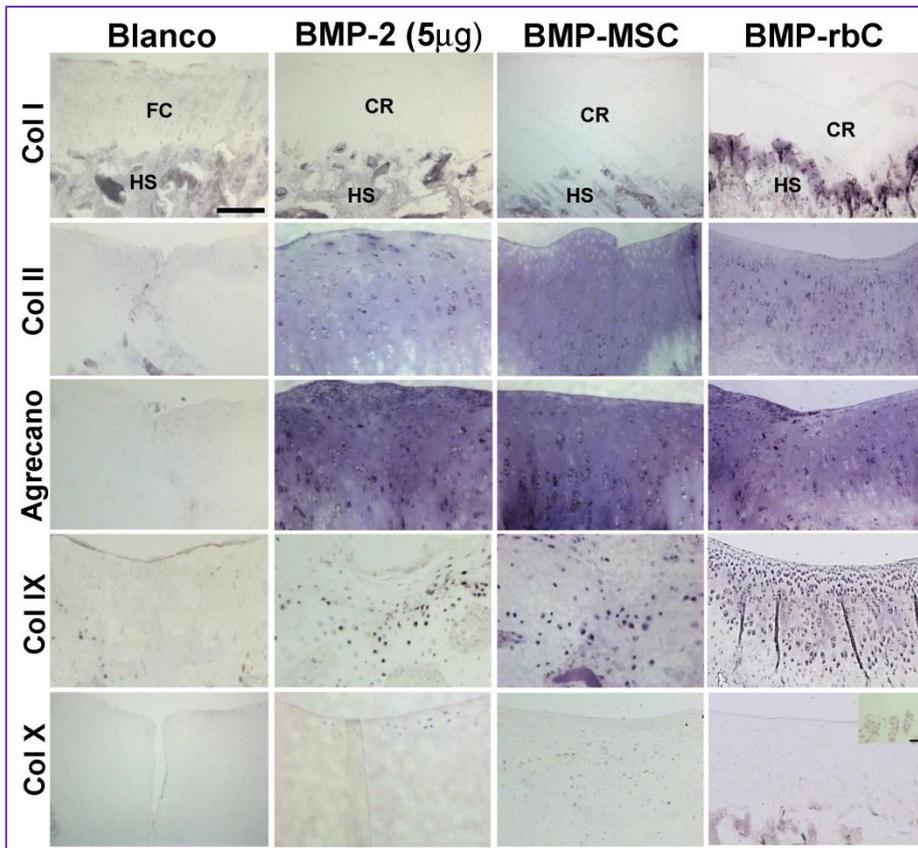


Figura 4.26. Imágenes representativas que muestran la inmunoreacción para el colágeno tipo I, colágeno tipo II, agregano, colágeno tipo IX y colágeno tipo X en el defecto osteocondral de animales implantados con el sistema triple capa ALG-PLGA de los grupos B, BMP-2 (5 μ g) y TGF- β 1 (50ng) a las 12 semanas p-i. El inserto en la imagen inferior derecha representa un control positivo para el colágeno tipo X que muestra inmunoreacción en el cartilago de crecimiento, en la zona de osificación endocondral. CR: Cartilago reparado, FC: Fibrocartilago, HS: Hueso subcondral. Barra de escala = 180 μ m. Inserto = 30 μ m.

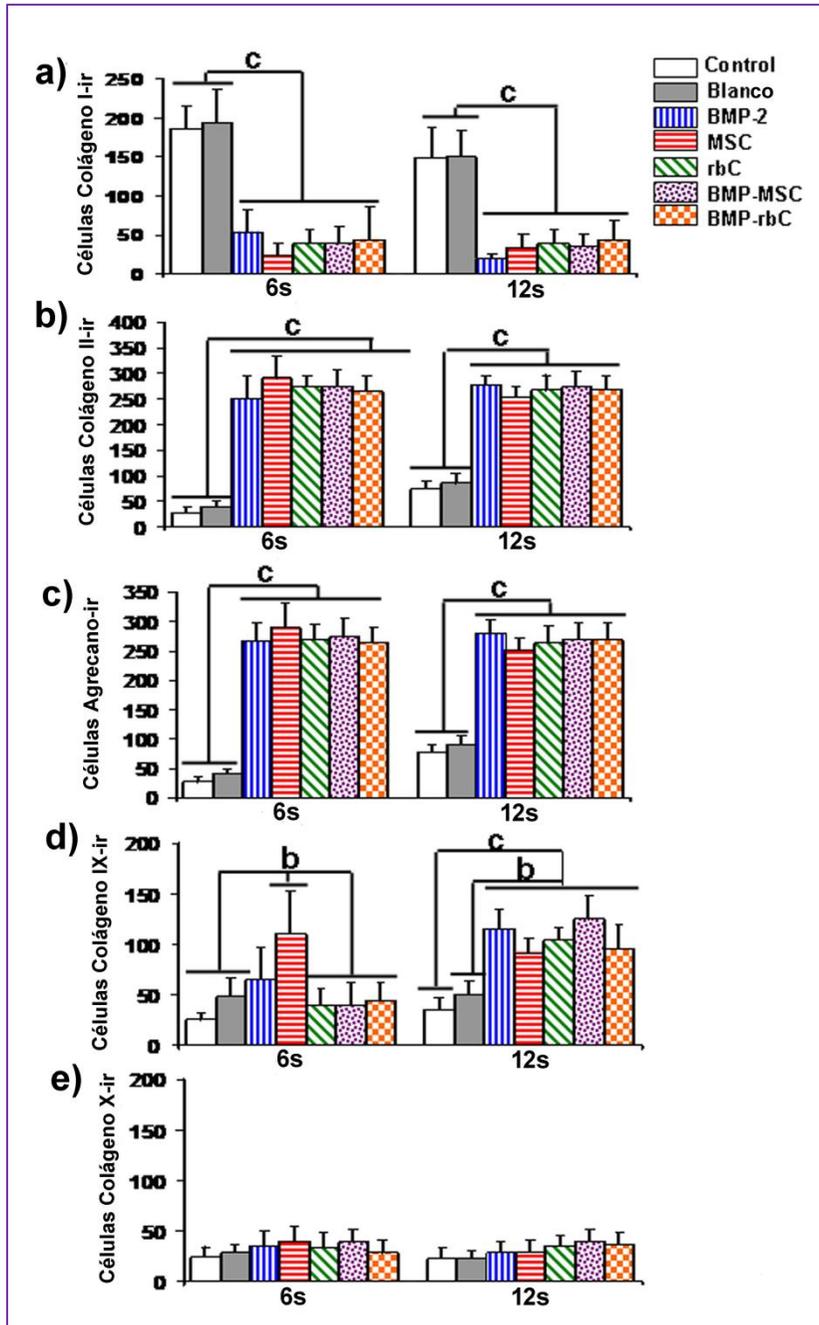


Figura 4.27. Número de células Col I-ir (a), Col II-ir (b), agrecano-ir (c), Col IX-ir (d) y Col X-ir (e) en los diferentes grupos correspondientes al sistema triple capa ALG-PLGA a lo largo de todo el periodo experimental. Los histogramas representan la media de células inmunoreactivas por unidad de área ($1000 \mu\text{m}^2$) \pm DS; ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ y ^c $p < 0.001$.

Discusión

5. Discusión

5.1 Sistemas de doble capa conteniendo BMP-2 y TGF- β 1

En este estudio, investigamos el efecto de una dosis de TGF- β 1 (50 ng) y dos dosis de BMP-2 (2,5 y 5 μ g), formuladas en microesferas de PLGA e incluidas en dos sistemas de doble capa, sobre el proceso de reparación de un defecto osteocondral crítico en un modelo experimental de conejo. Dicho modelo es uno de los más aceptados para la evaluación del efecto de implantes conteniendo FC o células en defectos de cartílago (Sellers et al., 1997, 2000; Rudert, 2002, 2005; Shao et al., 2006; Holland et al., 2005, 2007; Qi et al., 2009, 2011; Im y Lee, 2010; Jiang et al., 2010; Tokuhara et al., 2010; Wang et al., 2010; Chen et al., 2011; Yang et al., 2011; Qi et al., 2012; Zhang et al., 2013). Los sistemas utilizados para este abordaje terapéutico, que comparten la misma capa subcondral de PLGA y se diferencian en la capa condral que puede ser de alginato, ALG-PLGA, o formada por un poliuretano segmentado, SPU-PLGA, resultaron ser biocompatibles, bien tolerados y en ambos casos produjeron un alto grado de reparación.

Desde el punto de vista tecnológico, el scaffold de doble capa de SPU-PLGA, presenta algunas ventajas sobre el scaffold de ALG-PLGA. En primer lugar, la maleabilidad del SPU simplificó el proceso de elaboración de la capa condral ya que las microesferas de PLGA se mezclaron en seco, directamente con el polímero. Por el contrario,

en el caso del alginato se requirió un proceso previo de entrecruzamiento del polímero con cloruro cálcico, con los subsiguientes lavados y procesos de liofilización, lo que hace el procedimiento más largo y con un cierto riesgo de pérdida de proteína. Sin embargo, de acuerdo con los resultados observados, los procesos de elaboración de ambos sistemas no supusieron pérdida detectable de actividad de BMP-2 ni de TGF- β 1 en los cultivos estudiados.

Otro aspecto importante a valorar en un scaffold destinado a regenerar cualquier tejido es su capacidad para adaptarse a la forma del defecto. En este sentido, a priori podríamos sospechar que el SPU por sus características, se adaptaría mejor que el alginato. Sin embargo, la elevada capacidad de captación de agua e hinchamiento del alginato, facilita que se adapte igual de bien que el SPU a la zona condral del defecto, manteniendo un buen contacto físico con el tejido circundante y favoreciendo de esta manera el proceso de reparación.

En los defectos osteocondrales, es importante tener en cuenta la gran riqueza de sustancias o moléculas bioactivas que puede aportar la médula del hueso subcondral. El sangrado producido consecuencia del daño óseo es una fuente de biomoléculas activas, como por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (véase figura 4.5), que es esencial durante la fase inicial en cualquier proceso de reparación tisular, debido fundamentalmente a su potente capacidad quimiotáctica sobre determinados tipos celulares

implicados en el proceso inflamatorio y en la reparación de tejidos. De esta manera, es probable que las moléculas derivadas del coágulo y atrapadas en el interior del scaffold, puedan atraer células madre mesenquimales (MSC) que se infiltran en la región del cartílago lesionada y contribuyen a la reparación del defecto. Por tanto, es importante resaltar el papel que juega la capa porosa de PLGA, sirviendo de puente entre la zona medular y la lesión condral, favoreciendo la vascularización de la zona subcondral, permitiendo la regeneración de la placa ósea (Hernández et al., 2011) y, en definitiva, contribuyendo a la reparación osteocondral. De hecho, la importancia de estos compuestos, presentes en la sangre, en la reparación e integración del cartílago hialino regenerado, asociado con un hueso subcondral poroso y bien vascularizado, ha sido puesta de manifiesto por algunos autores utilizando diferentes sistemas (Hoemann et al., 2007; Chevrier et al., 2007, 2011; Marchand et al., 2009). Es precisamente en la capacidad de retención de estas sustancias dónde se observan las diferencias entre los dos componentes de la capa condral de los sistemas elaborados en este estudio. La gran captación de agua del alginato favorece su absorción y retención, por parte del sistema de ALG-PLGA. Por el contrario, el SPU-PLGA, puesto que el SPU es un polímero más hidrofóbico, no resultó tan eficiente en cuanto a la captación y retención del coágulo producido al lesionar el hueso subcondral.

Sin quitarle importancia al papel de los scaffolds como soporte de células, así como de sustancias bioactivas endógenas para la formación del cartílago hialino, no nos podemos olvidar de su papel en el control de la cinética de liberación de los factores de crecimiento.

Los pocos estudios publicados que describen el proceso de reparación de cartílago basados en la cesión controlada de factores de crecimiento, relacionan sus datos, en todos los casos, con cinéticas de cesión determinadas *in vitro* o determinadas *in vivo* pero en una ubicación anatómica diferente (Holland et al., 2005, 2007; Na et al., 2007; Im y Lee, 2010; Guo et al., 2010; Jiang et al., 2010; Bian et al., 2011). Por el contrario, el método no invasivo utilizado en este trabajo permitió un seguimiento de los perfiles de liberación de los factores de crecimiento *in vivo* e *in situ*. Tanto en el caso del scaffold de ALG-PLGA como con el SPU-PLGA, la pendiente de la correlación lineal *in vivo-in vitro* fue superior a 1, indicando una velocidad de cesión *in vivo* sustancialmente mayor que *in vitro*, para ambas proteínas. De hecho, *in vitro* se observó una acusada disminución de la velocidad de cesión de ambos factores de crecimiento aproximadamente a partir del día 10. *In vivo* se produce una liberación completa de ambos factores en un periodo de 6 semanas, por el contrario, los datos *in vitro* predijeron que aproximadamente el 45% de la BMP-2 y el 60% del TGF- β 1 aún permanecían en los scaffolds a ese tiempo. Por lo tanto, los resultados *in vitro* no relejan los perfiles de liberación en el defecto osteocondral,

pudiendo llevar a predicciones erróneas, lo que pone en evidencia la necesidad de los estudios de liberación *in vivo*. En el caso del scaffold de SPU, la monitorización *in vivo*, mostró un control extremadamente eficiente de la cesión de ambos factores de crecimiento, BMP-2 y TGF- β 1, proporcionando una tasa de liberación constante y completa de los mismos en un periodo de 6 semanas.

Los análisis histológicos mostraron, con ambos sistemas, reparación tisular en periodos cortos de tiempo aunque la respuesta de la dosis baja de BMP-2 fue inferior a la obtenida con la dosis de 5 μ g o con TGF- β 1 (50 ng). De hecho, a pesar de que al final del experimento el nivel de reparación observado fue similar en todos los grupos tratados, la respuesta con la dosis baja fue siempre ligeramente inferior. Si analizamos los resultados detalladamente, podemos observar que la respuesta de la dosis baja en el sistema ALG-PLGA fue siempre más débil y evolucionó más lentamente que la misma dosis desde SPU-PLGA. De hecho, la puntuación histológica total obtenida tras 2 semanas p-i en este grupo experimental con el scaffold de ALG-PLGA fue de 2,67 similar a la del scaffold blanco (2), mientras que en el caso del scaffold de SPU la puntuación fue de más del doble (6,33), obteniéndose un grado de reparación considerable. La explicación más probable es que la rápida liberación de la BMP-2 desde el sistema de ALG-PLGA no permite que las células puedan aprovechar la cantidad de BMP-2 disponible. El sistema se va

"vaciando" y la concentración que se alcance puede que sea insuficiente para regenerar al mismo nivel que en los otros grupos pero, suficiente para iniciar el proceso de reparación que, posteriormente, con una liberación más lenta y sostenida, durante un periodo prolongado, de pequeñas cantidades de factor de crecimiento biológicamente activo en la matriz extracelular y el tejido circundante en formación, produce igualmente una buena reparación. De acuerdo con los resultados, durante las primeras 6 semanas, que es el periodo durante el cual se está liberado el FC la velocidad de reparación es lenta. Los resultados en términos de reparación osteocondral indican que la cantidad de factor de crecimiento disponible inicialmente podría ser esencial para actuar de forma complementaria con todo el material biológico presente en el corto periodo de tiempo después de producirse la lesión. Podría considerarse que los FC realizan un trabajo de estimulación tanto de las MSC procedentes de la médula como de los condrocitos de los bordes del defecto, incluyendo la activación de redes de señalización necesarias para iniciar el proceso de reparación. Una vez superada esta primera etapa, a partir de la 6ª semana, todos los grupos evolucionaron con los recursos propios, puesto que no habría más FC disponible. En efecto, los marcadores de reparación se incrementan significativamente entre la 6ª y 12ª semana. A las 12 semanas p-i se observó un cartílago histológicamente similar al cartílago hialino, con una superficie regular

y un alto grado de integración en el cartílago normal adyacente, independientemente del factor de crecimiento y la dosis de BMP-2. El periodo de las 12 semanas finales lo podemos considerar como una etapa de consolidación, lo que indicaría una reparación estable del cartílago.

En resumen, aunque el tejido reparado mostró características histológicas típicas del tejido conjuntivo al inicio del periodo experimental (2 semanas p-i) al final del periodo experimental (12-24 semanas p-i) el cartílago formado presenta características típicas del cartílago hialino. Además, la presencia de un escaso número de células inmunoreactivas para el colágeno tipo X, colágeno asociado a la hipertrofia del cartílago y a la osificación endocondral, es indicativa de un cartílago reparado estable a las 24 semanas p-i.

Estudios adicionales, diseñados para periodos de evaluación más extensos, podrían ayudar a definir diferencias entre los dos factores de crecimiento y delimitar las dosis eficaces de cada uno de ellos en relación a sus cinéticas de liberación, estando esto último íntimamente relacionado con el sistema de liberación aplicado.

La comparación de nuestros resultados con los publicados por otros autores no es fácil debido al uso de diferentes tipos de defectos y diferentes formas de ensayar o evaluar la cesión de los factores de crecimiento. Podemos citar un estudio llevado a cabo bajo idénticas condiciones y con la misma dosis de BMP-2 (5 µg) en una esponja de

colágeno (Sellers et al., 1997, 2000). La diferencia fundamental es que en el presente estudio, el efecto reparador se produce a tiempos más cortos. No obstante, estos autores observan la presencia de cartílago regenerado y estable tras un periodo de 1 año.

Otros estudios comparables aplican una dosis alta de BMP-2 (20 µg) en un sistema poroso compuesto de hidroxiapatita y un polímero sintético biodegradable (poli-D,L-ácido láctico/polietilen glicol) (Tamai et al., 2005), o describen una respuesta reparadora deficiente con dosis de TGF-β1 entre 200 y 600 ng, pre-encapsulado en microesferas de gelatina incluidas en un implante de hidrogel (Holland et al., 2007; Guo et al., 2010). No obstante, la liberación de los factores de crecimiento en estos estudios, o no se monitorizó *in vivo* (Tamai et al., 2005; Park et al., 2009; Im y Lee, 2010; Bian et al., 2011), o se llevó a cabo en una localización diferente al lugar del defecto (Holland et al., 2005, 2007; Guo et al., 2010). Por el contrario, los sistemas de liberación estudiados aquí, cargados con cantidades bajas de TGF-β1 y BMP-2, proporcionan una liberación bien controlada de los mismos, especialmente el sistema de SPU-PLGA, que da lugar a una reparación osteocondral rápida y de buena calidad.

Aunque las propiedades mecánicas del cartílago reparado no se determinaron en este estudio, las características cito-histológicas y la estructura tisular son indicativas de un cartílago funcional como ha sido sugerido por Qi et al., (2009, 2012), quienes han puesto de

manifiesto una buena correlación entre características histológicas y propiedades mecánicas para el cartílago reparado.

En cuanto a la degradación de los sistemas implantados, hay que señalar la gran diferencia existente entre los dos polímeros empleados. En el caso del implante de ALG-PLGA, se detectaron fragmentos del mismo, en algún caso con una estructura bien conservada (véase figuras 4.6 y 4.7) en diversos animales tras 2-6 semanas p-i. A las 12 semanas p-i no se observó traza alguna de polímero en ninguno de los animales. Sin embargo, en el caso del sistema de SPU-PLGA, se detectó el implante íntegro tras 2 semanas p-i y casi íntegro tras 6 y 12 semanas p-i, siendo visibles, al final del periodo experimental (24 semanas p-i) restos de la capa condral (SPU), rodeados por células multinucleadas derivadas del sistema mononuclear-fagocítico (véase figura 4.16).

En conclusión, este estudio presenta buenos resultados en reparación osteocondral en periodos de tiempo muy cortos, usando dos sistemas de cesión controlada, uno de ALG-PLGA y otro de SPU-PLGA, con dosis bajas de TGF- β 1 y BMP-2. Cualitativamente se produjo un cartílago de mejor calidad, es decir con mejores características histológicas, con ambos sistemas conteniendo la dosis alta de BMP-2 (5 μ g) en un periodo de tan solo 2 semanas, lo que nos hizo seleccionar esta dosis como la adecuada para comparar la eficacia de la terapia con FC frente a la terapia celular con MSC y

condrocitos autólogos en el siguiente experimento. Nuestros resultados muestran la importancia del control de la presentación de los factores de crecimiento a tiempos cortos, reflejado en un mejor resultado con el sistema de SPU-PLGA en comparación con el de ALG-PLGA, y asimismo muestran la importancia del control en la tasa de presentación durante intervalos de tiempo largos.

Teniendo en cuenta las características de cada uno de los sistemas ensayados, podemos concluir que el sistema de SPU-PLGA presenta algunas ventajas sobre el sistema de ALG-PLGA, principalmente un mejor control de la cesión en la fase inicial del ensayo, reflejado en el grado de reparación a las 2 semanas con la dosis baja de BMP-2 (2,5 μ g) así como mejores propiedades tecnológicas, sin embargo presenta un inconveniente con respecto al ALG-PLGA que es su lenta velocidad de degradación. Por este motivo, hemos decidido seleccionar el sistema de ALG-PLGA como sistema para ensayar de forma comparativa el tratamiento de defectos osteocondrales críticos con factores de crecimiento y células, de forma individual y combinada.

5.2 Sistema de triple capa conteniendo células, BMP-2 o combinaciones de ambos

Las estrategias actuales para obtener un cartílago funcional no sólo implican el uso de FC (Sellers et al., 1997, 2000; Cook et al., 2003; Siebert et al., 2006; Tokuhara et al., 2010), también condrocitos

y MSC (Fragonas et al., 2000; Shao et al., 2006) o las combinaciones de células y FC (Guo et al., 2010; Han et al., 2010; Bian et al., 2011). Hasta el momento, no existen evidencias de que el trasplante de MSCs o condrocitos tenga una ventaja selectiva sobre el uso exclusivo de factores de crecimiento; de hecho, la bibliografía revela numerosos estudios con resultados satisfactorios basados exclusivamente en la aplicación de factores de crecimiento (Fortier et al., 2011; Vicent et al., 2004; Loeser et al., 2005; Tuan et al., 2013; Mollon et al., 2013; Carreira et al., 2014; Cugat et al., 2015; Griffin et al., 2016; Zhang et al., 2017). No obstante, una aproximación a la ingeniería de tejidos, basada en la aplicación de células o terapia celular para avanzar en las estrategias de reparación del cartílago articular podría suponer un beneficio sustancial para la salud pública, tanto desde el punto de vista clínico como económico. Las MSC son actualmente investigadas como una alternativa a los condrocitos para la reparación de defectos de cartílago. No obstante, los sistemas empleados en ingeniería de tejidos para cartílago, con ambos tipos celulares, han dado buenos resultados en mayor o menor grado en varios modelos animales (Grässel y Anders, 2012).

Uno de los problemas potenciales de la implantación de células en la práctica clínica para la reparación de cartílago, es el limitado número de células autólogas disponibles. Por un lado, las piezas de cartílago donantes pueden difícilmente satisfacer la alta demanda de

células para la ingeniería de cartílago *in vitro*. Algunos autores han señalado que la siembra sobre biomateriales de bajas densidades de células, de $10\text{-}130 \times 10^6$ células/cm³, produce cartílago con propiedades mecánicas aceptables (Chiang y Jiang, 2009). No obstante, para alcanzar incluso estas densidades, los condrocitos extraídos deben ser expandidos *in vitro* antes de su implantación. Evidentemente, la expansión de células para aplicaciones clínicas debería ser breve en el tiempo y no modificar el fenotipo de las células a trasplantar. Uno de los objetivos de este estudio ha sido verificar si los implantes de ALG-PLGA conteniendo un bajo número de células, MSC o rbC y con un bajo número de pases, podría mejorar el proceso de reparación de cartílago. Para ello, las condiciones de cultivo en 3D fueron optimizadas *in vitro* para cada uno de los tipos celulares.

Los condrocitos derivados del cartílago hialino cambian gradualmente su fenotipo hacia fibroblastos e incrementan su potencial proliferativo cuando se expanden de manera seriada en cultivo en 2D (monocapa). A pesar de la re-diferenciación parcial de los condrocitos cuando se cultivan en un ambiente que previene la adhesión o el anclaje de las células al soporte de cultivo, no llegan a recuperar completamente el fenotipo condrogénico (Martin et al., 1999). En este estudio, los condrocitos se sembraron sobre los implantes después de solo 2 pases previos para su expansión en cultivo 2D. Teniendo en cuenta que Martin et al., (1999) habían

previamente demostrado que los condrocitos mantienen completamente su potencial para re-diferenciarse en respuesta a entornos tridimensionales después de largos periodos de expansión en cultivo 2D en presencia de FGF-2 los condrocitos fueron cultivados con suplemento de FGF-2. En efecto, los fenotipos celulares observados tras el cultivo confirmaron la presencia de células en proliferación y en migración sobre las distintas estructuras del implante (microesferas de PLGA y fibras de alginato) (véase figura 4.21 c,d). Por otro lado, la adición de FGF-2 aumenta la proliferación de las MSC y favorece su potencial condrogénico (Varas et al., 2007). Sin embargo, este proceso va acompañado por la regulación al alza de COL10A1, gen que codifica la cadena alfa del colágeno tipo X expresado durante la diferenciación hipertrófica y, de COL2A1, en presencia de BMP-2 (Sekiya et al., 2005). Este efecto, según han confirmado otros autores (Freyria y Mallein-Gerin, 2012), no se observa en condrocitos procedentes de cartílago articular humano en cultivos 2D y 3D. Estos resultados sugieren mecanismos de regulación diferentes para estos dos genes en MSC y condrocitos, lo que nos llevó a no estimular con FGF-2 a las MSC *in vitro*. Por ello, las MSC fueron cultivadas sobre implantes pre-tratados con FBS que favorecen la adhesión y la proliferación sin modificar su expresión génica.

Con respecto a la eficacia de los tratamientos propuestos, rbC y MSC y sus combinaciones con BMP-2 (dosis 5µg), los resultados muestran una respuesta más rápida (6 semanas p-i) en los grupos sometidos a terapia celular, comparadas con el tratamiento con BMP-2 sola. También hay que resaltar que el efecto de la BMP-2 se ve potenciado al combinarse tanto con MSC como con rbC. Además, la puntuación del grupo tratado con BMP-2 sola (5 µg) es muy similar a la obtenida con los sistemas de doble capa de ALG-PLGA y SPU-PLGA. No obstante, tras 12 semanas p-i, todas las modalidades de tratamiento mostraron resultados similares, y la sinergia observada con las combinaciones de células y BMP-2 desaparece. Los análisis histológicos de las muestras tratadas con terapia celular (MSC o rbC) revelaron la presencia de tejido con características de cartílago a las 6 semanas p-i, el cual mantuvo su estructura al menos hasta las 12 semanas p-i. En conjunto, este estudio no reveló ninguna ventaja de un tipo celular sobre el otro ni en las puntuaciones de los distintos parámetros histológicos ni en otros aspectos no evaluables en el sistema de puntuación, como fue el análisis de marcadores característicos de fenotipo condrogénico. No obstante, hubo una disminución en la puntuación del grupo MSC, la cual no fue estadísticamente significativa y tampoco tuvo relevancia desde el punto de vista biológico. Asumimos que esta disminución no es representativa, ya que 2 de 3 animales en este grupo tuvieron una

puntuación total de 14, sin embargo el tercer animal no respondió al tratamiento, probablemente debido a variabilidad en la respuesta individual.

Un número mayor de animales por grupo podría haber disipado las dudas en relación a la eficacia del tratamiento. Sin embargo, muchos estudios publicados (Yan y Yu, 2007; Dashtdar et al., 2011) demuestran que un mínimo de 3 animales por grupo, no solo es más justificable desde el punto de vista ético que grupos más numerosos, sino también completamente válido y exhibe un grado de variabilidad estadística aceptable.

Contrariamente, a los resultados expuestos en este trabajo, Guo et al., (2010) no observaron ningún efecto sobre la reparación de un defecto osteocondral en conejos, usando MSC solas o en combinación con factores de crecimiento inductores de condrogénesis, tales como TGF β 1, tras 12 semanas p-i. Dashtdar et al., (2011) observaron un grado de reparación equivalente al observado en este estudio y formación de cartílago hialino con MSC encapsuladas en alginato, y condrocitos diferenciados a partir de MSC, tras 12 semanas p-i que se mantuvo invariable tras 24 semanas p-i. Li et al., (2009) compararon MSC xenogénicas y condrocitos alogénicos, sembrados en scaffolds de fibrina-poliuretano, en un defecto crítico de cartílago, pero no osteocondral, en cerdo. Los resultados indicaron una reparación prácticamente completa, mientras

que los implantes conteniendo condrocitos produjeron mayoritariamente fibrocartílago. Esta diferencia de respuesta tras la implantación de condrocitos, con respecto a nuestro estudio, podría ser precisamente debida al uso de un defecto que no alcanza la médula ósea.

Las primeras aproximaciones en ingeniería de tejidos en cartílago con respecto al papel de los FC sobre la diferenciación celular se remontan a hace aproximadamente una década. Así podemos citar el uso de TGF- β 1 en cultivo de pellets de MSC o en concentrados de médula ósea (Yang et al., 2006). Aunque el TGF- β 1 regula positivamente la expresión de algunas proteínas del cartílago, la presencia de TGF- β 1 *in vitro* se ha relacionado con diferenciación hipertrófica de condrocitos (Narcisi et al., 2012). En cuanto a la exposición prolongada a BMP-2 mediante transferencia génica, no se han referido signos de maduración hipertrófica o inducción osteogénica, pero si diferenciación condrogénica de MSC humanas (Freyria y Mallein-Gerin, 2012).

Otros autores observaron que la exposición prolongada a BMP-2 de condrocitos humanos cultivados en 2D, impedía la desdiferenciación de los mismos, ayudando a mantener el fenotipo condrogénico *in vitro* durante más tiempo (Claus et al., 2010).

Por último, Jeong et al., (2012) sugieren que la BMP-2 no promueve la hipertrofia del cartílago ni la osificación endocondral en la

misma medida que promueve la formación de cartílago. Este mismo grupo pre-trató condrocitos primarios, sembrados sobre scaffolds, con BMP-2 durante 6 semanas para implantarlos en tejido subcutáneo. Los autores sugieren que la disponibilidad continua de BMP-2, conduce inicialmente a la producción de matriz de cartílago que posteriormente desemboca en un intenso proceso de osificación endocondral. Los resultados presentados en el presente estudio descartan esta hipótesis. Además, estos autores y otros grupos proponen que la BMP-2 y el TGF- β 1 podrían actuar de forma sinérgica para promover la condrogénesis ya que la BMP-2 promueve la diferenciación hacia condrocitos, mientras que el TGF- β 1 modula la maduración de los condrocitos y promueve las últimas etapas de la diferenciación iniciadas por la BMP-2. Nosotros sugerimos que la mezcla de FC e interleucinas presentes en el defecto osteocondral interviene de manera decisiva en el proceso de diferenciación de las células implantadas. Un estudio realizado por Chen et al., (2005) apoya esta hipótesis. Los autores co-cultivaron MSC adultas en presencia de fluido sinovial o de células y las implantaron sobre scaffolds de PLGA en cavidades articulares en oveja. Estos autores detectaron la expresión de marcadores condrogénicos en los sistemas de co-cultivo después de solo 1 o 2 semanas, colágeno II y proteoglicanos sulfatados, pero no de osteocalcina después de 4 y 8 semanas.

En este estudio, el cartílago reparado, inducido por la implantación de cualquiera de los tipos celulares (MSC o rbC) así como la liberación sostenida de BMP-2 sola, mostró inmunoreacción para las proteínas colágeno tipo II, agregcano y colágeno tipo IX, características de la diferenciación condrogénica, tras 12 semanas p-i. La expresión de estas moléculas durante el proceso de reparación del defecto osteocondral, refuerza los resultados histológicos; particularmente, la expresión de colágeno tipo IX, esencial para la adecuada formación y maduración del cartílago como se ha demostrado mediante la generación de ratones knock-out para esta proteína (Opolka et al., 2007). Igualmente, el colágeno tipo II y el agregcano indican de manera directa la presencia de cartílago en la zona del defecto. Por otro lado, estudios recientes, apoyan una correlación entre el incremento de la tasa de degradación de ambas moléculas, especialmente colágeno tipo II, con desordenes degenerativos del cartílago articular como la osteoartritis (Dejica et al., 2008, 2012). Además, las proteínas colágeno tipo X y colágeno tipo I fueron prácticamente indetectables, indicando también de manera indirecta la presencia de cartílago estable en la zona del defecto.

La ausencia completa de un efecto aditivo o sinérgico de la combinación de BMP-2 con cualquiera de los tipos celulares indica que ambos tratamientos son válidos para la reparación de defectos de cartílago. En este sentido, la terapia celular ha mostrado mayor

eficacia que la terapia con BMP-2 tras 6 semanas de implantación, pero el efecto de ambos tratamientos se equiparó tras 12 semanas de implantación.

El curso temporal en el tratamiento de defectos osteocondrales en humanos no puede predecirse. Aunque parece necesario un mayor periodo de tiempo para lograr un grado óptimo de reparación del cartílago, el tratamiento con BMP-2, es mucho menos complicado y costoso que la preparación de células para implantación cumpliendo los complejos requerimientos legales que conlleva dicho procedimiento. La BMP-2 recombinante humana está aprobada por la FDA y la EMA para el tratamiento de lesiones específicas en hueso, concretamente para el tratamiento de fusión intersomática lumbar de un único nivel y fracturas de tibia en adultos. Aunque los resultados clínicos con BMP-2 en reparación ósea no han sido tan espectaculares como se esperaba, consideramos que con un sistema de liberación controlada de BMP-2 se podrían obtener resultados diferentes. En este estudio se ha demostrado que el sistema elaborado capaz de liberar el FC en 6 semanas, lleva a la formación de cartílago en conejos, que se mantiene estable al menos hasta 24 semanas después de la aplicación del tratamiento.

De cualquier manera la posible traslación de este sistema a la práctica clínica, tanto la terapia celular propuesta o el tratamiento con BMP-2 liberada de forma sostenida requiere de un estudio más

amplio, tanto en cuanto al número de animales como en cuanto al periodo de evaluación. Así mismo, hay que considerar que deben completarse todos los estudios exigidos durante la etapa pre-clínica, fundamentalmente en cuanto a toxicidad a largo plazo. Y, evidentemente realizar el cambio de escala con modelos animales más próximos al humano para evaluar la viabilidad de esta estrategia.

Conclusiones

6. Conclusiones

Las conclusiones extraídas de los resultados de este trabajo han sido las siguientes:

- 1.- Los dos sistemas de doble capa diseñados, ALG-PLGA y SPU-PLGA, mostraron buena biocompatibilidad y adaptabilidad al defecto. La degradación del SPU es excesivamente lenta, encontrándose restos del mismo en la zona subcondral 24 semanas post-implantación. Esto justificó el uso del sistema ALG-PLGA en los ensayos con células.
- 2.- Los perfiles de liberación *in vitro* no reflejan la liberación de los factores de crecimiento en el defecto osteocondral, poniendo de manifiesto la necesidad de realizar el ensayo de liberación *in vivo*.
- 3.- Ambos sistemas mostraron un excelente control de la liberación *in vivo* tanto de la BMP-2 como del TGF- β 1, completándose en 6 semanas sin que fuesen detectados a nivel sistémico.
- 4.- La cinética de liberación de las sustancias activas junto con la capacidad del sistema para retener, en mayor o menor medida, moléculas y células provenientes de la médula ósea subyacente son factores determinantes en la regeneración del defecto osteocondral.
- 5.- Todos los tratamientos ensayados, tanto con factores de crecimiento (BMP-2 y TGF- β 1) como con células mesenquimales (MSC) o condrocitos autólogos (rbC), mostraron alta eficacia en la reparación del defecto osteocondral. A las 12 semanas post-

implantación, todos ellos dan lugar a un cartílago con buenas características histológicas, las cuales se mantienen durante todo el periodo analizado de 24 semanas.

6.- La dosis de 5 µg de BMP-2 induce la formación de un cartílago cualitativamente mejor que el resto de los tratamientos.

7.- Los tratamientos con células y su combinación con 5 µg de BMP-2, no mejoran los resultados. Los sistemas con factores de crecimiento resultaron más fáciles de manejar, más asequibles desde el punto de vista económico, manufacturables y menos variables que los pre-sembrados con células.

7. Bibliografía

- Agrawal CM, Athanasiou KA. 1997, Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants, *J Biomed Mater Res*, **38**: 105-114.
- Agrawal CM, Athanasiou KA, Heckman JD. 1997, Biodegradable PLA-PGA polymers for tissue engineering in orthopaedics, *Mater Sci Forum*, **250**: 115-128.
- Ahmed M, Ramos TA, Damanik F, Quang Le B, Wieringa P, Bennink M, van Blitterswijk C, de Boer J, Moroni L. 2015, A combinatorial approach towards the design of nanofibrous scaffolds for chondrogenesis., *Sci Rep*, **5**: 14804.
- Anfield M. 1983, The chondrocyte---the living element of articular cartilage. In: *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland, 30-41.
- Archer CW, McDowell J, Bayliss MT, Stephens MD, Bentley G. 1990, Phenotypic modulation in sub-populations of human articular chondrocytes *in vitro*, *J Cell Sci*, **97**: 361-371.
- Arkkila PE, Kantola IM, Viikari JS. 1994, Limited joint mobility in type 1 diabetic patients: correlation to other diabetic complications, *J Intern Med*, **236**: 215-223.
- Armstrong CG, Mow VC. 1982, Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age,

degeneration, and water content, *J Bone Joint Surg Am*, **64**: 88-94.

- Athesian GA, Warden WH, Kim JJ, Grelsamer RP, Mow VC. 1997, Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments, *J Biomech*, **30**: 1157-1164.
- Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC. 1991, Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage, *J Orthop Res*, **9**: 330-340.
- Athanasiou KA, Agarwal A, Dzida FJ. 1994, Comparative study of the intrinsic mechanical properties of the human acetabular and femoral head cartilage, *J Orthop Res*, **12**: 340-349.
- Athanasiou KA, Agarwal A, Muffoletto A, Dzida FJ, Constantinides G, Clem M. 1995a, Biomechanical properties of hip cartilage in experimental animal models [published erratum appears in *Clin Orthop* **320**: 283, 1995], *Clin Orthop*, **316**: 254-266.
- Athanasiou KA, Niederauer GG, Schenck Jr RC. 1995b, Biomechanical topography of human ankle cartilage, *Ann Biomed Eng*, **23**: 697-704.
- Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. 1996, Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers, *Biomaterials*, **17**: 93-102.

- Athanasiou KA, Korvick D, Schenck RC. 1997, Biodegradable implants for the treatment of osteochondral defects in a goat model, *Tissue Eng*, **3**: 363-373.
- Athanasiou KA, Liu GT, Lavery LA, Lanctot DR, Schenck RC Jr. 1998, Biomechanical topography of human articular cartilage in the first metatarsophalangeal joint, *Clin Orthop*, **348**: 269-281.
- Athanasiou KA, Thoma BS, Lanctot DR, Shin D, Agrawal CM, LeBaron RG. 1999, Development of the cytodetachment technique to quantify mechanical adhesiveness of the single cell, *Biomaterials*, **20**: 2405-2415.
- Ayad S, Evans H, Weiss JB, Holt L. 1984, Type VI collagen but not type V collagen is present in cartilage [letter], *Coll Relat Res*, **4**: 165-168.
- Aydelotte MB, Kuettner KE. 1988a, Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production, *Connect Tissue Res*, **18**: 205-222.
- Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE. 1988b, Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism, *Connect Tissue Res*, **18**: 223-234.
- Ball MD, Bonzani IC, Bovis MJ, Williams A, Stevens MM. 2011, Human periosteum is a source of cells for orthopaedic tissue

engineering: a pilot study, *Clin Orthop Relat Res*, **469**: 3085-3093.

- Balmain N, Leguellec D, Ekak A, Nars G, Toury R, Schoevaert D. 1995, Zonal variations of types II, IX and XI collagen mRNAs in rat epiphyseal cartilage chondrocytes: quantitative evaluation of in situ hybridization by image analysis of radioautography, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **41**: 197-212.
- Bartlett W, Gooding CR, Carrington RW, Skinner JA, Briggs TW, Bentley G. 2005, Autologous chondrocyte implantation at the knee using a bilayer collagen membrane with bone graft. A preliminary report, *J Bone Joint Surg*, **87B**:330–332.
- Bian L, Stoker AM, Marberry KM, Ateshian GA, Cook JL, Hung CT. 2010, Effects of dexamethasone on the functional properties of cartilage explants during long-term culture. *Am J Sports Med*, **38**: 78-85.
- Bian L, Zhai DY, Tous E, Rai R, Mauck RL, Burdick JA. 2011, Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- β 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo, *Biomaterials*, **32**: 6425-6434.
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. 1990, Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues, *J Histochem Cytochem*, **38**: 1549-1563.

- Bloom & Fawcett: A Textbook of Histology. 1997, Don W Fawcett, Ronald P. Jensch Editors. Hodder Arnold Publication
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. 1994, Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation, *N Engl J Med*, **331**: 889–895.
- Broom ND, Poole CA. 1990, A functional-morphological study of the tidemark region of articular cartilage maintained in a non-viable physiological condition, *J Anat*, **135**: 65-82.
- Brown DC, Vogel KG. 1989, Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen, *Matrix*, **9**: 468-478.
- Buckwalter JA, Hunziker EB, Rosenberg LC, Coutts, R, Adams, M, Eyre, D. 1991, Articular cartilage composition and structure. In: Woo SL, Buckwalter JA, eds: *Injury and Repair of Musculoskeletal Soft Tissues*, 2nd ed. American academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, IL, pp 405-425.
- Buckwalter JA. 1998, Articular cartilage: injuries and potential for healing, *J Orthop Sports Phys Ther*, **28**: 192-202.
- Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. 2005, Articular cartilage and osteoarthritis, *Inst Course Lect*, **54**: 465-480.
- Cake MA, Appleyard RC, Read RA, Smith MM, Murrell GA, Ghosh P. 2005, Ovariectomy alters the structural

and biomechanical properties of ovine femoro-tibial articular cartilage and increases cartilage iNOS. *Osteoarthritis Cartilage*, **13**: 1066-75.

- Caldwell KL, Wang J. 2015, Cell-based articular cartilage repair: the link between development and regeneration, *Osteoarthritis Cartilage*, **23**: 351-362.
- Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Golberg VM. 1997, Principles of cartilage repair and regeneration, *Clin Orthop*, **342**: 254-269.
- Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. 2014, Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications, *Arch Biochem Biophys*, **561**: 64-73.
- Carver SE, Heath CA. 1999, Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure, *Biotechnol Bioeng*, **62**: 166-174.
- Chen J, Wang CH, Lü S, Wu J, Guo X, Duan C, Dong L, Song Y, Zhang J, Jing D, Wu L, Ding J, Li D. 2005, In vivo chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells, *Cell Tissue Res*, **319**: 429–438.
- Chen J, Chen H, Li P, Diao H, Zhu S, Dong L, Wang R, Guo T, Zhao J, Zhang J. 2011, Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone *in vivo* using MSCs induced by

a spatially controlled gene delivery systems in bilayered integrated scaffolds, *Biomaterials*, **32**: 4793-4805.

- Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. 2003, Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*, **85**: 1544-1552.
- Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Buschmann MD. 2007, Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects, *Osteoarthritis Cartilage*, **15**: 316-327.
- Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Buschmann MD. 2011, Temporal and spatial modulation of chondrogenic foci in subchondral microdrill holes by chitosan-glycerol phosphate/blood implants, *Osteoarthritis Cartilage*, **19**: 136-144.
- Chiang H, Jiang CC. 2009, Repair articular cartilage defects: Review and Perspectives, *J Formos Med Assoc*, **108**: 87-101.
- Chu CR, Coutts RD, Yoshioka M, Harwood FL, Monosov AZ, Amiel D. 1995a, Articular cartilage repair using allogenic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): a tissue-engineering study, *J Biomed Mater Res*, **29**: 1147-1154.

- Chu CR, Monosov AZ, Amiel D. 1995b, In situ assessment of cell viability within biodegradable polylactic acid polymer matrices, *Biomaterials*, **16**: 1381-1384.
- Claus S, Aubert-Foucher E, Demoor M, Camuzeaux B, Paumier A, Piperno M, Damour O, Duterque-Coquillaud M, Galéra P, Mallein-Gerin F. 2010, Chronic Exposure of Bone Morphogenetic Protein-2 Favors Chondrogenic Expression in Human Articular Chondrocytes Amplified in Monolayer Cultures, *Journal of Cellular Biochemistry*, **111**: 1642–1651.
- Cook SD, Patron LP, Salkeld SL, Rueger DC. 2003, Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein 1(BMP-7) in dogs, *J Bone Joint Surg Am*, **85-A(Suppl 3)**: 116-123.
- Coutts RD, Sah RL, Amiel D. 1997, Effects of growth factor son cartilage repair, *Instr Course Lect*, **46**: 487-494.
- Cugat R, Cuscó X, Seijas R, Álvarez P, Steinbacher G, Ares O, Wang-Saegusa A, García-Ballebó M. 2015, Biological enhancement of cartilage repair: the role of platelet-rich plasma and other commercially available growth factors, *Arthroscopy*, **31**: 777-783.
- Dashtdar H, Rothan H A, Tay T, Ahmad RE, Ali R, Tay LX, Chong PP, Kamarul TA. 2011, Preliminary Study Comparing the Use of Allogenic Chondrogenic Pre-Differentiated and Undifferentiated Mesenchymal Stem Cells for the Repair of Full Thickness Articular Cartilage Defects in Rabbits, *J Orthop Res*, **29**: 1336–1342.

- Dejica VM, Mort JS, Lavery S, Percival MD, Antoniou J, Zukor DJ, Poole AR. 2008, Cleavage of type II collagen by cathepsin K in human osteoarthritic cartilage, *Am J Pathol*, **173**: 161-169.
- Dejica VM, Mort JS, Lavery S, Antoniou J, Zukor DJ, Tanzer M, Poole AR. 2012, Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage, *Arthritis Res Ther*, **14**: R113.
- Delgado JJ, Évora C, Sánchez E, Baro M, Delgado A. 2006, Validation of a method for non-invasive in vivo measurement of growth factor release from a local delivery system in bone, *J Control Release*, **114**: 223–229.
- Dewan AK, Gibson MA, Elisseeff JH, Trice ME. 2014, Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques, *Biomed Res Int* . 272481
- Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. 2005, Current concepts of molecular aspects of bone healing, *Injury*, **36**: 1392-1404.
- Ding M, Dalstra M, Linde F, Hvid I. 1998, Mechanical properties of the normal human tibial cartilage-bone complex in relation to age, *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, **13(4-5)**: 351-358.
- Dobson KR, Reading L, Haberey M, Marine X, Scutt A. 1999, Centrifugal isolation of bone marrow from bone: An improved method for the recovery and quantitation of bone marrow

osteoprogenitor cells rat tibiae and femurae, *Calcif Tissue Int*, **65**: 411-413.

- Doherty PJ, Zhang H, Tremblay L, Manolopoulos V, Marshall KW. 1998, Resurfacing of articular cartilage explants with genetically-modified human chondrocytes in vitro, *Osteoarthritis Cartilage*, **6**: 153-159.
- Echave MC, Del Burgo LS, Pedraz JL, **Orive G**. 2017, ,Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering, *Curr Pharm Des*, doi: 10.2174/0929867324666170511123101.
- Eymard F, Parsons C, Edwards MH, Petit-Dop F, Reginster JY, Bruyère O, Richette P, Cooper C, Chevalier X. 2015, Diabetes is a risk factor for knee osteoarthritis progression, *Osteoarthritis Cartilage*, **23**: 851-859.
- Eyre DR. 1980, Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold, *Science*, **207**: 1315-1322.
- Fellows CR, Matta C, Zakany R, Khan IM, Mobasheri A. 2016, Adipose, Bone Marrow and Synovial Joint-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair, *Front Genet*, **7**: 213. doi: 10.3389/fgene.2016.00213.
- Finson KW, Chi Y, Bou-Gharios G, Leask A, Philip A. 2012, TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis, *Front Biosci (Schol Ed)*, **4**: 251-268.

- Flannery CR, Hughes CE, Schumaccher BL, Tudor D, Aydelotte MB, Kuettner KE, Caterson B. 1999, Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism, *Biochem Biophys Res Commun*, **254**: 535-541.
- Fortier La, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. 2011, The role of Growth factors in Cartilage Repair, *Clin Orthop Relat Res*, **469**: 2706-2715.
- Fosang AJ, Hardingham TE. 1996, Matrix proteoglycans. In: Comper WD, ed: *Extracellular Matrix*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp 200-229.
- Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, Vittur F. 2000, Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate, *Biomaterials*, **21**: 795-801.
- Franciozi CEDS, Vangsness CT Jr, Tibone JE, Martinez JC, Rodger D, Chou TC, Tai YC, Brant R, Wu L, Abdalla RJ, Han B, Evseenko D, Humayun M. 2017, Parylene scaffold for cartilage lesión, *Biomed Microdevices*, **19**: 26. doi: 10.1007/s10544-017-0170-7.
- Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R. 1993, Neocartilage formation in vitro and in vivo

using cells culture don synthetic biodegradable polymers, *J Biomed Mater Res*, **27**: 11-23.

- Freyria A-M, Mallein-Gerin F. 2012, Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors, *Injury*, **43**: 259-265.
- Friedman JM, Sennett ML, Bonadio MB, Orji KO, Neuwirth AL, Keah N, Carey JL, Moutos FT, Estes BT, Guilak F, Madry H, Mauck RL, Dodge GR. 2017, Comparison of Fixation Techniques of 3D-Woven Poly(ϵ -Caprolactone) Scaffolds for CartilageRepair in a Weightbearing Porcine Large Animal Model, *Cartilage*, doi: 10.1177/1947603517700953.
- Getgood AM, Kew SJ, Brooks R, Aberman H, Simon T, Lynn AK, Rushton N. 2012, Evaluation of early-stage osteochondral defect repair using a biphasic scaffold based on a collagen-glycosaminoglycan biopolymer in a caprine model, *Knee*, **19**: 422-430.
- Ghadially FN. 1983, *Fine Structure of Synovial Joints: A Text and Atlas of the Ultrastructure of Normal and Pathological Articular Tissues*. Butterworths, London, pp 55.
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. 2006, The control of chondrogenesis, *J Cell Biochem*, **97**: 33-44.
- Grassel S, Anders S. 2012, Cell-based therapy options for osteochondral defects. Autologous mesenchymal stem cells

compared to autologous chondrocytes, *Der Orthopäde*, **5**: 415-428.

- Grässel S, Lorenz J. 2014, Tissue-engineering strategies to repair chondral and osteochondral tissue in osteoarthritis: use of mesenchymal stem cells, *Curr Rheumatol Rep*, **16**: 452.
- Griffin DJ, Orved KF, Nixon AJ, Bonassar LJ. 2016, Mechanical properties and structure-function relationships in articular cartilage repaired using IGF-I gene-enhanced chondrocytes, *J Orthop Res*, **34**: 149-153.
- Guilak F, Ractcliffe A, Lane N, Rosenwasser MP, Mow VC. 1994, Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis, *J Orthop Res*, **12**: 474-484.
- Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM. 1999, The deformation behaviour and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage, *Osteoarthritis Cartilage*, **7**: 59-70.
- Guo X, Park H, Young S, Kretlow JD, van den Beucken JJ, Bagget LS, Tabata Y, Kasper FK, Mikos AG, Jansen JA. 2010, Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model, *Acta Biomater*, **6**: 39-47.
- Haleem AM, Singergy AA, Sabry D, Atta HM, Rashed LA, Chu CR, El Shewy MT, Azzam A, Abdel Aziz MT. 2010, The Clinical

Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results, *Cartilage*, **1**: 253-261.

- Hallem AM, Chu CR. 2010, Advances in tissue engineering techniques for articular cartilage repair, *Oper Tech Orthop*, **20**: 76-89.
- Han Y, Wei Y, Wang S, Song Y. 2010, Cartilage regeneration using adipose-derived stem cells and the controlled-released hybrid microspheres, *Joint Bone Spine*, **77**: 27–31.
- Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. 1994, Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads, *J Cell Sci*, **107**: 17-27.
- Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A, Heinegård D. 1992, Cartilage matrix proteins: An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage, *J Biol Chem*, **267**: 6132-6136.
- Hedlund H, Mengarelli-Widholm S, Heinegard D, Heinegård D, Reinholt FP, Svensson O. 1994, Fibromodulin distribution and association with collagen, *Matrix Biol*, **14**: 227-232.
- Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, Todhunter RJ, Minor RM, Erb H, Lust G. 1994, Chondrocyte-fibrin matrix transplants

for resurfacing extensive articular cartilage defects, *J Orthop Res*, **12**: 485-497.

- Henning M, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Johnstone B, Cucchiari M. 2014, Transforming Growth Factor Beta-Releasing Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering, *Tissue Eng Part B*, **20**: 106-125.
- Hernández A, Sánchez E, Soriano I, Reyes R, Delgado A, Evora C. 2011, Material-related effects of BMP-2delivery systems on bone regeneration, *Acta Biomater*, **8**: 781-791.
- Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegård D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. 1994, Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta, *Biochem J*, **302**: 527-534.
- Hodge WA, Carlson KL, Fijan RS, Burgess RG, Riley PO, Harris WH, Mann RW. 1989, Contact pressures from an instrumented hip endoprosthesis, *J Bone Jopint Surg [Am]*, **71**: 1378-1386.
- Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard G-E, Hurtig M, Buschmann MD. 2007, Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects, *Osteoarthritis Cartilage*, **15**: 78-89.

- Holland TA, Bodde EW, Baggett LS, Tabata Y, Mikos AG, Jansen JA. 2005, Oateochondral repair in the rabbit model utilizing bilayered, degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds, *J Biomed Mater Res A*, **75**: 156-167.
- Holland TA, Bodde EW, Cuijpers VM, Baggett LS, Tabata Y, Mikos AG, Jansen JA. 2007, Degradable hydrogel scaffolds for in vivo delivery of single and dual growth factors in cartilage repair, *Osteoarthritis Cartilage*, **15**: 187-197.
- Honner R, Thmopson RC. 1971, The nutritional pathways of articular cartilage. An autoradiographic study in rabbits using ³⁵S injected intravenously, *J Bone Jopint Surg [Am]*, **53**: 742-748.
- Hu JCY, Athanasiou KA. 2003, Structure and Function of Articular Cartilage, from: *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Edited by: An, YH y Martin KL © Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 73-95.
- Huang Z, Ren P-G, Ma T, Smith RL, Goodman SB. 2010, Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability, *Cytokine*, **51**: 305–310.
- Huang GP, Menezes R, Vincent R, Hammond W, Rizio L, Collins G, Arinzeh TL. 2017, Gelatin Scaffolds Containing Partially Sulfated Cellulose Promote Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis, *Tissue Eng Part A*, doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0461.

- Hunziker EB. 1999, Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?, *Osteoarthritis Cartilage*, **7**: 15-28.
- Hunziker EB. 2002, Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects, *Osteoarthritis Cartilage*, **10**: 432-463
- Hunziker EB, Lippuner K, Keel MJ, Shintani N. 2015, An educational review of cartilage repair: precepts & practice--myths & misconceptions--progress & prospects, *Osteoarthritis Cartilage*, **23**: 334-350.
- Im GI, Lee JH. 2010, Repair of osteochondral defects with adipose stem cells and a dual growth factor-releasing scaffold in rabbits, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **92**: 522-560.
- Ishihara K, Nakayama K, Akieda S, Matsuda S, Iwamoto Y. 2014 Simultaneous regeneration of full-thickness cartilage and subchondral bone defects in vivo using a three-dimensional scaffold-free autologous construct derived from high-density bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *J Orthop Surg Res*, **9**: 98. doi: 10.1186/s13018-014-0098-z.
- Jackson DW, Scheer MJ, Simon TM. 2001, Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options, *J Am Acad Orthop Surg* **9**: 37-52.
- Jeong CG, Zhang H, Hollister SJ. 2012, Three-dimensional polycaprolactone scaffold-conjugated bone morphogenetic

protein-2 promotes cartilage regeneration from primary chondrocytes in vitro and in vivo without accelerated endochondral ossification, *J Biomed Mater Res Part A*, **100**: 2088-2096.

- Jiang Y, Chen LK, Zhu DC, Zhang JR, Guo C, Qi YY, Ouyang HW. 2010, The inductive effect of bone morphogenetic protein-4 on chondral-lineage differentiation and in situ cartilage repair, *Tissue Eng Part A*, **16**: 1621-1632.
- Kandel RA, Boyle J, Gibson G. 1997, *In vitro* formation of mineralized cartilagenous tissue by articular chondrocytes, *In vitro Cell Dev Biol Anim*, **33**: 174-181.
- Kazemnejad S, Khanmohammadi M, Mobini S, Taghizadeh-Jahed M, Khanjani S, Arasteh S, Golshahi H, Torkaman G, Ravanbod R, Heidari-Vala H, Moshiri A, Tahmasebi MN, Akhondi MM. 2016, Comparative repair capacity of knee osteochondral defects using regenerated silk fiber scaffolds and fibrin glue with/without autologous chondrocytes during 36 weeks in rabbit model, *Cell Tissue Res*, **364**: 559-572.
- Kempson GE, Tuke MA, Dingle JT, Barrett AJ, Horsfield PH. 1976, The effects of proteolytic enzymes on the mechanical properties of adult human articular cartilage, *Biochim Biophys Acta*, **428**: 741-760.
- Kim M, Farrell MJ, Steinberg DR, Burdick JA, Mauck RL. 2017, Enhanced Nutrient Transport Improves the Depth-Dependent

Properties of Tr-Layered Engineered Cartilage Constructs with Zonal Co-Culture of Chondrocytes and MSC, *Acta Biomater*, S1742-7061(17)30387-2. doi: 10.1016/j.actbio.2017.06.025.

- King KB, Rosenthal AK. 2015, The adverse effects of diabetes on osteoarthritis: update on clinical evidence and molecular mechanisms, *Osteoarthritis Cartilage*, **23**: 841-850.
- Knight MM, Lee DA, Bader DL. 1998, The influence of elaborated pericellular matrix on the deformation of isolated articular chondrocytes cultured in agarose, *Biochim Biophys Acta*, **140**: 67-77.
- Knudson CB. 1993, Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix, *J Cell Biol*, **120**: 825-834.
- Krause WJ, Cutts JH. 1994, Special connective tissue: cartilage, bone and joints. In: Schnittman ER, Mastrodomenico A, eds: *Essentials of Histology: Text/Atlas/Review, 1 st ed.* Little, Brown and Company, Boston, MA, pp 105-140.
- Kuo YC, Ku HF, Rajesh R. 2017, Chitosan/γ-poly(glutamic acid) scaffolds with surface-modified albumin, elastin and poly-l-lysine for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **78**: 265-277.
- LaPorta TF, Richter A, Sgaglione NA, Grande DA. 2012, Clinical relevance of scaffolds for cartilage engineering, *Orthop Clin North Am*, **43**: 245-254.

- Lai WM, Mow VC, Zhu W. 1993, Constitutive modeling of articular cartilage and biomacromolecular solutions, *J Biomech Eng*, **115**: 474-480.
- Le Meng Bao C, Teo EY, Chong MSK, Liu Y, Choolani M, Chan JKY. 2013, Advance in bone tissue engineering, regenerative medicine and tissue engineering. Prof. Jose A. Andrades (ed) ISBN: 978-953-51-1108-5, **Chapter 24**: 599-614.
- Lee DA, Salih V, Stockton EF, Stanton JS, Bentley G. 1997, Effect of normal synovial fluid on the metabolism of articular chondrocytes in vitro. *Clin Orthop Relat Res*, **342**: 228-38.
- Lee DA, Noguchi T, Knight MM, O'Donnell L, Bentley G, Bader DL. 1998, Response of chondrocyte subpopulations cultured within unloaded and loaded agarose, *J Orthop Res*, **16**: 726-733.
- Lee JH, Kisiday J, Grodzinsky AJ. 2003, Tissue-engineered versus native cartilage: linkage between cellular mechanotransduction and biomechanical properties. *Novartis Found Symp*, **249**: 52-64; discussion 64-9, 170-4, 239-41. Review.
- Lee JK, Gegg CA, Hu JC, Reddi AH, Athanasiou KA. 2015, Thyroid hormones enhance the biomechanical functionality of scaffold-free neocartilage. *Arthritis Res Ther*, **11**: 17:28.

- Li Z, Kupcsik L, Yao SJ, Alini M, Stoddart MJ. 2009, Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells in fibrin-polyurethane composites, *Tissue Eng Part A*, **15**: 1729-1737.
- Loeser RF, Chubinskaya S, Pacione C, Im HJ. 2005, Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes, *Arthritis Rheum*, **52**: 3910-3917.
- Mansour JM, Mow VC. 1976, The permeability of articular cartilage under compressive strain and at high pressure, *J Bone Joint Surg [Am]*, **58**: 509-516.
- Marchand C, Rivard GE, Sun J, Hoemann CD. 2009, Solidification mechanisms of chitosan-glycerol phosphate/blood implant for articular cartilage repair, *Osteoarthritis Cartilage*, **17**: 953-960.
- Maroudas A. 1976, Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage, *Nature*, **260**: 808-809.
- Maroudas A. 1979, Physicochemical properties of articular cartilage. In: Freeman MAR, ed: *Adult Articular Cartilage, 2nd ed.* Pitman Medical, Kent, UK, pp 215-290.
- Maroudas A, Grushko G. 1990, Measurement of swelling pressure of cartilage. In: Maroudas A, Kuettner K, eds:

Methods in Cartilage Research, Academic Press, New York, NY, pp 298-301.

- Martin I, Vunjak-Novakovic G, Yang J, Langer R, Freed LE. 1999, Mammalian Chondrocytes Expanded in the Presence of Fibroblast Growth Factor 2 Maintain the Ability to Differentiate and Regenerate Three-Dimensional Cartilaginous Tissue, *Exp Cell Res*, **253**: 681–688.
- Martin-Hernández C. 2002, Estudio mecánico, histológico e histomorfométrico del regenerado de cartílago a partir de injertos de periostio invertido. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Mattioli-Belmonte M, Gigante A, Muzzarelli RS, Politano R, De Benedittis A, Specchia N, Buffa A, Biagini G, Greco F. 1999, N,N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage, *Med Biol Eng Comput*, **37**: 130-134.
- Mazor M, Lespessailles E, Coursier R, Daniellou R, Best TM, Toumi H. 2014, Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: an update, *J Cell Mol Med*, **18**: 2340-2350.
- Menche DS, Frenkel SR, Blair B, Watnik NF, Toolan BC, Yaghoubian RS, Pitman MI. 1996, A comparison of abrasión burr arthroplasty and subchondral drilling in the treatment of full-thickness cartilage lesions in the rabbit, *Arthroscopy*, **12**: 280-286.

- Menendez MI, Clark DJ, Carlton M, Flanigan DC, Jia G, Sammet S, Weisbrode SE, Knopp MV, Bertone AL. 2011, Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model, *Osteoarthritis Cartilage*, **19**: 1066-1075.
- Milkovick ND, Cooper GM, Marra KG. 2008, Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells, *Osteoarthritis Cartilage*, **16**: 1121-1130.
- Minas T, Peterson L. 1999, Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation, *Clin Sports Med*, **18**: 13-44.
- Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME. 2014, Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions, *Maturitas*, **78**: 188-198.
- Moeckel B, Huo MH, Salvati EA, Pellicci PM. 1993, Total hip arthroplasty in patient with diabetes mellitus, *J Arthroplasty*, **8**: 279-284.
- Mollon B, Kandel R, Chahal J, Theodoropoulos J. 2013, -the clinical status of cartilage tissue regeneration in humans, *Osteoarthritis Cartilage*, **21**: 1824-1833.
- Mow VC, Holmes MH, Lai WM. 1984, Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review, *J Biomech*, **17**: 377-394.

- Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. 1992, Cartilage and diarthrodial joints as a paradigm for hierarchical materials and structures, *Biomaterials*, **13**: 67-97.
- Muir IHM. 1979, Biochemistry. In: Freeman MAR, ed: *Adult Articular Cartilage, 2nd ed.* Pitman Medical, Kent, UK, pp 145-214.
- Na K, Kim S, Woo DG, Sun BK, Yang HN, Chung HM, Park KH. 2007, Combination material delivery of dexamethasone and growth factor in hydrogel blended with hyaluronic acid constructs for neocartilage formation, *J Biomed Mat Res A*, **83**: 779-786.
- Narcisi R, Quarto R, Ulivi V, Muraglia A, Molfetta L, Giannoni P. 2012, TGF β -1 administration during ex vivo expansion of human articular chondrocytes in a serum-free medium redirects the cell phenotype toward hypertrophy, *J Cell Physiol*, **227**: 3282-3290.
- Narmoneva DA, Wang JY, Setton LA. 1999, Nonuniform swelling-induced residual strains in articular cartilage, *J Biomech*, **32**: 401-408.
- Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. 1997, Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro [published erratum appears in J Biomed Mater Res, 38:288, 1997], *J Biomed Mater Res*, **38**: 95-104.

- Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. 1998, Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model, *Biomaterials*, **19**: 2313-2328.
- Neumann AJ, Gardner OF, Williams R, Alini M, Archer CW, Stoddart MJ. 2015, Human Articular Cartilage Progenitor Cells Are Responsive to Mechanical Stimulation and Adenoviral-Mediated Overexpression of Bone-Morphogenetic Protein 2, *PLoS One*, **10**: e0136229. doi: 10.1371/journal.pone.0136229.
- O'Driscoll SW. 1999, Articular cartilage regeneration using periosteum, *Clin Orthop*, **367**: S186-S203.
- Opolka A, Ratzinger S, Shubert T, Spiegel H-U, Grifka J, Bruckner P, Probst A, Grässel S. 2007, Collagen IX is indispensable for timely maturation of cartilage during fracture repair in mice, *Matrix Biology*, **26**: 85-95.
- Park JS, Woo DG, Yang HN, Na K, Park KH. 2009, Transforming growth factor beta-3 bound with sulfate polysaccharide in synthetic extracellular matrix enhanced the biological activities for neocartilage formation in vivo, *J Biomed Mat Res A*, **91**: 408-415.
- Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. 2005, Basic science of articular cartilage and osteoarthritis, *Clinics in Sport Medicine*, **24**: 1-12.

- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. 2000, Two-to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee, *Clin Orthop*, **374**: 212-234.
- Phull AR, Eo SH, Abbas Q, Ahmed M, Kim SJ. 2016, Applications of Chondrocyte-Based Cartilage Engineering: An Overview, *Biomed Res Int*, 2016:1879837. doi: 10.1155/2016/1879837.
- Poole CA. 1997, Articular cartilage chondrons: from function and failure, *J Anat*, **191**: 1-13.
- Qi YY, Chen X, Jiang YZ, Cai HX, Wang LL, Song XH, Zou XH, Ouyang HW. 2009, Local delivery of autologous platelet in collagen matrix simulated in situ articular cartilage repair, *Cell Transplantation*, **18**: 1161-1169.
- Qi YY, Zhao T, Xu K, Dai T, Yan W. 2012, The restoration of full-thickness cartilage defects with mesenchymal stem cells (MSCs) loaded and cross-linked bilayer collagen scaffolds on rabbit model, *Mol Biol Rep*, **39**: 1231-1237.
- Redini F, Lafuma C, Pujol JP, Robert L, Hornebeck W. 1988, Effect of cytokines and growth factor on the expression of elastase activity by human synoviocytes, dermal fibroblasts and rabbit articular chondrocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, **155**: 786-793.

- Richter W. 2009, Mesenchymal stem cells and cartilage *in situ* regeneration, *J Int Med*, **266**: 390-405.
- Riihimäki Hilikka y Viikari-Juntura Eira. 2001, Sistema musculoesquelético, capítulo 6, pp 1-39. En: Enciclopedia de la OIT. Ministerio de Empleo y Seguridad Social.
- Rodríguez-Évora M, Delgado A, Reyes R, Hernández-Daranas A, Soriano I, San Román J, Évora C. 2013, Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA- β TCP concentric system in a critical size defect in rats, *Eur J Pharm*, **49**: 873-884.
- Rosen DM, Stempien SA, Thompson AY, Brennan JE, Ellingsworth LR, Seyedin SM. 1986, Differentiation of rat mesenchymal cells by cartilage-inducing factor. Enhanced phenotypic expression by dihydrocytochalasin B, *Exp Cell Res*, **165**: 127-138.
- Rosen DM, Stempien SA, Thompson AY, Seyedin SM. 1988, Transforming growth factor-beta modulates the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes in vitro, *J Cell Physiol*, **134**: 337-346.
- Ross MH, Pawlina W. 2007, Tejido cartilaginoso, capítulo 7, pp 198-217. Histología. *Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 5ª Ed. Editorial Médica Panamericana, pp 198-217.

- Ruan SQ, Yan L, Deng J, Huang WL, Jiang DM. 2017, Preparation of a biphasic composite scaffold and its application in tissue engineering for femoral osteochondral defects in rabbits, *Int Orthop*, doi: 10.1007/s00264-017-3522-2.
- Rudert M. 2002, Histological Evaluation of Osteochondral defects: Consideration of Animal Models with Emphasis on the Rabbit, Experimental Setup, Follow-Up and Applied Methods, *Cells Tissues*, **171**: 229–240.
- Rudert M, Wilms U, Hoberg M, Wirth CJ. 2005, Cell-based treatment of osteochondral defects in the rabbit knee with natural and synthetic matrices: cellular seeding determines the outcome, *Arch Orthop Trauma Surg*, **125**: 598-608.
- Safran MR, Kim H, Zaffagnini S. 2008, The use of scaffolds in the management of articular cartilage injury, *J Am Acad Orthop Surg*, **16**: 306-311.
- Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA. 1996, Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture, *J Orthop Res*, **14**: 937-945.
- Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. 2016, BMP signalling in skeletal development, disease and repair, *Nat Rev Endocrinol*, **12**: 203-221.
- Sancho-Tello M, Martorell S, Mata Roig M, Milián L, Gámiz-González MA, Gómez Ribelles JL, Carda C. 2017, Human

platelet-rich plasma improves the nesting and differentiation of human chondrocytes cultured in stabilized porous chitosan scaffolds, *J Tissue Eng*, **8**: 2041731417697545. doi: 10.1177/2041731417697545.

- Schinagl RM, Gurskis D, Chen AC, Sah RL. 1997, Depth-dependent confined compression modulus of full-thickness bovine articular cartilage, *J Orthop Res*, **15**: 499-506.
- Schmidt G, Hausser H, Kresse H. 1991, Interaction of the small proteoglycan decorin with fibronectin. Involvement of the sequence NKISK of the core protein, *Biochem J*, **280**: 411-414.
- Schrock JB, Kraeutler MJ, Houck DA, McQueen MB, McCarty EC. 2017, A Cost-Effectiveness Analysis of Surgical Treatment Modalities for Chondral Lesions of the Knee: Microfracture, Osteochondral Autograft Transplantation, and Autologous Chondrocyte Implantation, *Orthop J Sports Med*, **5**: 2325967117704634. doi: 10.1177/2325967117704634.
- Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, Aydelotte MB, Kuettner KE. 1994, A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage, *Arch Biochem Biophys*, **311**: 144-152.
- Schuman L, Buma P, Versleyen D, de Man B, van der Kraan PM, van den Berg WB, Homminga GN. 1995, Chondrocyte behaviour within different types of collagen gel in vitro, *Biomaterials*, **16**: 809-814.

- Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. 2005, Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma, *Cell Tissue Res*, **320**: 269-276.
- Sellers RS, Peluso D, Morris EA. 1997, The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage, *J Bone Joint Surg [Am]*, **79**: 1452-1463.
- Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, Beckwith K, Morris EA. 2000, Repair of Articular Cartilage Defects One Year After Treatment with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2), *J Bone Joint Surg*, **82A**: 151-160.
- Shao XX, Hutmacher DW, Tuan Ho S, Goh JCH, Lee EH. 2006, Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits, *Biomaterials*, **27**: 1071-1080.
- Sherman SL, Thyssen E, Nuelle CW. 2017, Osteochondral Autologous Transplantation, *Clin Sports Med*, **36**: 489-500.
- Siczkowski M, Watt FM. 1990, Subpopulations of chondrocytes from different zones of pig articular cartilage. Isolation, growth and proteoglycan synthesis in culture, *J Cell Sci*, **97**: 349-360.
- Siebert CH, Schneider U, Sopka S, Wahner T, Miltner O, Niedhart C. 2006, Ingrowth of osteochondral grafts under the

influence of growth factors: 6-month results of an animal study, *Arch Orthop Trauma Surg*, **126**: 247-252.

- Singh YP, Bhardwaj N, Mandal BB. 2016, Potential of Agarose/Silk Fibroin Blended Hydrogel for in Vitro Cartilage Tissue Engineering, *ACS Appl Mater Interfaces*, **8**: 21236-21249.
- Sittering M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, Planck H, Burmester GR, Bujia J. 1996, Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes, *J Biomed Mater Res*, **33**: 57-63.
- Smith GNJr, Brandt KD. 1992, Hypothesis: can type IX collagen "glue" together intersecting type II fibers in articular cartilage matrix? A proposed mechanism, *J Rheumatol*, **19**: 14-17.
- Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. 1999, Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue engineered repair of bone and cartilage, *J Orthop Res*, **17**: 205-213.
- Soltz MA, Ateshian GA. 1998, Experimental verification and theoretical prediction of cartilage interstitial fluid pressurization at an impermeable contact interface in contained compression, *J Biomech*, **31**: 927-934.

- Sopena JJ, Carrillo JM, Rubio M, Redondo JI, Serra I, Soler C. 2004, Estructura y función del cartílago articular, *Argos*, **52**: 24-26.
- Spain TL, Agrawal CM, Athanasiou KA. 1998, New technique to extend the useful life of a biodegradable cartilage implant, *Tissue Eng*, **4**: 343-352.
- Sun Y, Mauerhan DR, Kneisl JS, Norton HJ, Zinchenko N, Ingram J, Hanley EN, Gruber HE. 2012, Histological examination of collagen and proteoglycan changez in osteoarthritic menisci, *Open Rheumatol J*, **6**: 24-32.
- Tamai N, Myoui A, Hirao M, Kaito T, Ochi T, Tanaka J, Takaoka K, Yoshikawa H. 2005, A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), *Osteoarthritis Cartilage*, **13**: 405-417.
- Thompson D, Agrawal C, Athanasiou KA. 1996, The effects of dynamic compressive loading on biodegradable implants of 50%-50% polylactic acid-polyglycolic acid, *Tissue Eng*, **2**: 61-74.
- Tipton DA, Dabbous MK. 1998, Autocrine transforming growth factor beta stimulation of extracelular matrix production by fibroblast from fibrotic human gingiva, *J Periodontol*, **69**: 609-619.

- Tkaczuk H. 1986, Human cartilage stiffness. In vivo studies, *Clin Orthop Relat Res*, **206**: 301-312.
- Tokuhara Y, Wakitani S, Imai Y, Kawaguchi A, Fukunaga K, Kim M, Kadoya Y, Takaoka K. 2010, Repair of experimentally induced large osteochondral defects in rabbit knee with various concentrations of *Escherichia coli*-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Int Orthop*, **34**: 761-767.
- Trippel SB, Ehrlich MG, Lippiello L, Mankin HJ. 1980, Characterization of chondrocytes from bovine articular cartilage: I. Metabolic and morphological experimental studies, *J Bone Joint Surg [Am]*, **62**: 816-820.
- Trujillo Martín E. 2005, Canales de agua e iones en el cartílago articular, *Revista Española de Reumatología*, **32**: 13-17.
- Tuan RS, Chen AF, Klatt BA. 2013, Cartilage regeneration, *J Am Acad Orthop Surg*, **21**: 303-311.
- Turner AS, Athanasiou KA, Zhu CF, Alvis MR, Bryant HU. 1997, Biomechanical effects of estrogen on articular cartilage in ovariectomized sheep, *Osteoarthritis Cartilage*, **5**: 63-69.
- van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. 2010, Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: To serve and protect or a wolf in sheep clothing's?, *Osteoarthritis Cartilage*, **18**: 735-741.

- van Susante JL, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP. 1999, 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*, **20**: 1167-1175.
- Varas L, Ohlsson LB, Honeth G, Olsson A, Bengtsson T, Wiberg C, Bockermann R, Järnum S, Richter J, Pennington D, Johnstone B, Lundgren-Akerlund E, Kjellman C. 2007, Alpha10 integrin expression is upregulated on fibroblast growth factor-2 treated mesenchymal stem cells with improved chondrogenic differentiation potential, *Stem Cells Dev*, **160**: 965-978.
- Vaughan L, Mendler M, Huber S, Bruckner P, Winterhalter KH, Irwin MI, Mayne R. 1988, D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils, *J Cell Biol*, **106**: 991-997.
- Vayas R, Reyes R, Rodríguez-Évora M, Del Rosario C, Delgado A, Évora C. 2017, Evaluation of the effectiveness of a bMSC and BMP-2 polymeric trilayer system in cartilage repair, *Biomed Mater*, **12**: 045001. doi: 10.1088/1748-605X/aa6f1c.
- Vega Alvarez JA, García Suárez O, Fernández Monjil D, del Valle Soto ME. 2002, del Bioquímica y biología del cartílago articular, *Revista de Ortopedia y Traumatología*, **46**: 391-400.
- Vicent TL, Hermansson MA, Hansen UN, Saklatvala J. 2004, Basic fibroblast growth factor mediates transduction of mechanical signals when articular cartilage is loaded, *Arthritis Rheum*, **50**: 526-533.

- Vinardell T, Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ. 2012, A comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources, *Tissue Eng Part A*, **18(11-12)**: 1161-1170.
- Vogel K, Trotter J. 1987, The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils *in vitro*, *Collagen Rel Res*, **7**: 105-114.
- Wang W, Li B, Yang J, Xin L, Li Y, Yin H, Qi Y, Jiang Y, Ouyang H, Gao C. 2010, The restoration of full-thickness cartilage defects with BMSCs and TGF-beta 1 loaded PLGA/fibrin gel constructs, *Biomaterials*, **31**: 8964-8973.
- Wang Y, Yuan M, Guo QY, Lu SB, Peng J. 2015, Mesenchymal stem cells for treating articular cartilage defects and osteoarthritis, *Cell Transplant*, **24**: 1661-1678.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. 1994, Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage, *J Bone Joint Surg [Am]*, **76**: 579-592.
- Whyte GP, Gobbi A, Sadlik B. 2016, Dry Arthroscopic Single-Stage Cartilage Repair of the Knee Using a Hyaluronic Acid-Based Scaffold With Activated Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Arthrosc Tech*, **5**: e913-e918.

- Woessner JFJ, Howell DS. 1993, *Joint Cartilage Degradation*, Marcel Dekker, New York, NY.
- Yan H, Yu Ch. 2007, Repair of Full-Thickness Cartilage Defects With Cells of Different Origin in a Rabbit Model, *Arthroscopy*, **23**: 178-187.
- Yang JW, de Isla N, Huselstein C, Sarda-Kolopp MN, Li N, Li YP, Jing-Ping OY, Stoltz JF, Eljaafari A. 2006, Evaluation of human MSCs cell cycle, viability and differentiation in micromass culture, *Biorheology*, **43**: 489-496.
- Yang HS, La WG, Bhang SH, Kim HJ, Im GI, Lee H, Park JH, Kim BS. 2011, Hyaline cartilage regeneration by combined therapy of microfracture and long term bone morphogenetic protein-2 delivery, *Tissue Eng Part A* **17**: 1809-181.
- Yoon JJ, Park TG. 2001, Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts, *J Biomed Mater Res*, **55**: 401-408
- Yu H, Grynopas M, Kandel RA. 1997, Composition of cartilagenous tissue with mineralized and non-mineralized zones formed in vitro, *Biomaterials*, **18**: 1425-1431.
- Zanetti M, Ratcliffe A, Watt FM. 1985, Two subpopulations of differentiated chondrocytes identified with monoclonal antibody to keratan sulfate, *J Cell Biol*, **101**: 53-59.

- Zhang W, Chen J, Tao J, Jiang Y, Hu C, Huang L, Ji J, Ouyang HW. 2013, The use of type 1 collagen scaffold containing stromal cell-derived factor-1 to create a matrix environment conducive to partial-thickness cartilage defects repair, *Biomaterials*, **34**: 713-723.
- Zhang Z, Li L, Yang W, Cao Y, Shi Y, Li X, Zhang Q. 2017, The effects of different doses of IGF-1 on cartilage and subchondral bone during the repair of full-thickness articular cartilage defects in rabbits, *Osteoarthritis Cartilage*, **25**: 309-320.
- Zhen G, Cao X. 2014, Targeting TGF β signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis, *Trends Pharmacol Sci*, **35**: 227-236.
- Zhu D, Wang H, Trinh P, Heilshorn SC, Yang F. 2017, Elastin-like protein-hyaluronic acid (ELP-HA) hydrogels with decoupled mechanical and biochemical cues for cartilage regeneration, *Biomaterials*, **127**: 132-140.
- Zhu S, Zhang B, Man C, Ma Y, Hu J. 2011, NEL-like molecule-1-modified bone marrow mesenchymal stem cells/poly lactic-co-glycolic acid composite improves repair of large osteochondral defects in mandibular condyle, *Osteoarthritis Cartilage*, **19**: 743-750.

El cartílago articular constituye una variedad de tejido conjuntivo que recubre los extremos de las articulaciones sinoviales proveyendo una superficie de baja fricción y distribuyendo la carga al hueso subcondral subyacente. El cartílago se caracteriza por su baja densidad celular y por la ausencia de vascularización e inervación, lo que hace muy difícil su autoreparación tras una lesión. El escaso éxito de los tratamientos convencionales aplicados hasta el momento, ha potenciado en los últimos años el desarrollo de la ingeniería de tejidos para la reparación de lesiones del cartílago.

En este trabajo, se elaboran y ensayan dos sistemas biocompatibles, evaluando su capacidad condrogénica en la reparación de un defecto osteocondral crítico en fémur de conejo. El primer sistema, un scaffold de doble capa de alginato-PLGA (ALG-PLGA), conteniendo BMP-2 o TGF- β 1 (FC) encapsulados en microesferas de PLGA, controló de manera eficaz la liberación de los FC, y mostró una alta tasa de reparación a las 12 semanas postimplantación, en todos los grupos tratados con FC.

El segundo sistema, también de doble capa, incorporó un nuevo poliuretano segmentado (SPU) en sustitución del alginato, y mostró igualmente excelentes resultados en el control de la liberación de los FC, y en la reparación del defecto a las 12 semanas postimplantación, en todos los grupos tratados con FC.

En función de varios aspectos, entre ellos la velocidad de degradación de los sistemas, se seleccionó el sistema de ALG-PLGA como el más idóneo, y la BMP-2 a dosis de 5 μ g como la más adecuada, para evaluar, de forma comparativa, la capacidad condrogénica del tratamiento con células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (MSC) o condrocitos autólogos (rbC), solas, o en combinación con BMP-2. La eficacia reparadora de todos los tratamientos individuales o en combinación fue la misma a las 12 semanas postimplantación.

El análisis global de los resultados muestra por una parte, que ambos sistemas son adecuados para su aplicación en ingeniería de tejidos, y por otra, justifica el uso de FC (BMP-2/TGF- β 1) frente a la terapia celular en medicina regenerativa del cartílago.
