

---

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

---

**Fernando Marco Martínez**

**Ayudas a la investigación 2011**

## **Investigador principal:**

**Fernando Marco Martínez**

Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología.  
Hospital Clínico San Carlos

# Índice

	Página
1. INTRODUCCIÓN	4
2. HIPÓTESIS	4
3. OBJETIVOS	4
4. MATERIAL Y MÉTODO	5
4.1. Animal de experimentación	5
4.2. Técnica anestésica	5
4.3. Técnica quirúrgica	5
4.4. Grupos de estudio	6
4.5. Compuesto utilizado para la reparación condral. Matriz de alginato	6
4.6. Obtención de células mesenquimales pluripotenciales	6
4.7. Evaluación de la reparación	7
4.7.1. Evaluación macroscópica	7
4.6.2. Evaluación histológica	7
4.8. Estudio estadístico	7
5. RESULTADOS	7
5.1. Complicaciones intra y postoperatorias	7
5.2. Resultados macroscópicos	8
5.3. Resultados microscópicos	10
6. DISCUSIÓN	10
6.1. Diseño experimental	10

## 1. 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.

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.

Existen estudios en la literatura médica donde se han observado los fenómenos reparativos de lesiones condrales, 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 consenso, dada la amplia variedad de células empleadas, es en el origen de las mismas.

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. 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 demostrada sus propiedades biocompatibilidad y biodegradabilidad.

## 2. HIPÓTESIS

Si sabemos que osteocitos autólogos rodeados de matriz extracelular y manteniendo aporte vascular, son capaces de regenerar hueso, aparecerán por tanto en lesiones osteocondrales para reparar el tejido óseo de la lesión. Si condrocitos en un medio que remeda in vitro el medio extracelular son capaces de proliferar, entendemos que proliferarán para cubrir la región condral de la lesión. Si las células mesenquimales pluripotenciales son células progenitoras de ambos tipos celulares, y conseguimos embeberlas en algún medio o matriz que las mantenga viables y localizadas en el lugar de la lesión, los factores de crecimiento en los que están inmersas favorecerán en primer lugar y en profundidad la formación de hueso subcondral sano, y en segundo lugar y en superficie, la aparición de cartílago articular de características similares al que sustituyen. Si las células mesenquimales permanecen en la zona del defecto, o por el contrario, se diferencian a otra estirpe celular y migran, todavía está por demostrar. Si conseguimos utilizar vehículos para estas células que sean buenos transportadores, porosos y con gran adhesión celular, conseguiremos regenerar un cartílago articular que se imbrique con el tejido sano que lo rodea.

## 3. OBJETIVOS

Por tanto, el objetivo de este estudio es evaluar y analizar la capacidad de reparación de una población de células mesenquimales pluripotenciales autólogas embebidas en un vehículo determinado para favorecer la restauración completa de lesiones osteocondrales generadas en un modelo experimental.

Los objetivos concretos de este estudio son:

1. Evaluar el comportamiento de geles de alginato generados en nuestro laboratorio como matrices transportadoras.
2. Valorar el aporte de células mesenquimales, para que, combinadas con un ambiente favorecedor de su diferenciación, estimulen la formación de tejido articular.
3. Evaluar la presencia de esas células aportadas en el cartílago reparado, en caso de existir dicha reparación.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se han intervenido un total de 40 rodillas procentes 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 2500 y 4500 gramos.

Permanecieron en el estabulario del Hospital Clínico San Carlos, en jaulas metálicas individuales de 4 m<sup>2</sup> de superficie durante 60 días tras la intervención. No existió ninguna restricción a su movimiento salvo la derivada de la propia estabulación, recibiendo comida y bebida diarias a razón de 40-50 g/kg peso y 80 ml respectivamente. La temperatura ambiental se mantuvo constante alrededor de los 23° C, con una humedad relativa de entre 40 y 50%.

### 4.2. TÉCNICA ANESTÉSICA

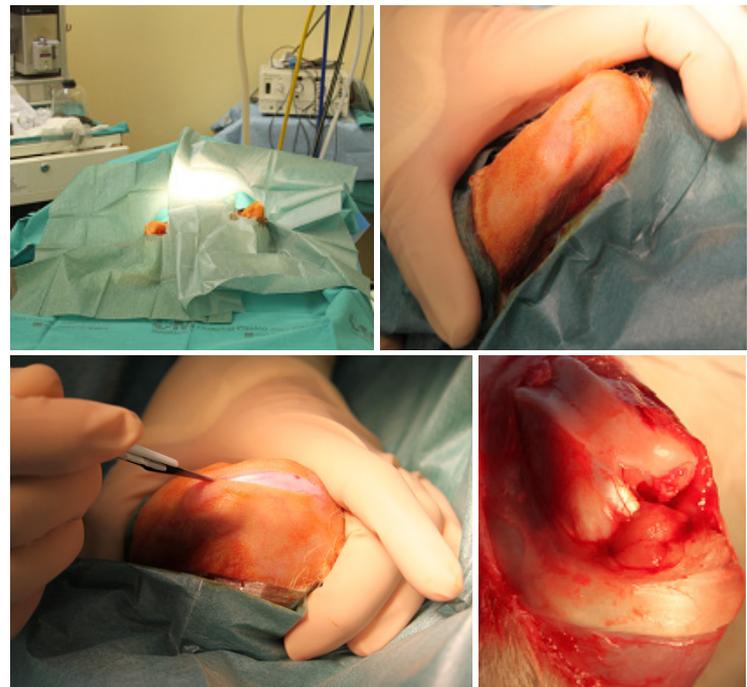
Los animales son inicialmente sedoanalgesiados y posteriormente afeitados y preparados de manera estéril, con 3 lavados con povidona yodada consecutivos (Figura 1). Seguidamente son anestesiados por un Veterinario Facultativo, según un protocolo estandarizado y aprobado por el comité de ética y deontología mediante inyección intramuscular de xilazina (Rompum®) (3mg/kg), sulfato de ketamina (Ketolar®) (80mg/kg) y atropina (atropina Braun®) (1mg/kg).



**Figura 1.** Tras ser adecuadamente sedoanalgesiado, las rodillas del conejo son posteriormente afeitadas (a) y seguidamente preparadas de manera estéril (b y c) con tres lavados consecutivos de povidona yodada.

### 4.3. TÉCNICA QUIRÚRGICA

Durante el procedimiento quirúrgico se administra una dosis profiláctica de Cefazolina de 250 mg (kefo®). Se realiza un abordaje anterior directo sobre la rodilla del conejo. La artrotomía se realiza mediante una incisión pararrotuliana medial, desde el polo superior de la rótula proximalmente, extendiéndose distalmente hasta la tuberosidad tibial anterior, y luxando la rótula lateralmente. La flexión de la rodilla permite entonces una exposición exhaustiva de los cóndilos femorales y la superficie articular. Meniscos y ligamentos se preservan íntegros (Figura 2).



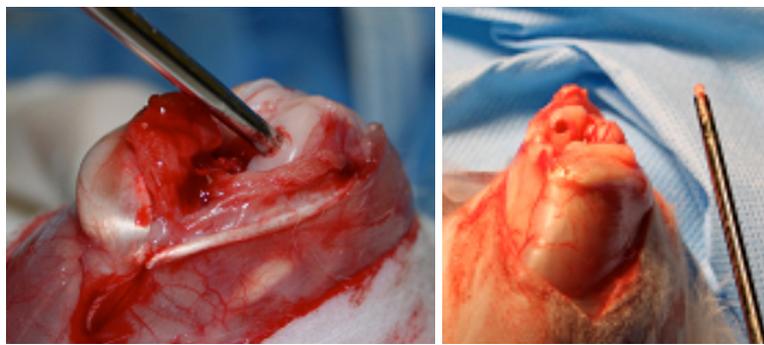
**Figura 2.** Tras disponer el campo quirúrgico estéril (a) y realizar la exposición superficial de la rodilla (b y c), se realiza la artrotomía, consiguiendo al flexionar una buena exposición de los cóndilos femorales (d). Notese el tendón extensor común sobre el cóndilo externo.

Procurando el máximo respeto al cartílago articular, se realiza un defecto osteocondral de 4 mm de ancho y 5 mm de profundidad, en el área de máxima carga del cóndilo femoral interno mediante un taladro manual (donación de Kyphon®, instrumentación para cifoplastias) en el cóndilo femoral interno para evitar el tendón extensor común, presente en el conejo, como demuestra la Figura 3. Tras la realización del defecto se procederá a su relleno como se detalla a continuación en los grupos de estudio.

Tras el lavado profuso con suero fisiológico de la articulación, se procede al cierre de la artrotomía en dos planos tras la reducción de la luxación rotuliana. Primero se sutura el tendón con sutura reabsorbible tipo vicryl 3/0, y seguidamente la piel con sutura reabsorbible vicryl 2/0.

Se comprueba con el animal aun anestesiado el correcto recorrido de la rotula y la movilidad completa de la articulación, así como la resistencia de la sutura realizada.

Una vez finalizado, el veterinario facultativo despierta al animal, mientras se registran todas las incidencias y hallazgos, así como la técnica empleada.



**Figura 3.** Utilizando un taladro manual con tope se realiza el defecto osteocondral.

#### Postoperatorio

Una vez comprobado el buen estado general del animal, se devuelve a sus jaulas individuales. Durante los primeros siete días tras la intervención quirúrgica se les administra de manera profiláctica Cefazolina 250 mg/ día, además de Paracetamol 200 mg/ día para control algésico. No existió limitación para el movimiento ni la carga, dentro las limitaciones de la estabulación.

#### Sacrificio

Los conejos se sacrificaron a las 8 semanas de la intervención quirúrgica 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. Para reconocer y confirmar la muerte del animal se comprobó el cese de la respiración y del latido cardíaco mediante palpación y auscultación con fonendoscopio, así como la ausencia de reflejos.

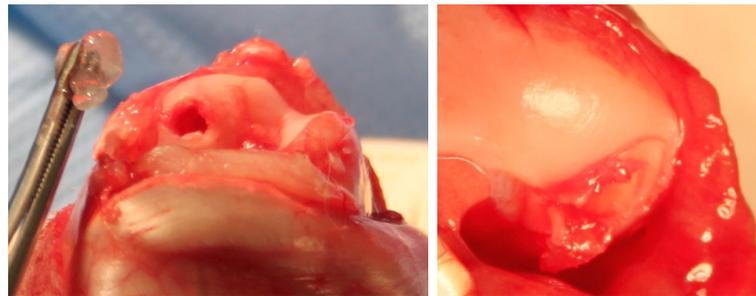
Una vez sacrificado el conejo, se extraen ambos cóndilos femorales en una única pieza, mediante osteotomía supracondílea practicada con cizalla.

#### 4.4. GRUPOS DE ESTUDIO

- Grupo I: Animales sin lesionar (n=10).
- Grupo II: Animales sin reparación (n=10).
- Grupo III: Animales con reparación (Gel de alginato) (n=10).
- Grupo IV: Animales con reparación (Gel de alginato +MSCs) (n=10).

En función del grupo y estado del experimento en el que nos encontremos, actuaremos de tres modos diferentes en cuanto al defecto creado.

- Grupo I: Rodillas control. En ellas no se practicará ningún tipo de lesión.
- Grupo II: Rodillas única y exclusivamente lesionadas, sin aportar nada en el defecto.
- Grupo III: Rodillas en las que introduciremos el transportador de Alginato, gelificado justo en el momento de su introducción en un tubo de Eppendorf estéril (Figura 4).
- Grupo IV: Rodillas en las que introduciremos el transportador de alginato al que, en el proceso de gelificación, se le han añadido las células mesenquimales pluripotenciales previamente extraídas del conejo.



**Figura 4.** Aporte de matriz de alginato gelificada in situ al defecto osteocondral. Véase a gran aumento la continuidad de la convexidad del cóndilo femoral tras su relleno con dicha matriz cubriendo el defecto hasta su superficie.

#### 4.5. COMPUESTO UTILIZADO PARA LA REPARACIÓN CONDRALE. MATRIZ DE ALGINATO

Como ya hemos mencionado, en el supuesto caso de aportar matrices transportadoras, utilizamos matrices de Alginato. Para la preparación de geles de alginato se utilizaron diluciones de alginato sódico (sal sódica de ácido alginico, 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.

#### 4.6. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES PLURIPOTENCIALES

Se obtuvieron mediante dos métodos:

Mediante abordaje percutáneo sobre cresta iliaca y/o trocánter mayor, se realiza punción-aspiración de médula ósea para la obtención de células mesenquimales pluripotenciales en conejos menores de 5 meses de edad. Un pequeño trócar (Kyphon®) se introduce en la cresta y a través de este con una jeringa de 20 ml que contiene 0.5 ml de heparina (para prevenir la coagulación), se aspira un volumen de 8-10 ml de médula ósea

- a) En individuos de las mismas condiciones de edad, sexo y tamaño, que iban a ser sacrificados, se ha obtenido aspirado medular de trocánter mayor y médula ósea femoral.

Una vez recogida la médula ósea, ésta se añade inmediatamente después a 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 centrifugan para sedimentar las células. Se suspenden y depositan 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 recoge, se lava con medio control y se distribuye uniformemente en placas de cultivo (100 mm de diámetro) para su separación selectiva basada en la adherencia celular. Las MSCs se cultivan en medio control a 37 °C en una atmósfera húmeda con 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>.

Cuando los cultivos llegan a la confluencia, unas dos o tres semanas después de la obtención, las células se levantan con tripsina al 0.25% más 1mM EDTA durante 5 minutos a 37°C. Seguidamente, son marcadas con fluorocromo Dil 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.

Una vez embebidas en el gel (matriz de alginato), este es aportado como se mencionó anteriormente a los defectos generados en los animales correspondientes.

## 4.7. EVALUACIÓN DE LA REPARACIÓN

### 4.7.1. Evaluación macroscópica

El aspecto macroscópico de la rodilla se evaluó de acuerdo descrita por Moran (Moran ME et al. 1992). Figura 5. Esta escala incluye parámetros tales como: adherencias intraarticulares, restauración de la superficie articular, erosiones y aspecto del cartilago. Para cada parámetro se anota su puntuación, tras lo cual la rodilla se fotografía.

Escala de puntuación para valoración histológica	
Característica	Puntuación
Ninguna	2
Mínimas / tejido fibroso fino	1
Mayores / tejido fibroso denso	0
<b>Restauración de la superficie articular</b>	
Completa	2
Parcial	1
No restauración	0
<b>Erosión del cartilago</b>	
Ninguna	2
Defecto / bordes	1
Defecto y cartilago adyacente	0
<b>Apariencia del cartilago</b>	
Traslúcido	2
Opaco	1
Decolorado e irregular	0

Figura 5. Evaluación macroscópica (Moran et al).

### 4.6.2. Evaluación histológica

Las muestras macroscópicas son fijadas con formol, y tratadas para decalcificarlas. Una vez conseguido, se embeben en parafina y se realizan secciones con micrótopo de 4µm de espesor, que son teñidas con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

El análisis histológico se realiza por un observador ciego que utiliza dos escalas de puntuación: una modificación de la escala de puntuación O'Driscoll (Frenkel, et al. 2005) y la escala *International Cartilage Repair Society* (ICRS) (Mainil-Varlet, et al. 2003). Las imágenes se obtienen con un microscopio Leica.

**Seguimiento de las MSCs.** La identificación de las MSCs embebidas en los geles de alginato se realiza, por observación de cortes histológicos bajo microscopio de fluorescencia, ya que las células fueron inicialmente marcadas con fluorocromo Dil. Así seremos capaces de tipificar cuantas células de las inicialmente aportadas permanecen en la zona del defecto, y no migraron ni murieron durante su tratamiento y posterior implantación.

## 4.8. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se describirán 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 comprobará la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastará la hipótesis de homogeneidad de varianzas.

En todas las comparaciones de hipótesis se rechazará la hipótesis nula con un error de tipo I o error alfa menor a 0.05.

Los paquetes estadísticos utilizados serán SPSS para Windows versión 15.0.

Para comparar las variables cualitativas y cuantitativas de ambos grupos de estudio utilizaremos técnicas de *Anova*, *U de Mann-Whitney* en condiciones no normales, y *t de Student* en condiciones normales. Una  $p < 0,05$  será considerada como significativa en todos los casos. Curvas de Kaplan Meier de análisis de supervivencia se utilizarán para comparar la mejoría entre casos y controles.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. COMPLICACIONES INTRA Y POSTOPERATORIAS

Se produjo el fallecimiento de uno de los animales, por mala ventilación durante el acto quirúrgico lo que impidió completar la realización del procedimiento, motivo por el que se repitió la intervención. En el resto de los animales intervenidos no aparecieron complicaciones intraoperatorias ni postoperatorias.

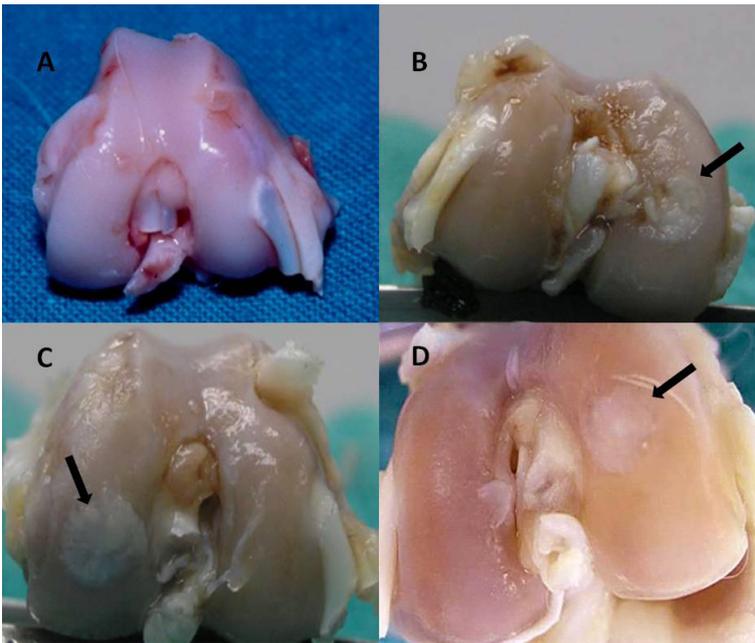
## 5.2. RESULTADOS MACROSCÓPICOS

A los 2 meses de la cirugía la evaluación macroscópica pone de manifiesto diferencias en cuanto al aporte o no de MSCs. Las rodillas en las que se aportaron MSCs muestran una regeneración en la zona del defecto visualmente mayor, con aspecto más vitalizado del cartilago hialino (Figura 6), se ha observado en algunos de estos casos una proliferación osteocartilaginosa macroscópicamente florida (Figura 7). No ha habido ningún caso en el que se haya registrado proceso infeccioso o inmunitario susceptible de ser tipificado como rechazo al material aportado.

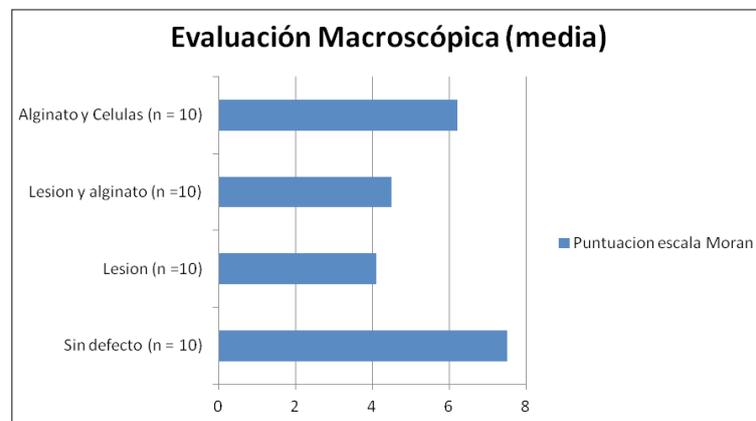
Se evaluaron por separado también otras características de la articulación como:

- Estabilidad articular: el abordaje parapatelar interno supone la creación de un punto de debilidad en la articulación, al no existir la inmovilización postoperatoria hay que considerar la posibilidad de una luxación rotuliana. En estas cuatro grupos encontramos un caso de luxación rotuliana externa.
- Características del líquido sinovial: la irritación articular produce, como traducción de los cambios morfológicos sinoviales (engrosamiento o fibrosis) exceso o ausencia de líquido sinovial. Asimismo ante la presencia de un proceso infeccioso este líquido puede ser de aspecto purulento. El líquido articular fue normal en cantidad y aspecto en todas las muestras salvo en tres casos en los que la cantidad y viscosidad del mismo se encontraban incrementados sin presentar aspecto infeccioso. No obstante se enviaron muestras a estudio microbiológico resultando negativas.

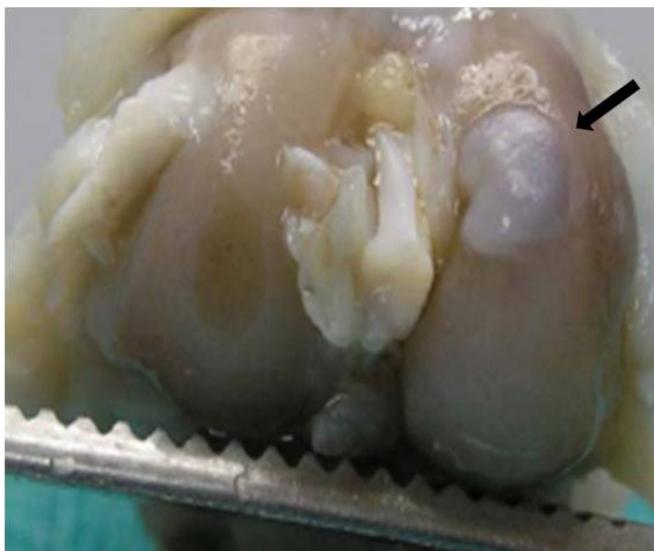
La puntuación media obtenida para cada uno de los cuatro grupos en la escala de valoración macroscópica, cuya puntuación máxima es de 8 puntos, se encuentra recogida en la figura 8. Excluyendo las rodillas en las que no se realizó defecto, los tratados con alginato y aporte de células presentaron una puntuación estadísticamente superior a los defectos vacíos ( $P=0,02$ ) y los tratados con alginato aunque en estos últimos no se obtuvo significación estadística



**Figura 6.** 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.



**Figura 8.** Escala de Moran. Puntuación media obtenida para cada uno de los grupos.



**Figura 7.** Aspecto macroscópico grupo IV: proliferación osteocartilaginosa.

La puntuación obtenida en dicha escala para cada uno de los parámetros valorados y según el grupo de estudio se recoge en las tablas 1,2,3,4 que se muestran a continuación:

**Tabla 1.** Puntuación en la escala de Moran. Grupo I (ausencia de defecto).

MUESTRA	Adherencias	Restauración	Erosión	Apariencia	TOTAL
Sin defecto	2	2	2	2	8
Sin defecto	1	2	2	2	7
Sin defecto	1	2	2	2	7
Sin defecto	1	2	2	2	7
Sin defecto	1	2	2	2	7
Sin defecto	2	2	2	2	8
Sin defecto	2	2	2	2	8
Sin defecto	1	2	2	2	7
Sin defecto	2	2	2	2	8
Sin defecto	2	2	2	2	8
					<b>MEDIA</b>
n = 10					<b>7,5</b>

**Tabla 2.** Puntuación en la escala de Moran. Grupo II (defecto)

MUESTRA	Adherencias	Restauración	Erosión	Apariencia	TOTAL
Lesion	1	1	0	0	2
Lesion	0	1	1	1	3
Lesion	1	1	2	0	4
Lesion	2	1	1	1	5
Lesion	2	1	1	1	5
Lesion	1	0	0	0	1
Lesion	2	1	1	1	5
Lesion	1	2	2	1	6
Lesion	2	1	1	1	5
Lesion	1	1	2	1	5
					<b>MEDIA</b>
n = 10					<b>4,1</b>

**Tabla 3.** Puntuación en la escala de Moran. Grupo III (Transportador: Alginato).

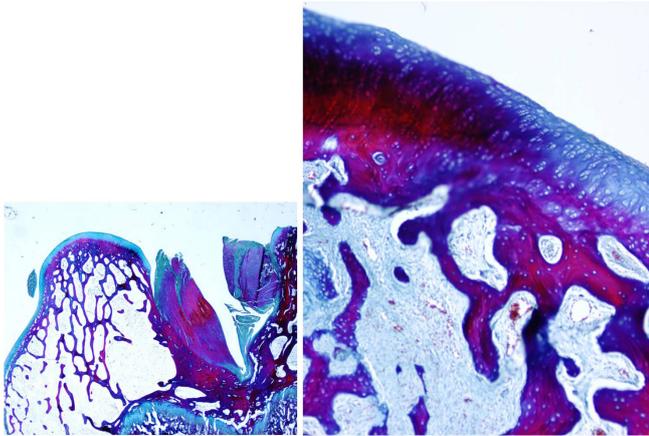
MUESTRA	Adherencias	Restauración	Erosión	Apariencia	TOTAL
Alginato	1	1	0	2	4
Alginato	1	1	2	0	4
Alginato	1	1	1	1	4
Alginato	2	1	1	1	5
Alginato	0	2	2	1	5
Alginato	0	0	0	0	0
Alginato	1	2	2	2	7
Alginato	1	2	1	1	5
Alginato	1	1	2	1	5
Alginato	1	1	2	1	5
					<b>MEDIA</b>
n=10					<b>4,4</b>

**Tabla 4.** Puntuación en la escala de Moran. Grupo III (transportador y células).

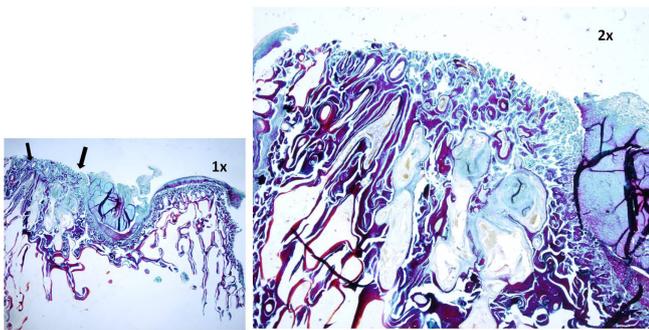
MUESTRA	Adherencias	Restauración	Erosión	Apariencia	TOTAL
Alginato y Células	2	1	1	1	5
Alginato y Células	1	1	2	2	6
Alginato y Células	1	1	2	1	5
Alginato y Células	1	2	2	1	6
Alginato y Células	1	1	2	1	5
Alginato y Células	2	1	2	2	7
Alginato y Células	2	1	2	2	7
Alginato y Células	1	1	2	1	5
Alginato y Células	2	2	2	2	8
Alginato y Células	2	2	2	2	8
					<b>MEDIA</b>
n = 10					<b>6,2</b>

### 5.3. RESULTADOS MICROSCÓPICOS

Algunas de las imágenes más representativas del estudio con microscopía óptica de cada uno de los grupos de estudio se encuentran recogidas en las siguientes figuras:



**Figura 9.** Imagen de MO. Tinción con HE. Grupo I. Cóndilos sin defecto. Cartílago Hialino.

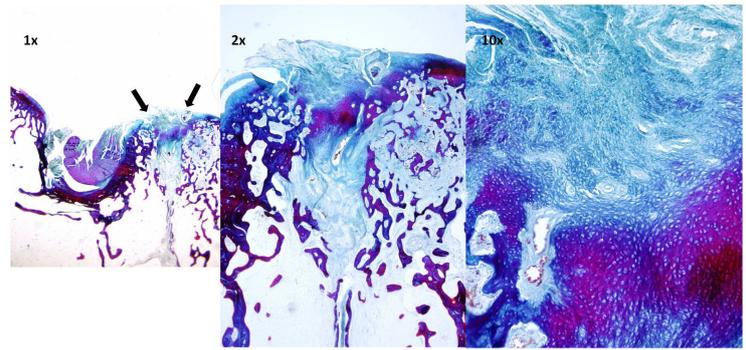


**Figura 10.** Imagen de MO. Tinción con HE. Grupo II (defecto sin tratar). Cóndilo con defecto (Flecha negra), a la derecha de las flechas escotadura intercondílea. Ausencia de reparación de cartílago hialino con incremento en la proliferación de hueso subcondral.

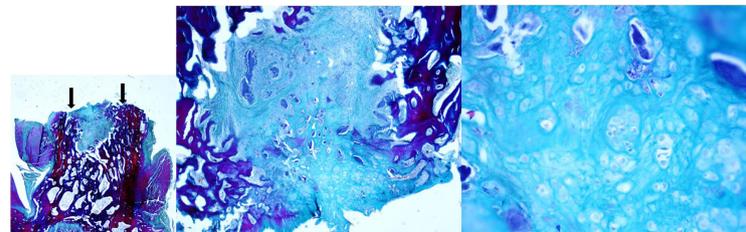
## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Dada la dificultad técnica, constatada en nuestro laboratorio, para la obtención de un aspirado fiable de médula ósea procedente de cresta ilíaca en conejos menores de 5 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



**Figura 11.** 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.



**Figura 12.** 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).

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.