

## Regeneración de defectos osteocondrales a partir de células madre mesenquimales autólogas embebidas en geles de alginato

### Osteochondral defect regeneration from autologous mesenchymal stem cells embedded in alginate gels

García-Coiradas J, Lópiz Y, Marco F

Hospital Clínico San Carlos. Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Madrid, España.

---

#### Resumen

**Objetivo:** Evaluar y analizar la capacidad de reparación de células mesenquimales pluripotenciales autólogas embebidas en geles de alginato para favorecer la restauración completa de lesiones osteocondrales generadas en un modelo experimental.

**Material y método:** Se intervinieron 40 rodillas procedentes de 20 conejos albinos machos de raza neozelandesa de 5 meses de edad y un peso de entre 2.500 y 4.500 g. Se seleccionó un grupo control (grupo I, n=10), y en el resto se generó un defecto osteocondral en el área de carga del cóndilo femoral interno, y en función de la reparación efectuada sobre el mismo obtuvimos tres grupos: solo defecto (grupo II, n =10), relleno con alginato (grupo III, n = 10) y relleno con alginato y células (grupo IV, n = 10). Transcurridas ocho semanas, se extraen los cóndilos para su análisis macroscópico (Escala de Moran) e histológico (escalas de O'Driscoll e ICRS).

**Resultados:** Un fallecimiento intraoperatorio (grupo I) y una infección articular (grupo II) supusieron dos pérdidas. El grupo IV obtuvo una mejor reparación osteocondral a nivel macroscópico, con presencia de grupos de condrocitos en la histología y resultados significativos en cuanto a la reparación osteocondral en las escalas utilizadas.

**Conclusión:** El aporte de células mesenquimales en transportadores de alginato demuestra mejores resultados en reparación de lesiones osteocondrales de manera estadísticamente significativa, con mínimas complicaciones en modelos experimentales.

**Palabras clave:**

Alginato, células mesenquimales, reparación osteocondral.

#### Abstract

**Objective:** To evaluate and analyze the ability of autologous mesenchymal stem cells embedded in alginate gels to favor the complete restoration of osteochondral lesions generated in an experimental model.

**Material and method:** 40 knees from 20 male New Zealand albino rabbit breed 5 months old and weighing between 2,500 and 4,500 g were operated. One control group (no defect; group I, n=10) was established. In the other groups, an osteochondral defect was generated in the weight bearing area of the medial femoral condyle, and depending on the material aported on it got three groups selected. Group II had only defect (n = 10), group III was filled with alginate (n = 10), and group IV was filled with alginate and cells (n = 10). After eight weeks, the condyles for macroscopic (Moran Scale) and histologic analysis (O'Driscoll and ICRS Scales) are extracted.

**Results:** Intraoperative death (group I) and joint infection (group II) accounted for two losses. Group IV received a better macroscopic level osteochondral repair with chondrocyte groups present in histology and statistically significant results regarding the osteochondral repair scales used.

**Conclusion:** The contribution of mesenchymal cells in alginate carriers shows better results in restoration of osteochondral lesions with minimal complications in experimental models.

**Key words:**

Alginate, stem cells, osteochondral repair.

---

#### Correspondencia

J García Coiradas  
Islas Cíes 51, 28223. Pozuelo de Alarcón, Madrid, España.  
E-mail: jagueropa@hotmail.com

## Introducción

La limitada capacidad de regeneración del cartílago articular ha hecho que en los últimos tiempos se hayan desarrollado una infinidad de procedimientos destinados a conseguir su reparación. Sin embargo, el éxito de estos procedimientos ha sido limitado; en la actualidad aún no disponemos de ninguna técnica que consiga la completa restauración de un cartílago lesionado [1]. La incapacidad de regeneración del cartílago guarda relación con las características del propio tejido: su escasa vascularización y capacidad mitóticas, junto con la ausencia de células madre, hace que los defectos que no penetran el hueso subcondral, y que por lo tanto carecen del aporte celular del mismo, tengan una escasa o nula capacidad de regeneración. Por otro lado, aquellos defectos que alcanzan el hueso subcondral y que son capaces de generar un tejido de reparación lo hacen con unas características biomecánicas y bioquímicas claramente inferiores al cartílago hialino normal.

En este contexto terapéutico, ha sido necesario un replanteamiento consistente en la búsqueda de nuevas alternativas. Las terapias regenerativas constituyen actualmente una de las estrategias de curación más prometedoras [2]. Se han observado los fenómenos reparativos de lesiones condrales [3] y en la mayoría de los mismos se concluye la necesidad de aumentar la población celular en el lecho lesional, aumentando así el número de células sanas que, embebidas en un medio extracelular rico en factores de crecimiento, pudiera completar su estimulación y cumplimiento de la función tisular para la que estaban primariamente concebidos. En lo que no parece existir el mismo consenso, dada la amplia variedad de células empleadas, es en el origen de las mismas, si bien tanto el uso de condrocitos como de células mesenquimales inmaduras ofrece buenos resultados [4]. Muchos de estos estudios coinciden, además, en la necesidad de vehiculizar estas células en alguno de los medios de transporte o matrices celulares existentes, para que, una vez depositados en el lugar de la lesión, pudieran permanecer en el mismo hasta la completa restauración tisular [5]. La elección de este material es, por tanto, un factor clave en el proceso de reparación mediante técnicas de ingeniería tisular. En este sentido, el alginato es un polisacárido natural ampliamente empleado en técnicas de ingeniería tisular como transportador de células y factores de crecimiento, quedando suficientemente demostradas sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad [6].

Nuestra hipótesis es que el empleo de MSCs en la regeneración de defectos osteocondrales, al tratarse de células indiferenciadas, va a presentar ventajas frente al empleo de otros tipos celulares ya especializados, dada su capacidad

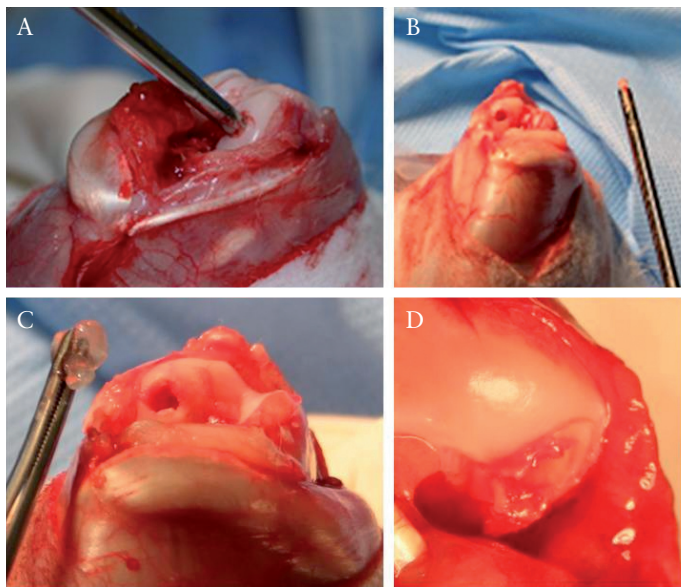
de automantenimiento de la población y de diferenciación *in vitro* a una gran variedad de tipos celulares del linaje mesodérmico como los condrocitos. Por otro lado, la inmunogenidad de estas células, junto con el hecho de que por sí mismas actúan secretando factores de crecimiento, podrían ser factores determinantes en una mejoría del proceso de reparación. Todo ello permitiría desarrollar un modelo de aplicabilidad clínica, dado que estas células pueden proliferar en cultivo hasta obtener cantidades adecuadas, que ofrecería importantes ventajas frente al empleo de condrocitos en la reparación de defectos. Por tanto, el objetivo de este estudio es evaluar la eficacia del uso de células madre mesenquimales (MSC) autólogas embebidas en geles de alginato en la reparación de defectos osteocondrales generados en un modelo experimental.

## Material y método

De forma previa al comienzo de este estudio se obtuvo la aprobación del comité ético de experimentación animal de nuestro centro. Se intervinieron 40 rodillas procedentes de 20 conejos albinos machos de raza blanca neozelandesa (*Oryctolagus Cuniculus*) de cinco meses de edad con un peso comprendido al inicio del estudio entre 2.500 y 4.500 gramos. Los animales fueron inicialmente sedo-analgésicos y posteriormente afeitados y preparados de manera estéril, con tres lavados con povidona yodada consecutivos. Seguidamente fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de xilazina (rompum®) (3mg/kg), sulfato de ketamina (ketolar®) (80mg/kg) y atropina (atropina Braun®) (1mg/kg). Durante el procedimiento quirúrgico se administró una dosis profiláctica de cefazolina de 250 mg (kefol®). Para la exposición de la superficie articular, se realizó una incisión pararrotiliana medial y se luxó la rótula lateralmente. La flexión de la rodilla permitió una adecuada exposición. Meniscos y ligamentos se preservaron íntegros.

Mediante un taladro manual (Kyphon®) se realizó un defecto osteocondral de 4 mm de ancho y 5 mm de profundidad en el área de máxima carga del cóndilo femoral interno, evitando el tendón extensor común, presente en el conejo (Figura 1). Tras la realización del defecto se procedió a su relleno según el grupo de estudio.

Tras el lavado profuso con suero fisiológico de la articulación y la reducción de la luxación rotuliana se procedió al cierre de la artrotomía en dos planos. Primero se suturó el tendón con sutura reabsorbible tipo vicryl 3/0, y seguidamente la piel con sutura reabsorbible vicryl 2/0. Se comprobó con el animal aún anestesiado el correcto recorrido de la rótula y la movilidad completa de la articulación, así como la resistencia de la sutura realizada.



**Fig. 1.** Realización de defecto osteocondral mediante taladro manual con tope (a y b). Aporte de matriz de alginato gelificada *in situ* al defecto osteocondral (c y d).

Al animal en su jaula no se le limitó ni el movimiento ni la carga. Durante los primeros siete días tras la intervención quirúrgica, se administró de manera profiláctica cefazolina 250 mg/día, además de paracetamol 200 mg/día para control analgésico.

El sacrificio del animal se realizó a las ocho semanas de la intervención mediante una inyección de pentobarbital sódico a dosis de 100 mg por kg de peso en bolo por vía intravenosa, utilizando la vena marginal del dorso de la oreja. Posteriormente se extrajeron ambos cóndilos femorales en una única pieza, mediante osteotomía supracondílea practicada con cizalla.

Las rodillas fueron estratificadas en cuatro grupos (n=10) en función de la actuación que hayamos realizado sobre las mismas. Grupo I: rodillas control. En ellas no se practicó ningún tipo de lesión. Grupo II: rodillas única y exclusivamente lesionadas, sin aportar nada en el defecto. Grupo III: rodillas en las que introdujimos el transportador de alginato, gelificado justo en el momento de su introducción en un tubo de Eppendorf estéril. Grupo IV: rodillas en las que introdujimos el transportador de alginato al que, en el proceso de gelificación, se le añadieron las células mesenquimales pluripotenciales previamente extraídas del conejo.

Para la preparación de geles de alginato se utilizaron diluciones de alginato sódico (sal sódica de ácido algínico, Sigma) al 2% en PBS. Los geles de alginato se formaron directamente en el momento de incorporarlos al lecho de la

lesión. Primero se añadieron 5  $\mu$ l de la dilución de alginato 2% correspondiente, posteriormente otros 5  $\mu$ l de la dilución de cloruro cálcico 2 mM correspondiente, y se dejó gelificar durante 30 segundos para su posterior manejo y aporte a la lesión.

Para obtener las células mesenquimales se utilizaron dos métodos: a) mediante abordaje percutáneo sobre cresta iliaca y/o trocánter mayor, se realizó punción-aspiración de médula ósea en conejos menores de cinco meses de edad. Un pequeño trócar (Kyphon®) se introdujo en la cresta y a través de este, con una jeringa de 20 ml que contiene 0,5 ml de heparina, se aspiraron 8-10 ml de médula ósea. En los individuos de las mismas condiciones de edad, sexo y tamaño que iban a ser sacrificados se obtuvo el aspirado medular del trocánter mayor y la médula ósea femoral.

Una vez recogida la médula ósea se añadieron inmediatamente 20 ml de LG-DMEM –Low-Glucose Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (Gibco BRL, Paisley, UK)– suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (0,01% de estreptomina y 0,06% de penicilina), y se centrifugaron para sedimentar las células. Se suspendieron y depositaron sobre un gradiente de densidad generado por la centrifugación de una solución de percoll al 70% (Sigma-Aldrich) a 13.000 g durante 15 minutos. La fracción de células de baja densidad se recogió, se lavó con medio control y se distribuyó uniformemente en placas de cultivo (100 mm de diámetro) para su separación selectiva basada en la adherencia celular. Las MSCs se cultivaron en medio control a 37° C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

Cuando los cultivos llegaron a confluencia, unas dos o tres semanas después de la obtención, las células se levantaron con tripsina al 0,25% y 1mM EDTA durante cinco minutos, a 37° C. Seguidamente, fueron marcadas con fluorocromo dye antes de embeberlas en el gel para su seguimiento histológico con la finalidad de conocer cuantas células de las inicialmente aportadas permanecen en la zona del defecto.

El aspecto macroscópico de la rodilla se evaluó de acuerdo a la escala descrita por Moran *et al.* [7], y posteriormente modificada [7]. Esta escala valora cuatro parámetros: adherencias intraarticulares, restauración de la superficie articular, erosiones y aspecto del cartílago. Para cada uno se otorga una puntuación que oscila de 0 a 2. Tras su puntuación la rodilla se fotografía (Figura 1).

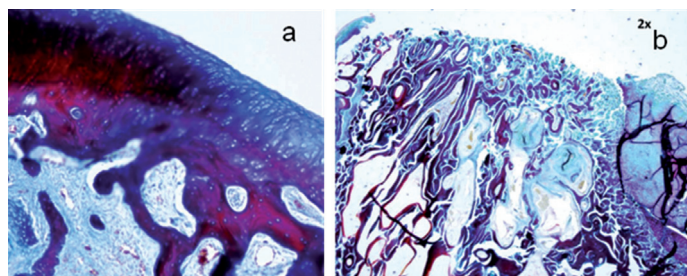
Se evaluaron por separado también otras características de la articulación, como la estabilidad articular. El abordaje parapatelar interno supone una zona de debilidad en la articulación, por lo que hay que considerar la posibilidad de

una luxación rotuliana. También se consideró el líquido sinovial. La irritación articular produce engrosamiento o fibrosis, exceso o ausencia de líquido sinovial. Asimismo, ante la presencia de un proceso infeccioso, este líquido puede ser de aspecto purulento.

Posteriormente, las muestras fueron fijadas con formol y decalcificadas. Una vez conseguido, se embebieron en parafina y se realizaron secciones con micrótopo de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, que fueron teñidas con hematoxilina-eosina, tricómico de Masson y safranina.

El análisis histológico se realizó por un observador ciego que utilizó dos escalas de puntuación: una modificación de la escala de puntuación O'Driscoll y la escala International Cartilage Repair Society (ICRS) [7]. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Leica (Figura 2). La identificación de las MSCs embebidas en los geles de alginato se realizó, por observación de cortes histológicos, bajo microscopio de fluorescencia.

Para el análisis estadístico utilizamos el programa SPSS para Windows, versión 15.0. Las variables cualitativas se describieron con su distribución de frecuencias y las variables cuantitativas en su media y desviación estándar (DE), o en su caso en la mediana y rango intercuartílico, según distribución. En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de varianzas. En todas las comparaciones de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error alfa menor a 0,05. Para comparar las variables cualitativas y cuantitativas de ambos grupos de estudio utilizamos técnicas de Anova, U de Mann-Whitney en condiciones no normales y t de Student en condiciones normales. Todas las escalas utilizadas se compararon mediante regresión lineal multivariante. Una  $p < 0,05$  fue considerada como significativa en todos los casos.



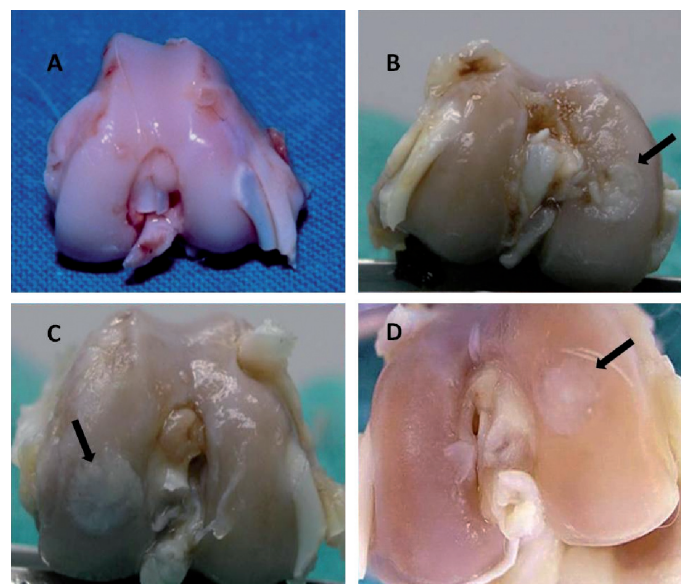
**Fig. 2.** Imágenes de MO con tinción HE. a) Cóndilo sin lesión (grupo I). Obsérvese la integridad y continuidad del cartílago hialino. b) Solo defecto (grupo II). Ausencia de reparación de cartílago hialino y proliferación de hueso subcondral.

## Resultados

A los dos meses de la cirugía la evaluación macroscópica mostró diferencias en cuanto al aporte o no de MSCs. Las rodillas control presentaban un cartílago sin alteraciones, aunque en algunas se observaron escasas adherencias intraarticulares. Las rodillas en las que se aportaron MSCs mostraron una regeneración en la zona del defecto visualmente mayor, con aspecto más vitalizado del cartílago hialino y menos zonas de fisuración y fibrilación (Figura 3). Se observó en algunos de estos casos una proliferación osteocartilaginosa macroscópicamente florida.

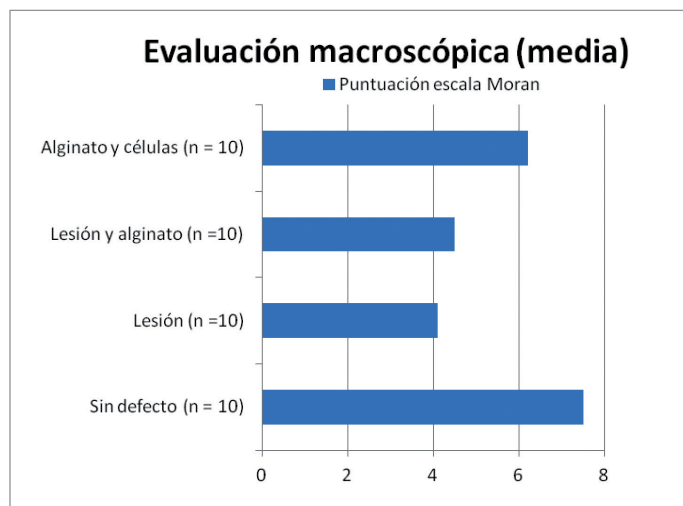
La puntuación media obtenida para cada uno de los cuatro grupos en la escala de valoración macroscópica, cuya puntuación máxima es de 8 puntos, se encuentra en la Tabla 1. Las rodillas en las que no se realizó defecto (grupo I, control) obtuvieron mejores resultados que el resto de los grupos ( $p < 0,02$ ). Excluyendo este primer grupo, los tratados con alginato y aporte de células presentaron una puntuación estadísticamente superior a los defectos vacíos ( $p < 0,002$ ) y a los tratados con alginato ( $p < 0,006$ ) (Tabla 2).

En cuanto a los resultados histológicos, analizamos en primera instancia los obtenidos en la escala de O'Driscoll, por ser más sencilla y reproducible (Tabla 3). En los seis apartados que valora dicha escala, observamos que los datos obtenidos tienden hacia el valor de referencia (grupo control), aproximándose más cuanto más completo sea el



**Fig. 3.** Aspecto macroscópico de los grupos de estudio. A) grupo I: Sin creación de defecto, B) grupo II: Defecto sin relleno, C) grupo III: Defecto con matriz de alginato, D) grupo IV: Defecto con matriz de alginato y células madre.

Muestra	Adherencias intra	Restauración	Erosión	Apariencia cartilago	Total
Sin defecto	1,5	2	2	2	7,5
Defecto	1,3	1	1,1	0,7	4,1
Alginato	0,9	1,4	1,3	1	4,6
Alginato-MSC	1,5	1,3	1,9	1,5	6,2



**Tabla 1.** Evaluación macroscópica según la escala de Moran. Cada variable y cada muestra es valorada de 0 a 2, expresando aquí únicamente las medias. Obsérvese que los mejores resultados se obtienen en rodillas sin defecto, seguido de los defectos reparados con alginato y células.

```

. regress MORANtotal G1 G2 G3

```

Source	SS	df	MS			
Model	76.5	3	25.5	Number of obs =	40	
Residual	67.4	36	1.8722222	F( 3, 36) =	13.62	
Total	143.9	39	3.68974359	Prob > F =	0.0000	
				R-squared =	0.5316	
				Adj R-squared =	0.4926	
				Root MSE =	1.3683	

MORANtotal	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
G1	1.3	.6119187	2.12	0.041	.0589714 2.541029
G2	-2.1	.6119187	-3.43	0.002	-3.341029 -.8589714
G3	-1.8	.6119187	-2.94	0.006	-3.041029 -.5589714
_cons	6.2	.4326918	14.33	0.000	5.32246 7.07754

```

. regress MORANtotal G1 G2 G4

```

Source	SS	df	MS			
Model	76.5	3	25.5	Number of obs =	40	
Residual	67.4	36	1.8722222	F( 3, 36) =	13.62	
Total	143.9	39	3.68974359	Prob > F =	0.0000	
				R-squared =	0.5316	
				Adj R-squared =	0.4926	
				Root MSE =	1.3683	

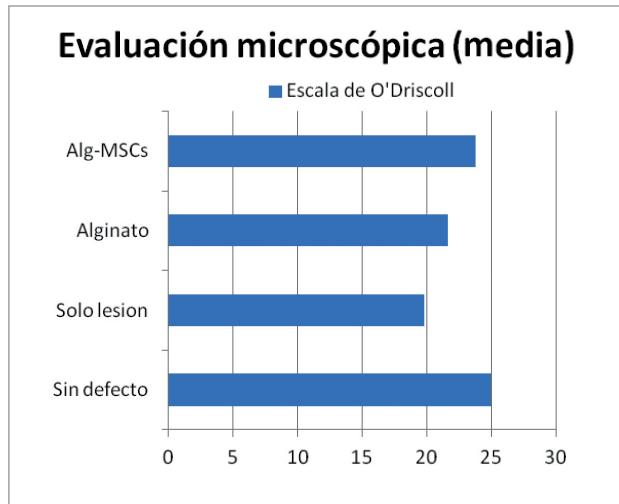
MORANtotal	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
G1	3.1	.6119187	5.07	0.000	1.858971 4.341029
G2	-3	.6119187	-4.9	0.627	-1.541029 .9410286
G4	1.8	.6119187	2.94	0.006	.5589714 3.041029
_cons	4.4	.4326918	10.17	0.000	3.52246 5.27754

**Tabla 2.** Como se observa en los resultados obtenidos para la escala descrita por Moran (macroscópica), los resultados de las rodillas del grupo IV (aparatado superior, en rojo) muestran resultados significativos, siendo mejores que los grupos II y III, y peores que el I o grupo control.

relleno del lecho lesional (Figura 4). Así, el porcentaje de cartilago hialino presente en las rodillas a las que aportamos alginato y células mesenquimales era cercano al porcentaje presente en el grupo control. En cambio, el porcentaje de cartilago hialino en las muestras que solo presentaban la lesión era mucho menor comparado con el grupo control ( $p < 0,012$ ). No obstante, comparando las medias globales obtenidas para la escala de O'Driscoll entre los cuatro grupos, solo obtuvimos significación estadística en favor del grupo control respecto a los otros tres grupos ( $p < 0,013$ ). El grupo II tuvo peores resultados en la valoración global que el IV, siendo igualmente significativo ( $p < 0,004$ ) (Tabla 5). La ausencia de lesión en el cartilago articular arroja resultados histológicos superiores en todos los apartados evaluados con presencia de lesión, sea cual fuere la actuación que hagamos sobre la misma. No obstante, la tendencia estadística a ofrecer mejores resultados conforme pasamos del grupo II al III ( $p > 0,120$ ) y del III al IV ( $p > 0,095$ ) nos hace pensar que si aumentásemos el tamaño muestral, podríamos obtener resultados significativos favorables que avalen nuestra hipótesis.

Observamos resultados y tendencias similares en la evaluación de la escala ICRS (Tabla 4). De forma significativa, el grupo control superó a los otros grupos en la valoración global ( $p < 0,02$ ), y en cada apartado concreto presentando una potencia estadística mayor frente al grupo II que frente

Muestra	% Cartílago hialino	Estructura	Cartílago en lesión	Cartílago adyacente	Hueso subcondral	Unión cartílago hueso	Safranina	Total
Sin defecto	7,2	6,8	2	3	2	2	2	25
Solo lesión	5,4	6,2	1,6	1,9	1,6	1,7	1,4	19,8
Alginato	6,2	6,8	1,5	2,1	1,6	1,6	1,7	21,6
Alg-MSCs	7,4	7,2	1,7	2,6	1,6	1,7	1,6	23,8



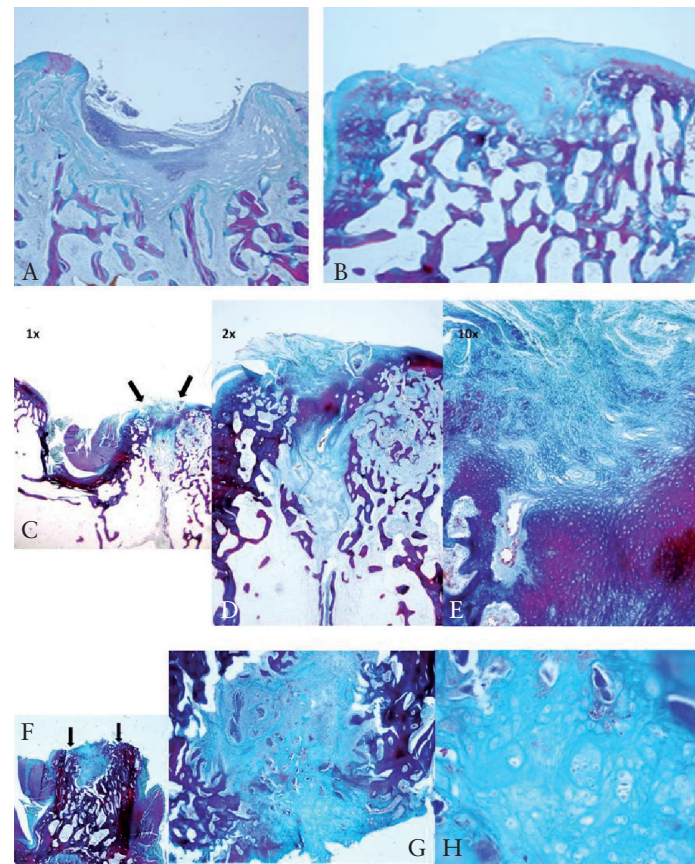
**Tabla 3.** Evaluación microscópica mediante escala de O'Driscoll modificada. Obsérvense los mejores resultados en las muestras con aporte de células pluripotenciales, solo superados por aquellas en las que no se realizó defecto.

al III y el IV. Comparando grupos de estudio, no se obtuvieron resultados significativos en cuanto al resultado global (Tabla 5), pero sí conseguimos una  $p < 0,05$  para determinados apartados a favor del grupo IV respecto al II (estado del hueso subcondral con  $p < 0,045$ ; y celularidad en el defecto, con  $p < 0,042$ ). No hubo diferencias en ningún apartado entre los grupos III y IV. Subjetivamente, la tendencia es a tener resultados mejores en el grupo IV que en el III y que en el II parece concordante con todas las escalas, tanto macro como microscópicas. Esto se tradujo en una correlación lineal positiva, con un coeficiente de Pearson  $> 0,4$  entre ellas.

En la evaluación de la presencia de las células mesenquimales aportadas en la lesión mediante inmunofluorescencia directa, observamos la persistencia de las mismas, aunque no realizamos su cuantificación y determinación si persistían todas las células aportadas (Figura 5).

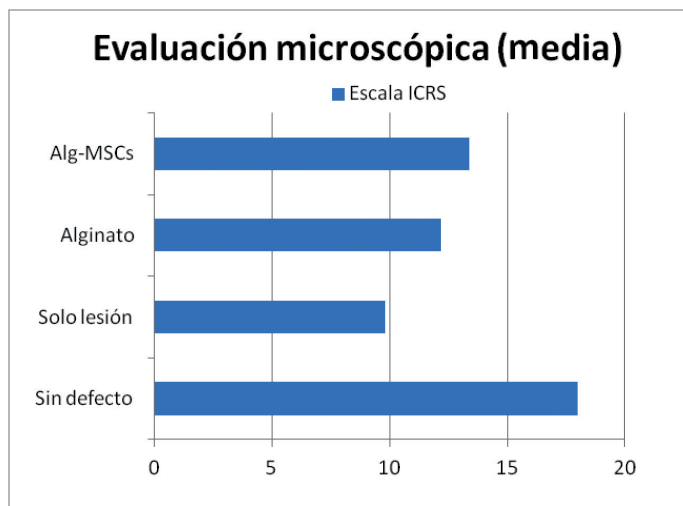
## I Discusión

La reparación del cartílago hialino continúa a día de hoy siendo uno de los desafíos más importantes en el campo de la bioingeniería y los biomateriales [3][8]. El modelo expe-



**Fig. 4.** a, b) MO, Tinción HE. Obsérvense a 2x en el grupo II una lesión en la que solo se objetiva cierta reparación en el fondo de la lesión, sin llegar a superficie. En el grupo III (5b), el aporte de alginato favorece el crecimiento de fibrocartílago sin aparición de nuevo hueso subcondral c, d, e) Imagen de MO. Tinción con HE. Grupo III (defecto con alginato). Cóndilo con defecto (flecha negra), a la izquierda de las flechas escotadura intercondílea. Relleno del defecto con fibrocartílago. En la imagen de aumento 10x se evidencia abundante proliferación fibroblástica con condrocitos que se disponen de manera desordenada. Escasa integración a los bordes del defecto f, g, h) Imagen de MO. Tinción con HE. Grupo IV (defecto con alginato y células). Cóndilo con defecto (flecha negra), a la izquierda de las flechas escotadura intercondílea. Relleno del defecto con tejido de características más parecidas al cartílago hialino. En la imagen de aumento 10x se evidencia la presencia de grupos isogénicos de condrocitos (clusters).

Muestra	Superficie	Matriz	Distribución celular	Viabilidad celular	Hueso subcondral	Cartílago calcificado	Total
Sin defecto	3	3	3	3	3	3	18
Solo lesión	1,8	2	1,7	1,7	1,3	1,3	9,8
Alginato	2,4	2,1	2	2	1,9	1,8	12,2
Alg-MSCs	2,1	2,2	2,5	2,1	2,4	2,1	13,4



**Tabla 4.** Evaluación microscópica mediante la escala de ICRS modificada. Obsérvense escasas diferencias en cuanto a los resultados de cada grupo de experimentación, y el alcance de la máxima puntuación en aquellas en las que no se realizó defecto.

```

. regress ICRStotal G1 G2 G3

```

Source	SS	df	MS	Number of obs = 40			
Model	355.5	3	118.5	F( 3, 36)	= 6.59		
Residual	647.6	36	17.9888889	Prob > F	= 0.0012		
Total	1003.1	39	25.7205128	R-squared	= 0.3544		
				Adj R-squared	= 0.3006		
				Root MSE	= 4.2413		

ICRStotal	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
G1	4.6	1.896781	2.43	0.020	.75315	8.44685
G2	-3.6	1.896781	-1.90	0.066	-7.44685	.24685
G3	-1.2	1.896781	-0.63	0.531	-5.04685	2.64685
_cons	13.4	1.341227	9.99	0.000	10.67987	16.12013

```

. regress ICRStotal G1 G4 G3

```

Source	SS	df	MS	Number of obs = 40			
Model	355.5	3	118.5	F( 3, 36)	= 6.59		
Residual	647.6	36	17.9888889	Prob > F	= 0.0012		
Total	1003.1	39	25.7205128	R-squared	= 0.3544		
				Adj R-squared	= 0.3006		
				Root MSE	= 4.2413		

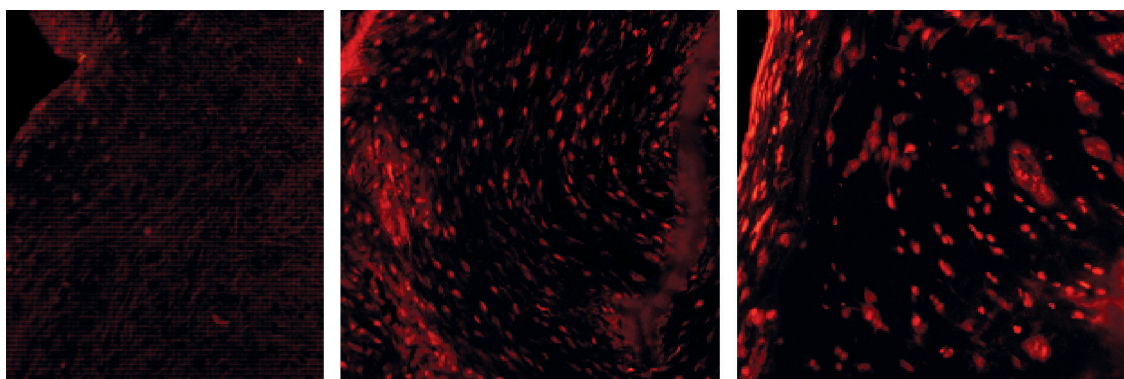
  

ICRStotal	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
G1	8.2	1.896781	4.32	0.000	4.35315	12.04685
G4	3.6	1.896781	1.90	0.066	-.24685	7.44685
G3	2.4	1.896781	1.27	0.214	-1.44685	6.24685
_cons	9.8	1.341227	7.31	0.000	7.079866	12.52013

**Tabla 5.** Estadística respecto a ICRS. La comparación del grupo I siempre ofrece diferencias significativas respecto a los demás grupos, con una  $p < 0.020$ . El grupo IV tiene mejores resultados que el II, con una tendencia a la significación ( $p < 0.066$ ), y diferencias en algunos apartados mencionados en el texto.

rimental utilizado para el presente estudio ha sido ampliamente desarrollado en la última década para evaluar la capacidad reparadora del cartílago *in vivo*. La selección concreta del modelo animal que presentamos, el conejo, se debe principalmente a la amplia experiencia de nuestro grupo de estudio [9][10]. La profundidad del defecto generado es esencial. Diferenciamos defectos condrales de osteocondrales en función de si alcanzan o no el hueso subcondral. Chen *et al.* [11] demostraron que lesiones osteocondrales de profundidad superior a 6 mm no consiguen estímulo suficiente para la regeneración osteocondral. Es por ello que en nuestro diseño experimental utilizamos un trócar manual hueco con un tope de 5 mm, de manera que la profundidad de la lesión nunca excediese los 4-5 mm. Pese a ello, como se demuestra en la Figura 4, alguna reparación no llegó a producirse en defectos en los que no hubo aporte de células alogénicas.

Además del estudio macroscópico, el análisis microscópico es mandatorio. La disponibilidad de microscopio óptico y de tinciones como hematoxilina-eosina, que resultan fáciles de interpretar, baratas y accesibles, nos hizo decantarnos por su utilización. Permite evaluar la celularidad y estructuras del tejido, pero no la presencia o no de células aportadas en el lecho lesional. Por ello, el marcaje de las células mesenquimales con flurocromo nos parece esencial para la tipificación y seguimiento [12]. El marcaje de membrana



**Fig. 5.** Microscopía de fluorescencia. En las muestras sin lesionar, y por tanto sin aporte de células marcadas, no observamos fluorescencia directa del fluorocromo DiI. En aquellas con aporte de células mesenquimales (7a y 7b, grupo IV) se observa celularidad presente en el foco lesional, encontrando mayor concentración de células mesenquimales hacia la superficie de la lesión.

permite identificar la presencia de las células mediante inmunofluorescencia directa.

La selección del alginato como biomaterial transportador para vehiculizar nuestras células mesenquimales viene determinada por la experiencia previa del equipo de estudio, además de por ser este uno de los transportadores más utilizados en bioingeniería relativa a regeneración tisular [13]. Su uso ha demostrado ampliamente la capacidad de regenerar cartílago articular a través de la inducción de genes específicos del mismo [14]. Existe además extensa literatura que defiende su uso por su gran biocompatibilidad y capacidad de portar células y factores de crecimiento, así como su sencillo manejo y manipulación para una mejor adaptabilidad al lecho lesional [15].

La población celular a implantar procedía, según el protocolo inicial, de cresta iliaca autóloga. Dada la dificultad técnica constatada en nuestro laboratorio para la obtención de un aspirado fiable de médula ósea procedente de cresta iliaca en conejos menores de cinco meses de edad, se decidió cambiar tras las tres primeras intervenciones el método de obtención, introduciendo el uso de células progenitoras alogénicas. En individuos de las mismas condiciones de edad, sexo y tamaño, que iban a ser sacrificados, se obtuvo aspirado medular de trocánter mayor y médula ósea femoral, resultando el rendimiento de este aspirado sensiblemente más rentable en cuanto al crecimiento de células mesenquimales, por lo que resultó el método a seguir para la obtención de células hasta el final del estudio. El hecho de seleccionar animales no maduros favorece que el crecimiento celular en los cultivos y que el rendimiento una vez implantado *in situ* sean superiores a los que obtendríamos con animales más maduros [16]. Pese al cambio en el protocolo, no objetivamos ninguna señal de rechazo agudo ni de

actividad inflamatoria del huésped respecto a las células progenitoras alogénicas aportadas, por lo que decidimos continuar con este nuevo procedimiento hasta el final del experimento. Este tipo celular [17] está ampliamente estudiado en la literatura. Yan *et al.* [18] demostraron que ofrece buenos resultados en reparación de defectos osteocondrales (con mayor porcentaje de cartílago hialino), mejores que condrocitos autólogos y que células pluripotenciales heterólogas de cordón umbilical. Así pues, podemos afirmar que la modificación inicial de cambiar células autólogas por alogénicas no ha influido en los resultados globales. Por otro lado, el procedimiento de obtención de las mismas, mediante punción de médula ósea y cultivo, está avalado en la literatura y ofrece cultivos celulares rentables para su uso. Según Nejadnik *et al.* [19], la utilización de células autólogas mesenquimales está lista para ser avalada para uso clínico, ya que ofrece resultados tan buenos como el trasplante de condrocitos con mayores facilidades técnicas. Una limitación de su estudio es que no controlaron ni hicieron diferenciación entre el tamaño y profundidad del defecto, que parece de vital importancia para la regeneración del mismo.

Tay *et al.* [20] demostraron que células mesenquimales alogénicas frente a condrocitos autólogos ofrecen unos resultados superiores en cuanto a regeneración tisular de la superficie articular. Este estudio, con un diseño experimental muy cercano al que nosotros presentamos, utiliza además transportadores de alginato similares a los nuestros en composición y forma de fabricación. Su diseño, con una población menor a la nuestra, lleva a la conclusión de que los resultados con MSCs alogénicas son mejores (aunque no estadísticamente significativos) que aquellos tratados con condrocitos autólogos. Sus resultados coinciden con



los nuestros en la superioridad de la reparación osteocondral en aquellos defectos tratados con aporte de células frente a la regeneración sin aporte exógeno. Existen estudios en humanos que demuestran que el uso de células alogénicas no genera una respuesta inmunomediada, por lo que sus buenos resultados experimentales podrían extrapolarse a resultados clínicos de extremada relevancia [21].

La sencilla manipulación del alginato *in situ* permite que los resultados en cuanto al relleno de la lesión en el grupo III sean mejores que en el grupo II, ya que además este transportador favorece la regeneración cartilaginosa, como hemos mencionado anteriormente. Es por ello que el grupo III presenta también mejores resultados histológicos en cuanto a la celularidad y homogeneidad que el grupo que no presentaba relleno de la lesión.

La adición de células provoca un incremento en la cantidad de cartílago hialino formado en el grupo IV, pero no alcanza la significación estadística respecto al aporte exclusivo de alginato sin células (grupo III). Estos resultados se superponen a los existentes en la literatura, que defienden que el aporte de células en el lecho lesional osteocondral (sean mesenquimales indiferenciadas o condrocitos diferenciados) ofrece datos mejores que aquellos defectos no tratados [20][22]. El grupo de investigación de Dashtar *et al.*, [23] en un diseño similar al nuestro, con una población menor (n=24) obtuvo resultados significativos con  $p < 0,05$  a favor de lesiones con aporte de células mesenquimales frente a las que no fueron tratadas. Sus datos se aproximan a los nuestros y a los presentados por el grupo de Tay *et al.* [20], donde el aporte de células (sean condrocitos o células mesenquimales) supera en resultados histológicos en la escala de O'Driscoll a los defectos sin ningún tipo de tratamiento, y utilizando además el mismo transportador que usamos en nuestro estudio.

El aspecto macroscópico del cartílago, más regular y homogéneo en las rodillas con MSCs, coincide con los datos obtenidos por Dashtar *et al.* [23] y nos hace pensar en una tasa de regeneración superior a la del resto de grupos. No obstante, en ninguno de los artículos preexistentes se sabe con certeza determinar si esa reparación es a expensas de las MSC aportadas, o si simplemente estas inducen en el entorno una respuesta reparativa más potente [20].

La apariencia microscópica de las lesiones sin tratamiento demostró la presencia de fibrosis y escaso relleno celular, sin formación de cartílago. El marcaje con fluorocromo permite valorar la presencia de las células mesenquimales aportadas al defecto, aunque no podemos cuantificarlo con exactitud. Por ello, y pese a ser difícilmente evaluable la presencia de la totalidad de las células mesenquimales ini-

cialmente embebidas en el gel, sí que observamos mayor celularidad (y de forma significativa) en los grupos con aporte de MSC. El grupo de Kamarul *et al.* [24], usando condrocitos directamente (sin transportador) y marcando las células con fluorocromo dye al igual que nosotros, obtiene resultados de regeneración de cartílago hialino superiores a los controles, aunque no puede precisar la persistencia de estas células en el lugar del implante o su migración al lecho perilesional.

En nuestro estudio, las propiedades biomecánicas de rigidez y elasticidad del tejido no han sido estudiadas. Además, no se cuantificó el tipo de colágeno presente en el tejido neoformado. Tanto la evaluación macroscópica como las escalas histológicas utilizadas presentan una elevada correlación, por lo que se les supone un comportamiento similar. La presencia de alginato en el lecho lesional favorece un mejor relleno con mayor celularidad, así como una mejor reparación de la lesión y el cartílago hialino. La modificación introducida al utilizar células mesenquimales alogénicas en lugar de autólogas facilita la experimentación y no supone complicaciones añadidas. Además, el nivel de regeneración tisular fue similar al publicado en otros estudios de literatura existente. El aporte de células mesenquimales vehiculizadas en geles de alginato ofrece mejores resultados en las escalas macroscópicas e histológicas en cuanto a la regeneración tisular que el resto de grupos de estudio, aunque no conseguimos resultados estadísticamente significativos. ■

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schindler OS. Current concepts of articular cartilage repair. *Acta Orthop Belg* 2011; 77:709-26.
2. Panseri S, Russo A, Cunha C, Bondi A, Di Martino A, Pella S, *et al.* Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012; 20:1182-91.
3. Rodríguez-Merchán EC. Regeneration of articular cartilage of the knee. *Rheumatol Int* 2013; 33:837-45.
4. Saha S, Kirkham J, Wood D, Curran S, Yang XB. Informing future cartilage repair strategies: a comparative study of three different human cell types for cartilage tissue engineering. *Cell Tissue Res* 2013; 352:495-507.
5. Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Martino A, Marcacci M. Scaffold-based repair for cartilage healing: a systematic review and technical note. *Arthroscopy* 2013; 29:174-86.
6. Bidarra SJ, Barrias CC, Granja PL. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater* 2013

7. Rutgers M, Van Pelt MJ, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18:12-23.
8. Hasler EM, Herzog W, Wu JZ, Müller W, Wyss U. Articular cartilage biomechanics: theoretical models, material properties, and biosynthetic response. *Crit Rev Biomed Eng* 1999; 27:415-88.
9. Marco F, León C, López-Oliva F, Pérez AJ, Sánchez-Barba A, López-Durán L, et al. Intact articular cartilage cryopreservation. *In vivo* evaluation. *Clin Orthop Relat Res* 1992; 283:11-20.
10. Lópiz-Morales Y, Abarrategi A, Ramos V, Moreno-Vicente C, López-Durán L, et al. *In vivo* comparison of the effects of rhBMP-2 and rhBMP-4 in osteochondral tissue regeneration. *Eur Cell Mater* 2010; 20:367-78.
11. Chen H, Hoemann CD, Sun J, Chevrier A, McKee MD, Shive MS, et al. Depth of subchondral perforation influences the outcome of bone marrow stimulation cartilage repair. *J Orthop Res* 2011; 29:1178-84.
12. Cardone A, López F, Affortunato F, Busco G, Hofer AM, Mallamaci R, et al. An aryleneethynylene fluorophore for cell membrane staining. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1818:2808-17.
13. Olson A, Graver A, Grande D. Scaffolds for articular cartilage repair. *J Long Term Eff Med Implants* 2012; 22:219-27.
14. Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, et al. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 2000; 21:795-801.
15. Gharravi AM, Orazizadeh M, Ansari-Asl K, Banoni S, Izadi S, Hashemitabar M. Design and fabrication of anatomical bioreactor systems containing alginate scaffolds for cartilage tissue engineering. *Avicenna J Med Biotechnol* 2012; 4:65-74.
16. Shimomura K, Ando W, Tateishi K, Nansai R, Fujie H, Hart DA, et al. The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials* 2010; 31:8004-11.
17. Pelttari K, Steck E, Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury* 2008; 39(Suppl 1):S58-65.
18. Yan H, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy* 2007; 23:178-87.
19. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai BC, Lee EH. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med* 2010; 38:1110-6.
20. Tay LX, Ahmad RE, Dashtdar H, Tay KW, Masjuddin T, Ab-Rahim S, et al. Treatment outcomes of alginate-embedded allogenic mesenchymal stem cells versus autologous chondrocytes for the repair of focal articular cartilage defects in a rabbit model. *Am J Sports Med* 2012; 40:83-90.
21. Niemeyer P, Krause U, Kasten P, Kreuz PC, Henle P, Südkam NP, et al. Mesenchymal stem cell-based HLA-independent cell therapy for tissue engineering of bone and cartilage. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006;1:21-7.
22. Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* 2000; 16:571-7.
23. Dashtdar H, Rothan HA, Tay T, Ahmad RE, Ali R, Tay LX, et al. A preliminary study comparing the use of allogenic chondrogenic pre-differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells for the repair of full thickness articular cartilage defects in rabbits. *J Orthop Res* 2011; 29:1336-42.
24. Kamarul T, Selvaratnam L, Masjuddin T, Ab-Rahim S, Ng C, Chan KY, et al. Autologous chondrocyte transplantation in the repair of full-thickness focal cartilage damage in rabbits. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2008; 16:230-6.

---

**Conflicto de intereses**

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.