



INGENIERÍA TISULAR DEL CARTÍLAGO EMPLEANDO CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES SOBRE SOPORTES DE COL I

Cartilage Tissue Engineering using mesenchymal
stromal cells on Col I scaffolds

Curso 2015/16
Febrero/2016

Antonio Compañ Parodi



FACULTAD DE CIENCIAS

Curso 2015/16

Trabajo Fin de Máster

Ingeniería Tisular del cartílago empleando células mesenquimales estromales sobre soportes de Col I

Cartilage Tissue Engeenering using mesenchymal stromal
cells on Col I scaffolds



Antonio Compañ Parodi

Ingeniería Tisular del cartílago empleando células mesenquimales estromales y soportes de Col I

D. Isaac Fuentes Boquete, coordinador del Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa (TCMR) de la Universidad de A Coruña y **Dña. Silvia M^a Díaz Prado**, profesora del Área de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Medicina de la Universidad de A Coruña.

CERTIFICAN:

Que **D. Antonio Compañ Parodi**, Licenciado en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo: **“INGENIERÍA TISULAR DEL CARTÍLAGO EMPLEANDO CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES Y SOPORTES DE COL I”**.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al título del Máster en Biotecnología Avanzada.

D. Isaac Fuentes Boquete

Dña. Silvia M^a Díaz Prado

En A Coruña, 1 de Febrero de 2016

ÍNDICE

1. LISTADO DE ABREVIATURAS	VIII
2. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	X
3. RESUMEN	XIV
4. INTRODUCCIÓN	1
4.1 El cartílago articular	1
4.1.1 Estructura	1
4.1.2 Composición y características	2
4.1.3 Función del cartílago articular	4
4.1.4 Integridad del cartílago	4
4.2 Artrosis	5
4.2.1 Prevalencia	6
4.2.2 Tratamientos	6
4.2.2.1 Farmacológico	6
4.2.2.2 Terapia celular	7
4.3 Ingeniería Tisular	8
4.3.1 Células	9
4.3.2 Factores de crecimiento	9
4.3.3 Biomateriales	10
4.3.3.1 Biomateriales de colágeno	12
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo General	13
5.2 Objetivos específicos	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15

6.1 Obtención de muestras y aislamiento de células mesenquimales estromales	15
6.1.1 Obtención de muestras	15
6.1.2 Extracción del conjunto celular presente en la médula ósea	15
6.1.3 Cultivo y subcultivo celular	16
6.1.4 <i>Preplating</i>	17
6.1.5 Estudio de la multipotencialidad de las células mesenquimales estromales	17
6.1.5.1 Diferenciación adipogénica	18
6.1.5.2 Diferenciación osteogénica	18
6.1.5.3 Diferenciación condrogénica	18
6.1.6 Siembra y cultivo del conjunto celular sobre los soportes de colágeno	19
6.2 Desarrollo del modelo de reparación de lesiones focales de cartílago articular humano empleando constructos condrogénicos	19
6.2.1 Obtención de las células mesenquimales estromales.	19
6.2.2 Obtención de las biopsias de cartílago humano	20
6.2.3 Introducción del biomaterial con células en la lesión del modelo de reparación de cartílago	21
6.2.4 Cultivo del modelo de reparación de cartílago humano y diferenciación Condrogénica	21
6.3 Análisis histológico y citológico	22
6.3.1 Valoración de la diferenciación multilínea del conjunto celular	22
6.3.1.1 Diferenciación adipogénica	22
6.3.1.2 Diferenciación osteogénica	22
6.3.1.3 Diferenciación condrogénica	22
6.3.2 Diferenciación condrogénica de las CME's-MO _h sobre biomateriales	23
6.3.2.1 Tinciones histológicas e inmunohistoquímicas	23
6.3.3 Diferenciación condrogénica de las CME's-MO _h en el modelo de reparación de cartílago	23
6.3.3.1 Análisis histológico e inmunohistoquímico del tejido de reparación obtenido en los modelos <i>in vitro</i> de reparación de cartílago	23

6.3.3.2 Análisis morfométrico del tejido de reparación obtenido en los modelos <i>in vitro</i> de reparación de cartílago	23
7. RESULTADOS	25
7.1 Conjunto celular aislado	25
7.1.1 Caracterización morfológica	25
7.1.2 Diferenciación multilínea <i>in vitro</i> del conjunto celular aislado	25
7.1.2.1 Adipogénesis	25
7.1.2.2 Osteogénesis	26
7.1.2.3 Condrogénesis	26
7.1.3 Diferenciación condrogénica del conjunto celular sobre biomateriales.	28
7.1.3.1 Crecimiento del conjunto celular sobre el biomaterial colágeno tipo I	28
7.1.3.2 Análisis citológico e histológico del biomaterial de colágeno tipo I con células	28
7.1.3.3 Análisis inmunohistoquímico del biomaterial de colágeno tipo I con células	31
7.2 Desarrollo del modelo de reparación de lesiones focales de cartílago articular humano empleando constructos condrogénicos	33
7.2.1 Análisis citológico e histológico del modelo de reparación <i>in vitro</i> de cartílago articular humano	33
7.2.2 Análisis inmunohistoquímico del modelo de reparación <i>in vitro</i> de cartílago articular humano	35
7.2.3 Análisis morfométrico del neot Tejido obtenido en los modelos <i>in vitro</i> de reparación de cartílago	36
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	45
10. BIBLIOGRAFÍA	47
11. AGRADECIMIENTOS	53

12. ANEXOS	55
12.1 Consentimiento informado para el paciente	55

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

μm	Micrómetro
<i>ACI</i>	<i>Autologous Chondrocyte Implantation</i>
AG	Agrecano
AH	Ácido hialurónico
AT	Azul de Toluidina
<i>BMP</i>	<i>Bone Morphogenetic protein</i>
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CHUAC	Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña
cm^2	Centímetro cuadrado
CMEs	Células Mesenquimales Estromales
CMEs-MOh	Células Mesenquimales Estromales de Médula Ósea Humana
Col I	Colágeno tipo I
Col II	Colágeno tipo II
Col X	Colágeno tipo X
Col	Colágeno
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
FAME'S	Fármacos modificadores de la enfermedad
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAGs	Glucosaminoglucanos
H-E	Hematoxilina-Eosina
<i>ICRS</i>	<i>International Cartilage Repair Society</i>
INIBIC	Instituto de Investigación Biomédica de Coruña

<i>IGF</i>	<i>Insulin Growth Factor</i>
<i>iPS</i>	<i>Induced Pluripotent Stem cells</i>
<i>ISCT</i>	<i>International Society for Cellular Therapies</i>
IT	Ingeniería Tisular
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MMP-13	<i>Matrix Metalloproteinase 13</i>
MO	Médula Ósea
ng	Nanogramos
<i>OA</i>	<i>Osteoarthritis</i>
P/E	Penicilina/Estreptomicina
<i>PCNA</i>	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PG	Proteoglicanos
r.p.m.	Revoluciones por minuto
<i>ROS</i>	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SBF	Suero Bovino Fetal
SO	Safranina O
SO-FG	Safranina O <i>Fast Green</i>
t	Tiempo
<i>TGF-β</i>	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TM	Tricrómico de Masson
VK	Von Kossa

2. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1:** Representación de las diversas capas que forman la estructura del cartílago articular. Tomada y modificada de Buckwalter y Martin (1995) 1
- Figura 2:** Histología del condrocito y de la MEC que lo rodea. Tomada y modificada de www.uaz.edu.mx 2
- Figura 3:** Disposición del cartílago articular normal frente a un cartílago con patología artrósica. Tomada y modificada de <https://animalfisioblog.files.wordpress.com/2012/05/28-05-2012-190826-2.jpg> 5
- Figura 4 :** Técnicas quirúrgicas para el tratamiento de la OA. En la Figura 4A se observa la translocación de los discos osteocondrales de una zona poco comprometida con la carga a la zona afectada. En la Figura 4B, técnica ACI donde (I.B) se obtienen los explantes para el aislamiento y posterior expansión de los condrocitos (II.B) se prepara el periostio para (III.B) el sellado y (IV.B) se inyecta la población de condrocitos. Tomadas y modificadas de <http://rodillalaser.com/es/rodillas/10-la-artriosis> y Ferruzzi *et al.* (2008) 8
- Figura 5:** Representación esquemática del potencial multilínea de las células mesenquimales estromales. Tomada y modificada de <http://www.york.ac.uk/res/bonefromblood/background/osteogenesis> 9
- Figura 6:** Detalle esquemático de un constructo de IT. Se pueden observar los componentes que participan: células, biomateriales y factores de crecimiento. Tomada y modificada de Vinatier *et al.* (2009) 12
- Figura 7:** Extracción del conjunto celular presente en la MO. A) Sujeción de la cabeza femoral. B) Introducción de medio DMEM 5% para la extracción de las células. C) Inyección del medio de cultivo en la MO. D) Filtración de la suspensión recogida. 16

Figura 8: Obtención de las biopsias y realización de la lesión. A) Obtención de las biopsias de cartílago. B) Obtención del biomaterial de Col I. C) Detalle del tamaño final de la biopsia. D) Realización de la lesión con la fresa odontológica	20
Figura 9: Siembra del conjunto celular sobre el biomaterial y cultivo del modelo de reparación. A) Siembra de las células sobre el biomaterial de Col I. B) y C) Una vez el biomaterial está listo, se introduce en la lesión. D) Cultivo del modelo de reparación.	21
Figura 10: Imagen tomada en un microscopio invertido del conjunto celular aislado. Magnificación 10x.	25
Figura 11: Tinción <i>Oil-Red-O</i> de las células estimuladas (A) (++) y de las células sin estimular cultivadas en <i>DMEM</i> 20 % (B) (-). Magnificación 10x.	26
Figura 12: Tinción Rojo alizarina de células estimuladas (A) (+++) y de las células sin estimular cultivadas en <i>DMEM</i> 20 % (B) (+/-). Magnificación 10x.	26
Figura 13: Tinción de las micromasas con H-E (A-C), SO (D-F) y TM (G-I). Tinciones control (A, D, G). Tinciones estimuladas (B, C, E, F, H, I). Magnificación 10x	27
Figura 14: Biomateriales de Col I en medio condrogénico a t=0. En la imagen se muestran diferentes réplicas del cultivo de CMEs sobre los soportes.	28
Figura 15: Biomateriales de Col I en medio condrogénico a t=16. En la imagen se muestra tanto el biomaterial inmerso en medio condrogénico, como en ausencia de él.	28
Figura 16: Tinción con H-E del biomaterial Col I con células. Magnificación 20x	28
Figura 17: Tinción con TM del biomaterial Col I con células. Magnificación 20x	29
Figura 18: Tinción con AT del biomaterial Col I con células. Magnificación 20x	30

Figura 19: Tinción con SO del biomaterial Col I con células. Magnificación 20x	30
Figura 20: Tinción con VK del biomaterial Col I con células. Magnificación 20x	30
Figura 21: Tinción inmunohistoquímica para la detección de Col I en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.	31
Figura 22: Tinción inmunohistoquímica para la detección de Col II en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x	31
Figura 23: Tinción inmunohistoquímica para la detección de Col X en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.	32
Figura 24: Tinción inmunohistoquímica para la detección de MMP-13 en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.	32
Figura 25: Tinción inmunohistoquímica para la detección de AG en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.	32
Figura 26: Tinción inmunohistoquímica para la detección de PCNA en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.	33
Figura 27: Tinción H-E del modelo de reparación <i>in vitro</i> de lesión del cartílago articular humano tras el implante del conjunto celular junto al biomaterial de Col I. Magnificación 2x (A). Detalle de la misma lesión. Magnificación 4x para observar sus características (B) y de la MEC sintetizada. Magnificación 10x (C).	34
Figura 28: Tinción SO del modelo de reparación <i>in vitro</i> de lesión del cartílago articular humano tras el implante del conjunto celular junto al biomaterial de Col I. Magnificación 4x.	34

Figura 29: Tinción SO-FG del modelo de reparación <i>in vitro</i> de lesión del cartílago articular humano tras el implante del conjunto celular junto al biomaterial de Col I. Magnificación 4x.	35
Figura 30: Tinción inmunohistoquímica para la detección de Col I (A) y Col II (B) del modelo de reparación <i>in vitro</i> de lesión del cartílago articular humano tras el implante de CMEs-MOH junto al biomaterial de Col I. Magnificación 4x.	35
Figura 31: Tinción inmunohistoquímica para la detección de AG del modelo de reparación <i>in vitro</i> de lesión del cartílago articular humano tras el implante de CMEs-MOH junto al biomaterial de Col I. Magnificación 4x.	36
Tabla I: Tabla con los diferentes tipos de colágeno presentes en el cartílago articular junto a sus funciones. Tomada y modificada de Bhosale y Richardson (2008)	3
Tabla II: Escala <i>ICRS II</i> modificada con los parámetros estudiados y sus características a valorar	24
Tabla III: Resultados de la valoración cualitativa de las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas del biomaterial Col I con células. (-) Ausencia, (+) Levemente positivo o presencia débil, (++) Moderadamente positivo, (+++) Muy positivo o presencia fuerte	29
Tabla IV: Resultados de la valoración <i>ICRS II</i> modificada del modelo de reparación <i>in vitro</i> de lesión de cartílago articular humano	37

3. RESUMEN

OBJETIVO: Desarrollar un modelo *in vitro* de reparación de lesiones de cartílago articular humano basado en la capacidad de diferenciación condrogénica de las células mesenquimales estromales aisladas de médula ósea humana (CMEs-MOh) cultivadas sobre soportes de colágeno tipo I (Col I).

METODOLOGÍA: Se aislaron CMEs-MOh a partir de biopsias de cadera. Estas células se caracterizaron morfológicamente y funcionalmente *in vitro*. Posteriormente, las CMEs-MOh se cultivaron sobre soportes de Col I donde, una vez comprobado que las células crecían sobre él, se introdujeron en los modelos de reparación *in vitro* para su cultivo en medio de diferenciación condrogénico. La valoración de la reparación se realizó empleando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas y la escala de la *International Cartilage Repair Society (ICRS) II* modificada.

RESULTADOS: A partir de médula ósea (MO) de cadera, se obtuvieron CMEs-MOh. La caracterización morfológica y funcional *in vitro* de estas células puso de manifiesto que se trataba de células mesenquimales estromales. Las CMEs-MOh fueron capaces de crecer, diferenciarse y formar un neot Tejido en el modelo de reparación, obteniendo una reparación de cartílago articular del 54%, denominada “fibrocartílago”.

CONCLUSIONES: Se consiguió obtener y aislar CMEs-MOh a partir de biopsias de cadera. El análisis morfológico y la capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, permite considerar a las células aisladas como CMEs-MOh. Estas células, cultivadas sobre Col I, tienen capacidad de crecer, diferenciarse a células con características similares a condrocitos y producir un neot Tejido en el interior de las lesiones de cartílago articular.

ABSTRACT

AIM: To develop an *in vitro* model of human cartilage repair based on the chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells, isolated from human bone marrow (*CMEs-MOh*), cultured on type I collagen (Col I) scaffolds.

METHODOLOGY: *CMEs-MOh* were isolated from hip biopsies. These cells were characterized morphologically and functionally *in vitro*. Subsequently, *CMEs-MOh* were cultured on Col I scaffolds where, once it had been verified that the cells grew on them, they were introduced inside the *in vitro* repair model and cultured in chondrogenic medium. The evaluation of repair was performed using histological and immunochemistry techniques and the modified International Cartilage Repair Society (ICRS) II scale.

RESULTS: *CMEs-MOh* were obtained from hip bone marrow. Morphological, and functionally characterization of these cells demonstrated that they were *CMEs*. These cells were able to grow, differentiate and synthesize a neotissue in the *in vitro* repair model, obtaining a cartilage repair of 54%, denominated “fibrocartilage”.

CONCLUSIONS: *CMEs-MOh* were obtained and isolated from hip biopsies. The morphological and adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation analysis, allow to consider these cells as *CMEs-MOh*. Cells isolated from human bone marrow, grew on Col I, differentiated to chondrocyte-like cells and synthesized a cartilage-like neotissue, inside the lesions of the *in vitro* cartilage repair model.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 El cartílago articular

4.1.1 Estructura

El cartílago articular es un tejido conectivo altamente especializado que recubre las articulaciones, facilitando la transmisión de cargas con un bajo coeficiente de fricción (Fox *et al.*, 2009). Este tejido se caracteriza por ser avascular, aneural y alinfático (Poole, 1997).

Está constituido por células, denominadas condrocitos, embebidos en una compleja matriz extracelular (MEC) que le confiere sus peculiares propiedades mecánicas (Vega Álvarez *et al.*, 2002). Estas propiedades dependen del diseño del tejido, de la composición de la MEC (Mobasher *et al.*, 2014) y de las interacciones entre los condrocitos y la MEC (Buckwalter y Mankin, 1998).

Histológicamente, el cartílago se divide en varias capas (Figura 1): capa superficial, capa intermedia, capa profunda, *tidemark* y capa calcificada (Bhosale y Richardson, 2008). Cada una de las zonas varía en el número de células, en la disposición de los componentes de la MEC y, consecuentemente, en sus propiedades mecánicas (Gomoll y Minas, 2014).

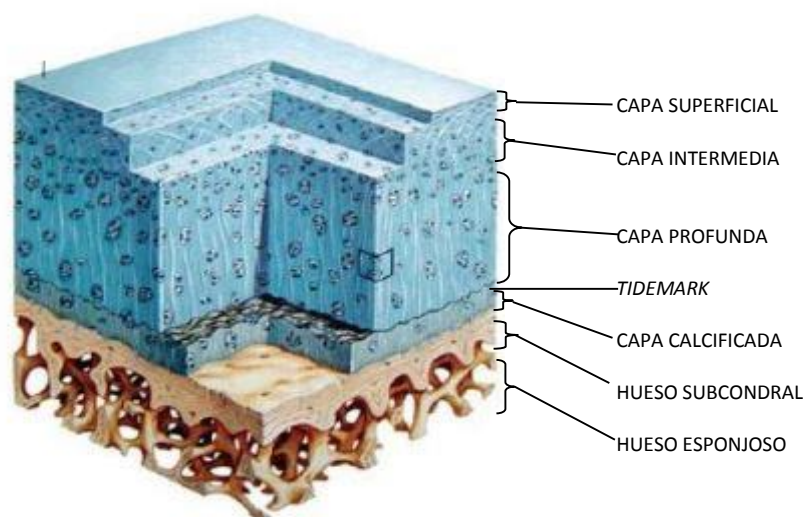


Figura 1: Representación de las diversas capas que forman la estructura del cartílago articular. Tomada y modificada de Buckwalter y Martin, (1995).

Las funciones de la MEC engloban: (1) la protección de los condrocitos de la carga mecánica, contribuyendo así a mantener su fenotipo, (2) el almacenamiento de algunas

citoquinas y factores de crecimiento necesarios para el correcto desarrollo de los condrocitos, (3) determina el tipo, concentración y tasa de difusión de los nutrientes hacia los condrocitos y (4) actúa como transductor de señales (Bhosale y Richardson, 2008).

4.1.2 Composición y características

Los condrocitos son el tipo celular característico del cartílago articular y constituyen el 2% del volumen total del mismo. Varían en forma, número y tamaño según la región anatómica en que se encuentran (Fox *et al.*, 2009).

Son células esféricas que sintetizan colágeno tipo II (Col II), grandes agregados de proteoglicanos (PG) y proteínas no colágenas. Poseen una alta actividad metabólica individual, pero debido a su escaso volumen global, la actividad total es baja. Viven y están adaptados a niveles bajos de oxígeno en el ambiente que les rodea. Entre sus funciones más importantes cabe destacar el mantenimiento del balance entre la síntesis y la degradación de la MEC (Bhosale y Richardson, 2008; Demoor *et al.*, 2014).

Los condrocitos mantienen su funcionalidad embebidos en pequeñas cavidades denominadas lagunas (Gago-Fuentes *et al.*, 2014) (Figura 2).

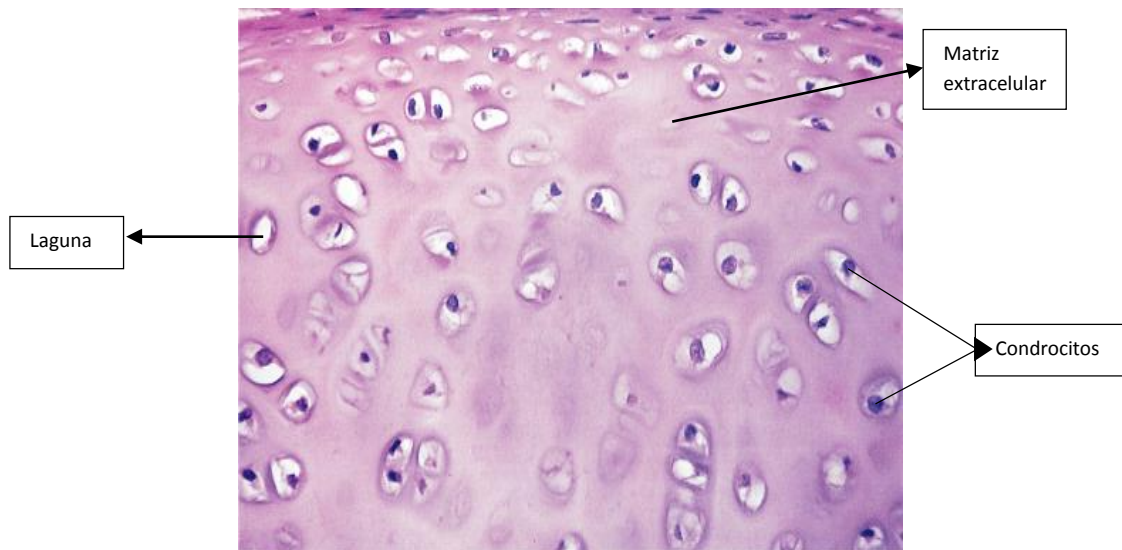


Figura 2: Histología del condrocito y de la MEC que lo rodea. Tomada y modificada de www.uaz.edu.mx

Aunque hasta hora se pensaba que los condrocitos carecían de contacto entre ellos (Bhosale y Richardson, 2008), recientes estudios han demostrado que éstos poseen al menos dos prolongaciones citoplasmáticas que emplean para comunicarse con condrocitos de diferentes lagunas (Gago-Fuentes *et al.*, 2014).

Al conjunto formado por un condrocito y la zona de MEC que lo rodea se le denomina condrón (Poole, 1997) y constituye la unidad anatómica, citogenética y funcional del cartílago (Vega Álvarez *et al.*, 2002).

En el cartílago articular normal el agua representa entre el 65% (capa superficial) y el 80% (capa profunda) del volumen total (Fox *et al.*, 2009), mientras que el colágeno (Col) constituye el 10-20% del volumen total. El Col II (el más predominante con un 90-95% sobre la cantidad total de Col) forma fibras y fibrillas entrelazadas con agregados de PG (Bhosale y Richardson, 2008) proporcionando soporte estructural a la MEC (Gomoll y Minas, 2014). El resto de Col presentes en menor proporción ayudan a dar forma y estabilizar la red fibrilar de Col II (Fox *et al.*, 2009).

Tabla I: Tabla con los diferentes tipos de colágeno presentes en el cartílago articular junto a sus funciones. Tomada y modificada de Bhosale y Richardson (2008)

Tipo de colágeno	Localización morfológica	Función
II	Componente principal de las microfibrillas (90-95%)	Ofrecer resistencia a las fuerzas de tracción
VI	Matriz pericelular	Ayuda a los condrocitos a integrarse en la matriz
IX	Entrecruzado a la superficie de las microfibrillas	Propiedades de resistencia a la tracción y conexiones interfibrilares
X	Estrechamente relacionado a las células hipertrofiadas en un cartílago calcificado	Soporte estructural y ayuda en la mineralización del cartílago
XI	Dentro o sobre las microfibrillas	Formación de fibrillas nucleadas

Por último, los PG representan un 10-20 % del volumen total. Son sintetizados por los condrocitos y secretados a la MEC, proporcionando al cartílago articular resistencia a las

fuerzas de compresión (Bhosale y Richardson, 2008). El PG de mayor tamaño y el más abundante en peso es el agregano (AG), que posee más de 100 cadenas de condroitin sulfato y queratán sulfato. Su característica principal es su capacidad para interactuar con el ácido hialurónico (AH) formando agregados por unión de proteínas (Fox *et al.*, 2009).

4.1.3 Función del cartílago articular

El cartílago articular permite el deslizamiento fácil de las dos superficies articulares, previene la abrasión de éstas, facilita el acoplamiento entre ambas y ayuda a que las fricciones se difundan sobre toda la superficie.

Además, debido a su elasticidad, es capaz de amortiguar las violentas presiones que pueden producirse durante las carreras, saltos, etc y hacerlas desaparecer gradualmente (Cañete Crespillo *et al.*, 2007).

4.1.4 Integridad del cartílago

Los condrocitos desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la MEC del cartílago. Cualquier desequilibrio en el balance biológico del cartílago perjudica su integridad, hace que sea más frágil y favorece la pérdida de este tejido (Cañete Crespillo *et al.*, 2007).

La muerte celular de condrocitos y la pérdida de MEC están estrechamente relacionadas, ya que el progreso de una de ellas, conlleva el agravamiento de la otra. Diversos estudios han logrado demostrar la existencia de una relación entre el daño articular y la apoptosis de los condrocitos (Hwang y Kim, 2015).

De igual forma, como resultado de una lesión o enfermedad y al tratarse de un tejido avascular, las células progenitoras, tanto de sangre como de médula ósea (MO), no pueden acceder a la región dañada para influir o contribuir a su reparación. Por lo tanto, el defecto queda sin reparar (Steinert *et al.*, 2007), lo que podría conducir al desarrollo de artrosis (*osteoarthritis, OA*).

4.2 Artrosis

La OA se define como un trastorno que afecta a las articulaciones móviles caracterizado por estrés celular y degradación de la MEC iniciado por micro- o macro- lesiones que activa respuestas inadaptadas de reparación, incluyendo vías proinflamatorias, de la inmunidad innata.

La enfermedad se manifiesta en primer lugar con un desorden molecular seguido por desórdenes anatómicos y/o fisiológicos caracterizados por la degradación del cartílago, remodelación ósea, formación de osteofitos, inflamación de las articulaciones y pérdida de la función articular normal que pueden culminar en el desarrollo de la dolencia (Kraus *et al.*, 2015) (Figura 3).

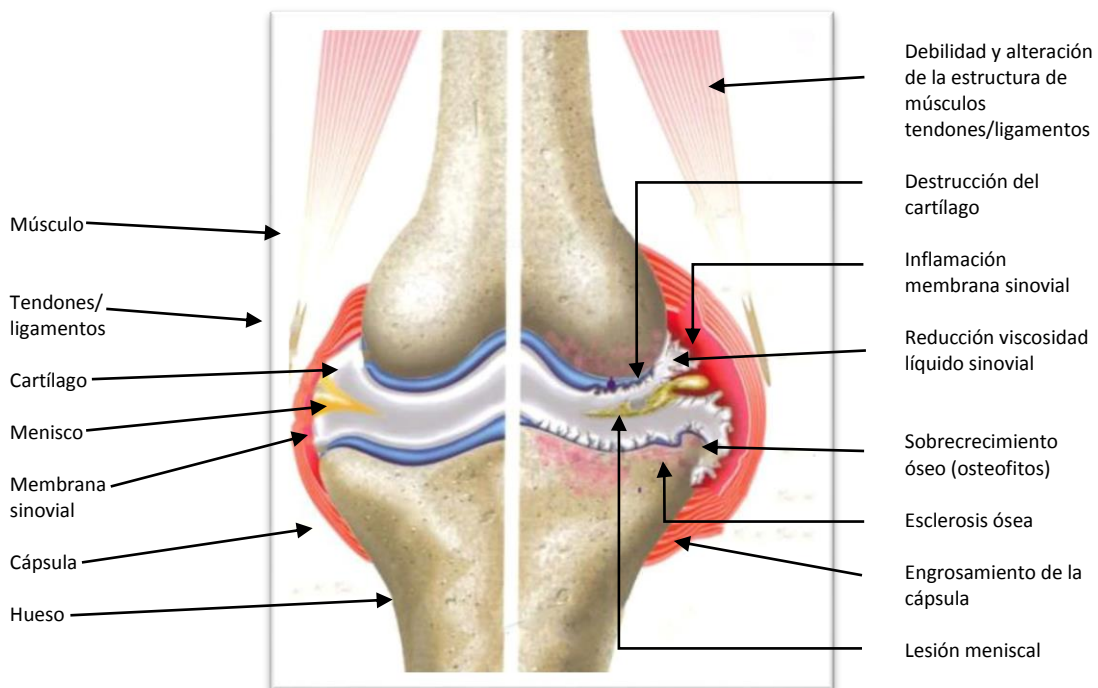


Figura 3: Disposición del cartílago articular normal frente a un cartílago con patología artrósica.

Tomada y modificada de <https://animalfisioblog.files.wordpress.com/2012/05/28-05-2012-190826-2.jpg>.

Aunque en el pasado era considerada como una enfermedad mecánica de degradación del cartílago (Glyn-Jones *et al.*, 2015), los avances en biología molecular han permitido concluir que se trata de un trastorno multifactorial muy complejo (Musumeci *et al.*, 2015), incluyendo factores mecánicos, inflamatorios, metabólicos y genéticos (Sakalauskiene y Jauniškiene, 2010).

Otros factores asociados a la *OA* son la obesidad, factores relacionados con la dieta, un estilo de vida sedentario y lesiones deportivas (Musumeci *et al.*, 2015).

4.2.1 Prevalencia

La *OA* es la enfermedad articular más prevalente y la mayor causante de discapacidad. Su incidencia está relacionada con la edad, además de existir una correlación sexo-específica (Sakalauskienė y Jauniškienė, 2010). Su prevalencia entre la población mayor de 65 años es de un 60% en los hombres y un 70 % entre las mujeres (Sarzi-Puttini *et al.*, 2005). Además, es la cuarta causa de años vividos con discapacidad (Haq y Davatchi, 2011).

4.2.2 Tratamientos

4.2.2.1 Farmacológico

Los principales objetivos de los tratamientos farmacológicos son controlar el dolor, mejorar la función articular y reducir la discapacidad. Cabe destacar el empleo de analgésicos (paracetamol), antiinflamatorios (Antiinflamatorios no esteroideos y Coxib) y analgésicos opioides como tratamientos sintomáticos (Sarzi-Puttini *et al.*, 2005). Por otro lado, fármacos modificadores de la enfermedad (FAME's) como el sulfato de glucosamina y el condroitin sulfato han mostrado ciertas propiedades antiinflamatorias y anticatabólicas *in vitro*, así como capacidad para aliviar los síntomas y retardar el proceso degenerativo (Evans *et al.*, 2006).

Otras estrategias farmacológicas testadas incluyen la viscosuplementación mediante inyecciones intraarticulares con ácido hialurónico, aunque el debate sobre su eficacia y seguridad permanece. Suplementaciones con lubricina, una glicoproteína que actúa sinérgicamente con el AH, ayudan a restaurar una lubricación adecuada y actividad condroprotectora (Glyn-Jones *et al.*, 2015).

En la actualidad no existe ningún tratamiento farmacológico que cure la *OA*. Si a esto unimos el aumento de la edad media de la población, el aumento de la prevalencia de la *OA* con la edad y la gran cantidad de reacciones adversas a la medicación que conllevan los fármacos anteriormente citados (Bian *et al.*, 2011), resulta necesario explorar otras vías para abordar terapéuticamente la *OA*.

4.2.2.2 Terapia celular

La terapia celular es un tipo de terapia biológica que implica la introducción de células para tratar órganos o tejidos dañados como consecuencia de una lesión traumática o degenerativa. Se espera un crecimiento exponencial de este tipo de técnicas, a medida que evolucionen los sistemas sanitarios modernos y se avance en el conocimiento integrado de la biología celular y de la medicina regenerativa (Mobasher *et al.*, 2014).

En concreto, en la patología artrósica, las lesiones del cartílago articular que no afectan a la integridad del hueso subcondral no se reparan espontáneamente. Para evitar la necesidad de reemplazo protésico, se han desarrollado distintos tratamientos celulares con el objetivo de formar un tejido de reparación con estructura, composición bioquímica y comportamiento funcional similares a los del cartílago articular nativo (Fuentes-Boquete *et al.*, 2007).

Existen técnicas que se llevan a cabo hoy en día, como la estimulación de MO. Consiste en realizar una pequeña perforación en el hueso subcondral para promover que las (CMEs-MOH), induzcan la reparación del cartílago (Fuentes-Boquete *et al.*, 2008). Por otro lado, encontramos los implantes de periostio y pericondrio acompañados de CMEs capaces de experimentar condrogénesis. Sin embargo, ambas técnicas forman un tejido de reparación fibrocartilaginoso con peores características viscoelásticas que el cartílago articular nativo (Fuentes-Boquete *et al.*, 2007; Gomoll y Minas, 2014).

La mosaicoplastia (Figura 4A) es una técnica más reciente para el tratamiento de defectos condrales de pequeño y mediano tamaño. Consiste en la translocación de cilindros osteocondrales, de una zona poco comprometida con la carga, a la zona afectada. Sus limitaciones vienen dadas por el tamaño de la lesión, y porque exige una gran precisión, puesto que si los cilindros sobresalen de la superficie, puede conllevar problemas articulares (Fuentes-Boquete *et al.*, 2007).

La técnica con mejores resultados hasta la fecha es el implante de condrocitos autólogos (*Autologous Chondrocyte Implantation, ACI*) (Figura 4B). Consiste en la obtención, por artroscopia, de explantes de cartílago articular de zonas poco comprometidas con la carga (4 I.B). Una vez en el laboratorio, se aíslan los condrocitos y se expanden en cultivo hasta conseguir una densidad celular suficiente. A continuación, con periostio del propio paciente (4 II.B), se sella la lesión (4 III.B) y, posteriormente, se inyectan dichos condrocitos (4 IV.B). Entre las limitaciones de esta técnica, destacan la dificultad de

conseguir una población numerosa de condrocitos y el riesgo de contaminación. Por otra parte, al aumentar los pases durante la expansión de condrocitos en monocapa, se produce una pérdida del fenotipo y de la expresión génica específica de condrocito que resulta en un tejido fibrocartilaginoso (Demoor *et al.*, 2014; Rackwitz *et al.*, 2014). Además, requiere de una segunda intervención quirúrgica y un daño articular adicional (Fuentes-Boquete *et al.*, 2007; Dewan *et al.*, 2014; Musumeci, 2014).

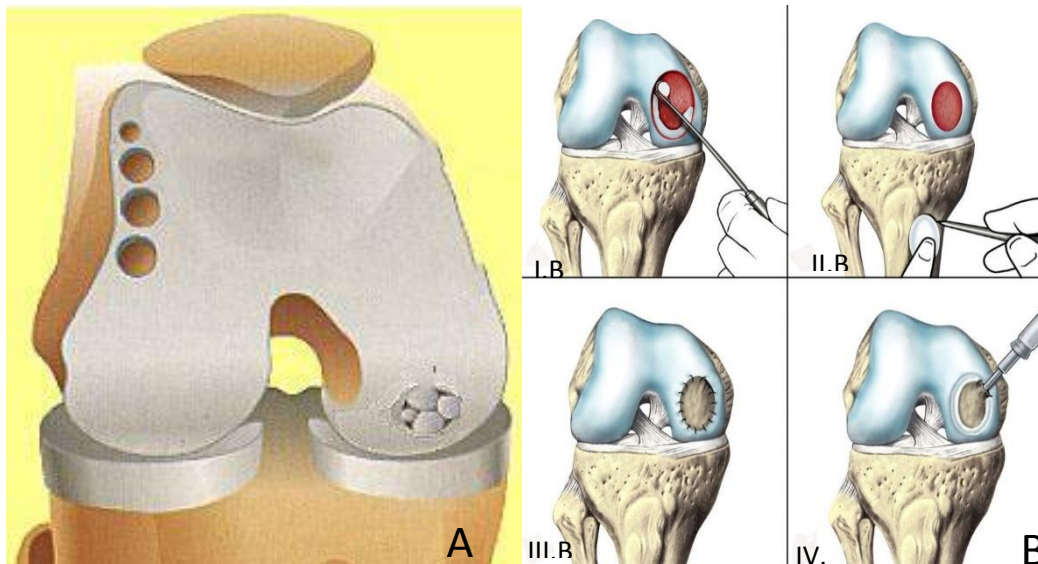


Figura 4 : Técnicas quirúrgicas para el tratamiento de la OA. En la Figura 4A se observa la translocación de los discos osteocondrales de una zona poco comprometida con la carga a la zona afectada. En la Figura 4B, técnica ACI donde (I.B) se obtienen los explantes para el aislamiento y posterior expansión de los condrocitos (II.B) se prepara el periostio para (III.B) el sellado y (IV.B) se inyecta la población de condrocitos. Tomadas y modificadas de <http://rodillalaser.com/es/rodillas/10-la-artriosis> y Ferruzzi *et al.* (2008).

A pesar de todos los esfuerzos de investigación que acompaña a la implantación de estas técnicas, ninguna ha conseguido hasta la fecha la obtención de un tejido articular con propiedades similares a las del cartílago hialino (Dhollander *et al.*, 2012).

4.3 Ingeniería tisular

La ingeniería tisular (IT) es una disciplina de la medicina regenerativa cuyo desarrollo se viene llevando a cabo en los últimos veinte años. Ofrece algunas de las estrategias más prometedoras a la hora de reparar tejidos, incluyendo el cartilaginoso (Johnstone *et al.*, 2013; Mobasher *et al.*, 2014). Su funcionamiento se basa en el uso combinado de

células, factores de crecimiento y biomateriales para la mejora o el reemplazo de funciones biológicas (Wyles *et al.*, 2015).

4.3.1 Células

La fuente celular ideal para la IT de cartílago es aquella que pueda ser fácilmente aislada, expandida y que sintetice abundantes componentes específicos de cartílago (Kock, *et al.*, 2011).

4.3.1.1 Células mesenquimales estromales

Las CMEs (Figura 5) son células fusiformes, con tres características que las convierten en idóneas para su uso en IT. Son células que, a pesar de la sucesión de pases celulares, mantienen un fenotipo de indiferenciación. Además, poseen una rápida proliferación *in vitro* y potencial multilínea que permite su diferenciación a una amplia variedad de tipos celulares (Bornes *et al.*, 2014).

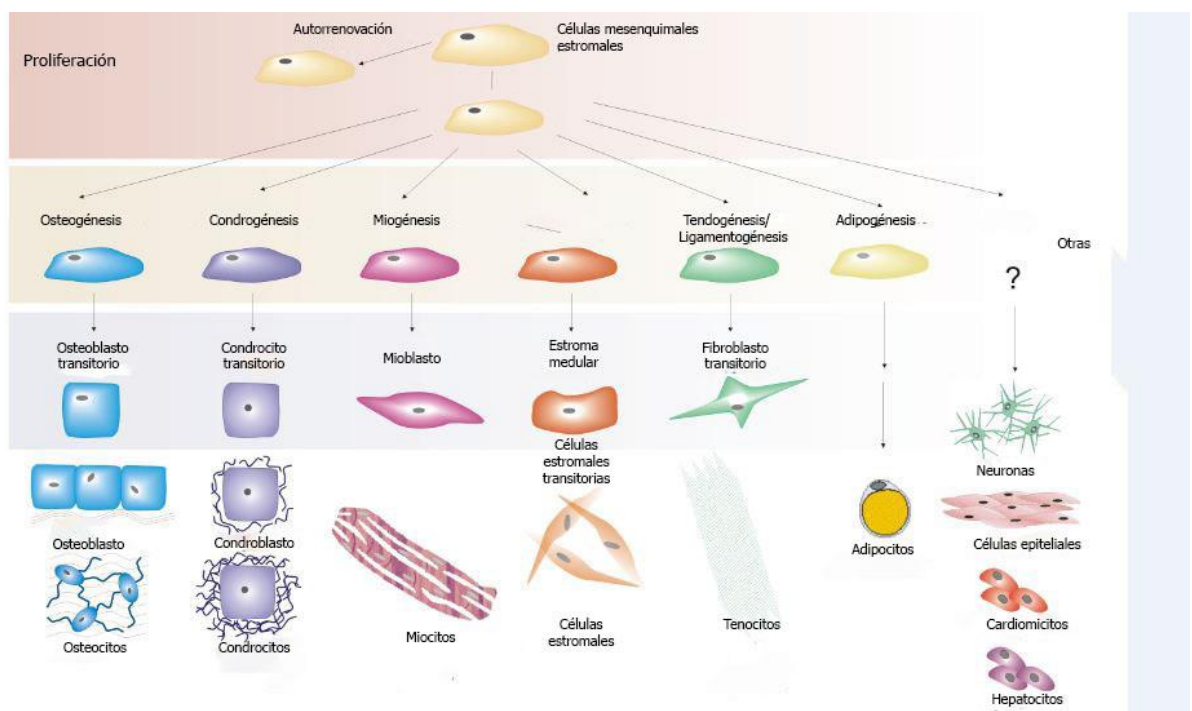


Figura 5: Representación esquemática del potencial multilínea de las células mesenquimales estromales. Tomada y modificada de

<http://www.york.ac.uk/res/bonefromblood/background/osteogenesis>.

En un esfuerzo por estandarizar la caracterización de las CMEs, la *International Society for Cellular Therapies (ISCT)* (2006) propuso una serie de criterios mínimos: (1) las células deben mostrar adherencia al plástico de los frascos de cultivo en condiciones estándar, (2) deben expresar determinados marcadores moleculares de superficie (CD73, CD90 y CD105) y no expresar otros hematopoyéticos (CD14, CD34 o CD45) y (3) deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* a condrocitos, osteoblastos y adipocitos (Demoor *et al.*, 2014).

Las CMEs aportan ciertas ventajas sobre los condrocitos para el tratamiento de enfermedades degenerativas como la OA. Poseen una mayor facilidad de cultivo *ex vivo* (rápida proliferación, obtención de una población superior y mantenimiento de su fenotipo indiferenciado). Además, al contrario que los condrocitos, se obtienen sin provocar al paciente un daño articular añadido (Díaz-Prado *et al.*, 2011; Wyles *et al.*, 2015).

4.3.2 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son ampliamente utilizados *in vitro* para potenciar la condrogénesis de las CMEs. La superfamilia del *Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)* es una de las más utilizadas en IT de cartílago (Bian *et al.*, 2011) debido a que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis tanto del hueso subcondral como del cartílago articular (Zhen y Cao, 2014).

Diversos estudios han mostrado que los *TGF- β* son capaces de inducir la diferenciación de las CMEs a condrocitos, estimular su proliferación, aumentar la producción de MEC e inhibir la osificación endocondral (Mazor *et al.*, 2014). Además, ayudan a mantener el fenotipo durante la diferenciación condrogénica gracias a su capacidad de inducir la síntesis de Col II y PG en condrocitos primarios, siendo *TGF- β 1* y *TGF- β 3* los representantes más destacados (Demoor *et al.*, 2014).

4.3.3 Biomateriales

Un biomaterial se define como un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función

del cuerpo según la *Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials*, (Velasco Peña y Garzón Alvarado, 2010).

El uso de biomateriales en la IT de cartílago tiene como objetivo el proporcionar a las células un nicho confortable que les dé soporte y estimule la síntesis de MEC (Kock, *et al.*, 2011) (Figura 6). Mientras el “andamio” aporta la estructura o consistencia, las células empiezan a multiplicarse en el soporte si reciben las señales químicas que favorecen su crecimiento. Las células proliferan y a la vez se organizan adaptándose a la forma del armazón que a su vez imita la estructura del nuevo tejido (Lizarbe, 2007).

Las propiedades mecánicas y biológicas de los biomateriales afectan significativamente a la condrogénesis y al mantenimiento a largo plazo de la integridad estructural del tejido de nueva formación (Fuentes-Boquete *et al.*, 2008). Asimismo, la naturaleza tridimensional de los biomateriales promueve el mantenimiento de la morfología celular, así como una elevada expresión de glucosaminoglucanos (GAGs) y Col II (Díaz-Prado *et al.*, 2011).

El uso de biomateriales es un componente clave para el éxito de la IT de cartílago. Éstos deberían presentar las siguientes características (Demoor *et al.*, 2014):

- Biocompatibles para minimizar, en la medida de lo posible, la respuesta inmune y ser capaces de integrarse con el tejido adyacente.
- Biodegradables. Se deberá reabsorber de manera gradual y simultánea al crecimiento celular y tisular.
- Porosos para permitir la migración celular y proporcionar un nicho para el intercambio de nutrientes a las células.
- Estructural y mecánicamente estables para soportar cargas y deformaciones sin pérdida de volumen.

En general, los biomateriales pueden dividirse en dos grandes grupos según la naturaleza de su procedencia: naturales o sintéticos. Por una parte, los biomateriales naturales suelen tener una magnífica biocompatibilidad, lo que permite que las células se integren y crezcan con una excelente viabilidad. Sin embargo, el principal problema radica en su limitada estabilidad mecánica y física (Musumeci, 2014). En este grupo podemos encontrar: colágeno tipo I (Col I), fibronectina, alginato (Abdallah y Kassem, 2007), agarosa, AH o quitosano (Díaz-Prado *et al.*, 2011). Aunque los biomateriales sintéticos mejoran el problema de la estabilidad, diversos estudios en animales no ofrecieron los

resultados esperados (Díaz-Prado *et al.*, 2011). Además, poseen otras desventajas como la hidrofobicidad y mayores dificultades para la adhesión celular. Sufren degradación, principalmente por hidrólisis, generando productos ácidos o tóxicos que podrían causar inflamación (Demoor *et al.*, 2014).

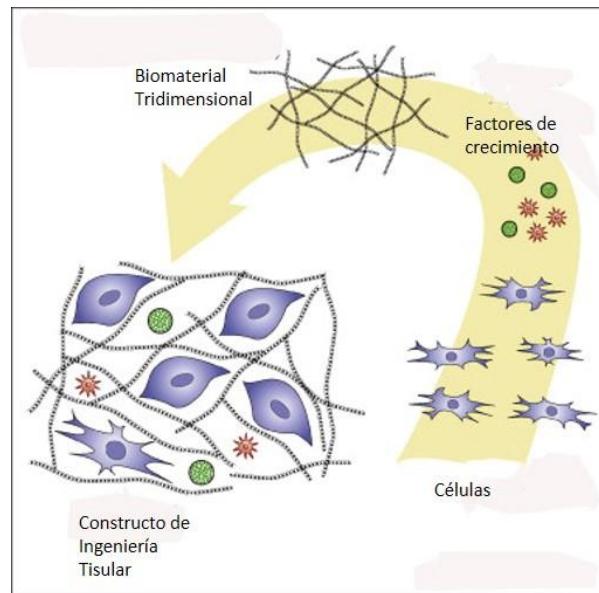


Figura 6: Detalle esquemático de un constructo de IT. Se pueden observar los componentes que participan: células, biomateriales y factores de crecimiento. Tomada y modificada de (Vinatier *et al.*, 2009).

4.3.3.1 Biomateriales de colágeno

El Col es una proteína estructural que representa, en los mamíferos, el 30 % de las proteínas totales del organismo. Su función es mecánica y de soporte, siendo uno de los componentes principales de la MEC. El Col ha sido uno de los materiales más utilizados en medicina para reparar daños o traumas químico mecánicos (Bernaes *et al.*, 2004).

Entre las propiedades que favorecen su utilización como biomaterial cabe destacar sus características mecánicas, su elevada fuerza tensil, extensibilidad, la formación de agregados moleculares y la posibilidad de formación de geles. De sus propiedades químicas se pueden resaltar la degradación por colagenasas, su reabsorción tisular, la semipermeabilidad y su capacidad para interactuar con diversas moléculas. No menos importantes son sus características biológicas. Antigenicidad reducida y capacidad de regulación de algunas de sus propiedades, mediante tratamiento con agentes como el glutaraldehído y formaldehído, controlando de esta manera su biocompatibilidad (Lizarbe, 2007).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general de este estudio

Desarrollar un modelo *in vitro* de reparación de lesiones de cartílago articular humano empleando células mesenquimales estromales humanas y soportes de Col I.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener y aislar células mesenquimales estromales humanas.
2. Caracterizar las células mesenquimales estromales humanas obtenidas en el punto anterior.
3. Valorar histológicamente la capacidad de las células mesenquimales estromales humanas cultivadas sobre soportes de Col I para reparar lesiones en un modelo de reparación *in vitro* de cartílago articular humano.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de muestras y aislamiento de células mesenquimales estromales

6.1.1 Obtención de muestras

Las muestras se obtuvieron de siete cabezas femorales procedentes del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC).

Los explantes de cartílago fueron obtenidos a partir de los cóndilos femorales o platos tibiales de rodillas artrósicas de un donante sometido a una cirugía de reemplazo protésico.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC de Galicia) y todas las muestras incluidas en él han obtenido el consentimiento informado (Anexo 1) de cada donante.

6.1.2 Extracción del conjunto celular presente en la médula ósea

El procesado de las muestras se realizó en el laboratorio de Cultivo Celular del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

La extracción del conjunto celular (Figura 7) se realizó mediante lavados de la MO. Este procedimiento comenzó con la sujeción e inmovilización de la cabeza femoral con un *clamp* (Figura 7A). A continuación, con la ayuda de una jeringa de 20 ml (*Kendall Monoject Syringe*, Turquía) y una aguja de bisel ancho (*BD Microbalance* TM 3, Irlanda), se inyectó en la MO medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*; Lonza, España) suplementado al 5% (*DMEM 5%*) con suero bovino fetal (SBF; Gibco, España) y al 1% con penicilina/estreptomicina (P/E; Gibco, España) (Figura 7B y 7C). De esta manera, se obtuvieron células en suspensión en el medio de cultivo que se hizo pasar por un filtro de nylon de 41µm de tamaño de poro (*Millipore*, Irlanda) (Figura 7D).

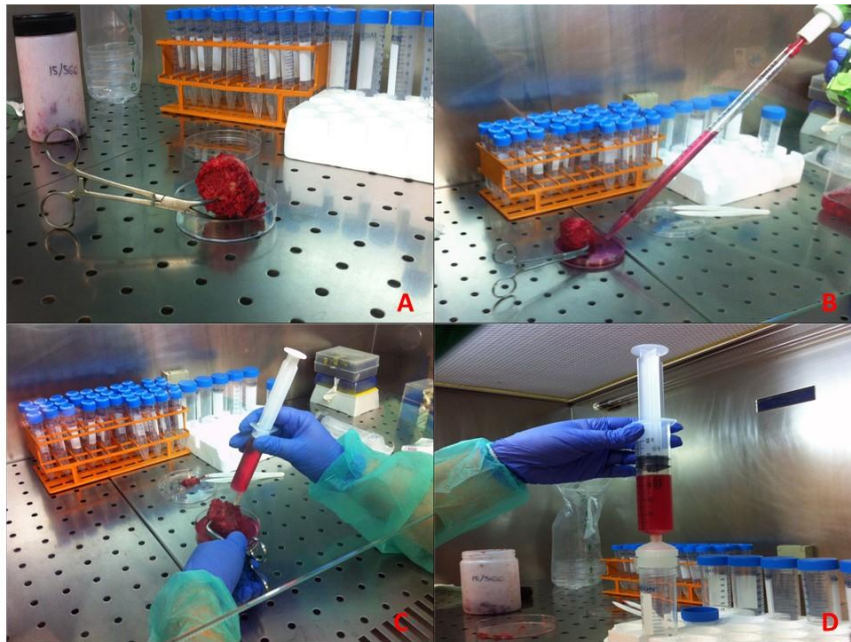


Figura 7: Extracción del conjunto celular presente en la MO. A) Sujeción de la cabeza femoral. B) Introducción de medio *DMEM* 5% para la extracción de las células. C) Inyección del medio de cultivo en la MO. D) Filtración de la suspensión recogida.

La suspensión resultante se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 7 minutos, obteniendo de esta manera un precipitado (*pellet* o botón celular). Una vez eliminado el sobrenadante por decantación, el *pellet* se resuspendió en medio de cultivo *DMEM* suplementado al 20% (*DMEM* 20%) con SBF y 1% P/E. Posteriormente, se sembraron en un frasco de cultivo 75 cm² (*Costar Corning Incorporated*, EE.UU.). Por último, se introdujeron en una estufa a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

Para eliminar las células no adherentes, transcurridas 48 horas se realizó un lavado con suero salino (*Fresenius Kabi*, España) y se reemplazó el medio de cultivo.

6.1.3 Cultivo y subcultivo del conjunto celular

A los frascos de cultivo con las células sembradas, se les cambió el medio *DMEM* 20% cada 2-3 días. Cada día se realizó un minucioso seguimiento observando su crecimiento. Con el fin de obtener una población celular suficiente, se realizaron subcultivos aumentando el área de cultivo. Cuando la confluencia celular se aproximó al 80%, se retiró el medio de cultivo, se lavó dos veces con suero salino y se incubó con tripsina-Ácido etilendiaminotetracético (*Ethylendiaminetetraacetic acid*, *EDTA*) 2X (*Sigma Aldrich Química S.A.*, España) a 37°C durante 2-3 minutos. Se comprobó, en un microscopio invertido IX51 (*Olympus España*

S.A., España), que las células no seguían adheridas al frasco de cultivo. Se inactivó la tripsina con medio *DMEM* 5% y se centrifugó de nuevo a 1500 r.p.m. durante 7 minutos. El precipitado del conjunto celular se resuspendió en medio de cultivo *DMEM* 20% y se sembró en un frasco de mayor área para su expansión.

Tras 3 semanas en cultivo en monocapa, se obtuvo el número suficiente de células para el estudio de la multipotencialidad y su cultivo sobre biomateriales, para el desarrollo del modelo de reparación. Para su manipulación, se resuspendió el conjunto celular y se hizo una estimación del número de células, realizando contajes en una cámara *Neubauer* (*Marienfeld*, Alemania) empleando un microscopio invertido. En los dos primeros subcultivos se realizó la técnica del *preplating*.

6.1.4 Preplating

La técnica de *preplating* (Richler y Yaffe, 1970) es una técnica que se emplea para separar CMEs-MOhs a partir del conjunto celular obtenido. Se basa en la diferencia de tiempo que requieren fibroblastos y macrófagos por una parte y las CMEs-MOhs por otra para adherirse a la placa de cultivo.

El método es similar al anteriormente citado en el apartado 1.3. La diferencia radica en que, una vez inactivada la tripsina con *DMEM* 5%, se introdujo el frasco de cultivo en la estufa a 37°C durante 10 minutos.

Transcurrido este tiempo, las células de interés permanecieron en suspensión, mientras que los fibroblastos y los macrófagos se adhirieron al frasco. Así, se recogió la suspensión que posteriormente se sembraron en un frasco de mayor tamaño para su expansión.

6.1.5 Estudio de la multipotencialidad de las células mesenquimales estromales

El conjunto celular se cultivó en diferentes medios de diferenciación con el fin de valorar la capacidad multilínea de las células. Estos medios favorecieron la diferenciación de las células hacia tres linajes específicos de las CMEs-MOhs: adipocitos, osteoblastos y condrocitos.

6.1.5.1 Diferenciación adipogénica

Para testar citológicamente la diferenciación adipogénica, se sembraron 33×10^3 células/pocillo de uno de los donantes en una cámara de ocho pocillos para microscopía (*BD Falcon*, Francia). Para ello se empleó el *kit* adipogénico comercial *Bullekit Adipogenic Differentiation Medium* (Lonza). Este *kit* se compone de dos medios distintos: uno de inducción y uno de mantenimiento. El funcionamiento de este *kit* consiste en alternar estos dos medios, comenzando por el medio de inducción, sucediéndose los cambios cada 3 días. En un pocillo se añadió *DMEM* 20% a modo de control negativo.

Transcurridos 21 días, se procedió a eliminar los medios de estimulación y el *DMEM* 20%, se lavaron los pocillos de la cámara con suero salino y se realizó una fijación con paraformaldehído al 4% (Panreac Química S.A., España). Una vez fijadas tanto las células estimuladas como las células control, se tiñeron.

6.1.5.2 Diferenciación osteogénica

Para testar citológicamente la diferenciación osteogénica, se sembraron 33×10^3 células/pocillo de uno de los donantes en una cámara de ocho pocillos para microscopía (*BD Falcon*).

Se añadió el medio de diferenciación osteogénico comercial *hMSC Bullekit Osteogenic Differentiation Medium* (Lonza), sucediéndose los cambios cada 3 días. En un pocillo se añadió *DMEM* 20% a modo de control negativo.

Después de 21 días de cultivo, se eliminó tanto el medio de diferenciación de las células estimuladas como el *DMEM* 20% de las células control. Se lavaron los pocillos de la cámara con suero salino y se realizó una fijación con paraformaldehído al 4% (Panreac Química S.A.) para teñirlas.

6.1.5.3 Diferenciación condrogénica

Para testar histológica e inmunohistoquímicamente la diferenciación condrogénica, se sembraron 25×10^4 células/tubo de uno de los donantes, en tubos de fondo cónico de polipropileno (J.C. Catalán S.L., España). Para facilitar la condrogénesis, se empleó la técnica de formación de la micromasa (Johnstone *et al.*, 1998) que consiste en la formación de un agregado celular que facilita la comunicación entre las células, y por tanto, la formación de la MEC.

Se añadió el medio de diferenciación condrogénico *hMSC Bullekit Chondrogenic Differentiation Medium* (Lonza) suplementado con 10 ng/ml de *TGF-β3* (*ProSpec-Tany Technogene Ltd.*, Israel), sucediéndose los cambios cada 3 días. En un tubo, se añadió *DMEM* 20% a modo de control negativo.

Transcurridos 21 días, se obtuvieron las micromasas de los tubos tratados con el medio de diferenciación y del control. Éstas fijaron, se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes en el microtomo para realizar tinciones histológicas e inmunohistoquímicas.

6.1.6 Siembra y cultivo del conjunto celular sobre los soportes de colágeno

Los biomateriales utilizados para este estudio fueron esponjas de Col I de 1 cm² suministrados por la empresa italiana Opocrin, S.p.A. (Modena, Italia).

En una placa estéril de 24 pocillos (*Costar Corning Incorporated*) se introdujeron, de manera independiente, 4 réplicas del biomaterial en el que se sembraron 2x10⁵ células, de uno de los donantes por cada muestra de biomaterial.

A cada pocillo se le añadió medio condrogénico de *diferenciación hMSC Commercial Chondrogenic Differentiation Medium* (Lonza), suplementado con 10 ng/ml de *TGF-β3* (*ProSpecTany Technogene Ltd.*). Cada 3 días se eliminó el sobrenadante de cada pocillo y se cambió por nuevo medio condrogénico.

Tras 16 días de diferenciación, se recogieron los biomateriales para realizar análisis histológicos e inmunohistoquímicos. Se fijaron, se deshidrataron y se incluyeron en parafina para cortar en el microtomo.

6.2 Desarrollo del modelo de reparación de lesiones focales de cartílago articular humano empleando constructos condrogénicos

6.2.1 Obtención de las células mesenquimales estromales.

Las células obtenidas de 3 donantes se juntaron para formar un grupo celular (*pool* celular) y evitar así sesgos debidos a la variabilidad celular.

6.2.2 Obtención de las biopsias de cartílago humano

Los explantes de cartílago articular fueron obtenidos a partir de rodilla artrósica procedentes de cirugía de reposición (Figura 8A). Estas muestras fueron procesadas según los protocolos estandarizados del laboratorio de Cultivo Celular del INIBIC. Los cóndilos femorales y los patillos tibiales se colocaron en placas Petri (*Costar Corning Incorporated*) y se cortaron en pequeños fragmentos alargados con ayuda de un bisturí (*Swann-Morton*, Inglaterra) para su posterior utilización en el modelo de reparación.

Una vez identificada la cara superficial de las biopsias de cartílago humano, se obtuvieron muestras de 6 mm de diámetro con ayuda de un sacabocados estéril (*Biopsy Punch; Kai Medical*, Alemania) (Figura 8B y 8C).

A continuación, se realizaron lesiones de 3 mm de diámetro utilizando fresas odontológicas (*Gebr. Brasseler GmbH & Co. KQ*, Alemania) (Figura 8D) conectadas a un microrrotor (*EWL K9*, Alemania) accionado por un pedal.

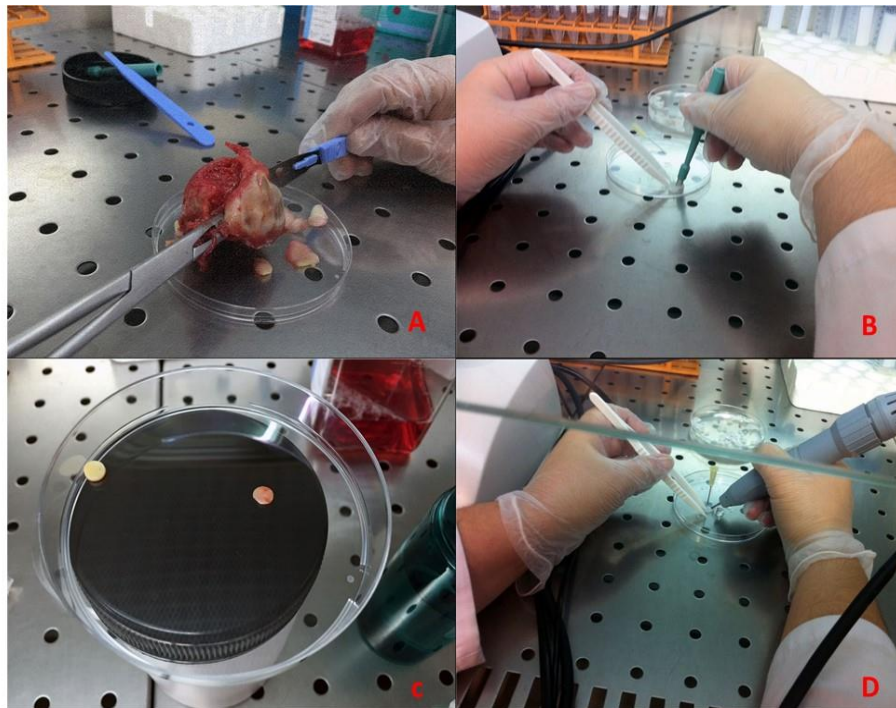


Figura 8: Obtención de las biopsias y realización de la lesión. A) Obtención de las biopsias de cartílago. B) Obtención del biomaterial de Col I. C) Detalle del tamaño final de la biopsia. D) Realización de la lesión con la fresa odontológica.

6.2.3 Introducción del biomaterial con células en la lesión del modelo de reparación de cartílago

Para testar la funcionalidad del modelo de reparación de cartílago, se sembraron 2×10^5 células sobre esponjas de Col I de 4 mm de diámetro (Figura 9A), como se ha descrito en el apartado 1.6. Una vez cultivados los biomateriales con células, se mantuvieron en una estufa durante 30 minutos a 37°C para que las células se adhiriesen al biomaterial.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación del biomaterial con las células, se extrajeron de la estufa para introducirlos, con la ayuda de unas pinzas estériles, en la lesión del modelo de reparación de cartílago (Figura 9B y 9C).

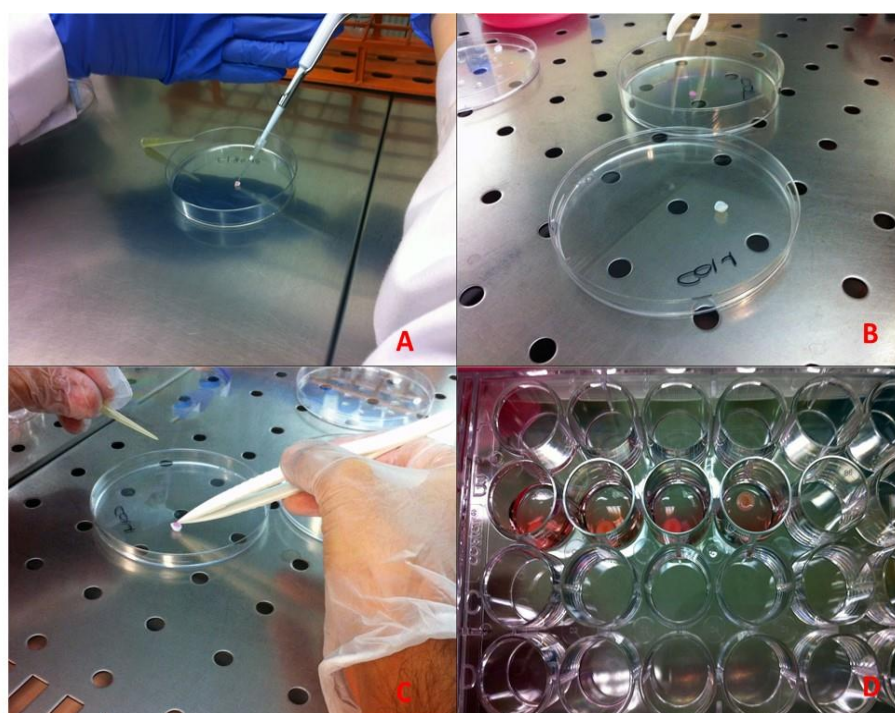


Figura 9: Siembra del conjunto celular sobre el biomaterial y cultivo del modelo de reparación. A) Siembra de las células sobre el biomaterial de Col I. B) y C) Una vez el biomaterial está listo, se introduce en la lesión. D) Cultivo del modelo de reparación.

6.2.4 Cultivo del modelo de reparación de cartílago humano y diferenciación condrogénica

En una placa estéril de 24 pocillos se introdujeron, de manera independiente, 4 réplicas del modelo de reparación de cartílago (Figura 9D).

A cada pocillo de la placa se le añadió medio condrogénico de diferenciación suplementado con 10 ng/ml de $TGF-\beta_3$ realizando el cambio de medio cada 3 días.

Este procedimiento se llevó a cabo durante 30 días, momento en el cual se recogieron los modelos para fijarlos con paraformaldehído al 4%, incluirlos en parafina y realizar los cortes en el microtomo para su posterior análisis histológico e inmunohistoquímico.

6.3 Análisis histológico y citológico

Este análisis se realizó en los Servicios Centrales de Histomorfología del INIBIC.

6.3.1 Valoración de la diferenciación multilínea del conjunto celular

Para determinar el grado de tinción/presencia se utilizó una escala cualitativa de 4 valores: (-) Negativo o ausencia, (+) Levemente positivo o presencia débil, (++) Moderadamente positivo, (+++) Muy positivo o presencia fuerte.

6.3.1.1 Diferenciación adipogénica

Para valorar histológicamente la diferenciación adipogénica, se realizó una tinción *Oil-Red-O* (*Sigma*, E.E.U.U.). Esta tinción permite valorar la presencia de vacuolas lipídicas características de los adipocitos. Se consideraron positivas aquellas tinciones que presentaron coloración rojo-naranja.

6.3.1.2 Diferenciación osteogénica

Para valorar histológicamente la diferenciación osteogénica, se realizó una tinción Rojo Alizarina (*Merck*, Alemania). Esta tinción permite valorar la presencia de depósitos de calcio característicos de los osteocitos. Se consideraron positivas aquellas tinciones que presentaron coloración roja.

6.3.1.3 Diferenciación condrogénica

Una vez realizados los cortes de las micromasas se procedió a su análisis histológico. En cuanto a las tinciones histológicas, se realizaron las siguientes:

- Hematoxilina-Eosina (H-E): para una valoración general de la morfología celular. Tiñe de azul los núcleos y de rosa el citoplasma celular.
- Tricrómico de Masson (TM): para una valoración de la morfología celular y para la detección de Col. Tiñe los núcleos de azul-negro, de rosa el citoplasma y el Col de azul.
- Safranina O (SO): para la detección de PG. Positividad de color rojo-naranja.

Todas las tinciones realizadas se observaron en un microscopio Olympus BX61 (Olympus España S.A.) equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Olympus España S.A.).

6.3.2 Diferenciación condrogénica de las CME's-MOh sobre biomateriales

Para determinar el grado de tinción/presencia se utilizó una escala cualitativa de 4 valores: (-) Negativo o ausencia, (+) Levemente positivo o presencia débil, (++) Moderadamente positivo, (+++) Muy positivo o presencia fuerte. Se evaluó la tinción de la MEC sintetizada por la población celular, no teniendo en cuenta la positividad debida al propio biomaterial.

6.3.2.1 Tinciones histológicas e inmunohistoquímicas

Las 4 réplicas de los biomateriales con células fueron deshidratadas, incluidas en parafina y cortadas en un microtomo. A los cortes se les realizaron tinciones con H-E, TM, SO, Azul de Toluidina (AT) que tiñe de azul los proteoglicanos y Von Kossa (VK), que revela la presencia de depósitos de calcio extracelulares. También se realizaron técnicas de inmunohistoquímica directa para la detección de Col I, Col II, Col tipo X (Col X), metaloproteasa 13 (*Matrix Metalloproteinase 13, MMP13*), AG y de un marcador de proliferación celular (*Proliferating cell nuclear antigen, PCNA*).

6.3.3 Diferenciación condrogénica de las CME's-MOh en el modelo de reparación de cartílago

6.3.3.1 Análisis histológico e inmunohistoquímico del tejido de reparación obtenido en los modelos *in vitro* de reparación de cartílago

Las 4 réplicas del modelo de reparación de cartílago se fijaron, fueron deshidratadas, incluidas en parafina y cortadas con el microtomo. A los cortes se les realizaron tinciones histológicas con H-E, SO y Safranina *O-Fast Green* (SO-FG), que tiñe de verde pálido el Col y de rosa los PG. Además, se realizó inmunohistoquímica directa sobre los cortes para la detección de Col I, Col II y AG.

6.3.3.2 Análisis morfométrico del tejido de reparación obtenido en los modelos *in vitro* de reparación de cartílago

Para la valoración del tejido de reparación en los modelos *in vitro* de reparación de lesiones focales de cartílago articular, las muestras se observaron en un microscopio *Olympus BX61* con una cámara digital *Olympus DP70*.

Para la valoración del tejido de reparación de los defectos condrales, nos basamos en un sistema de valoración histológico semicuantitativo que mide la calidad del cartílago articular reparado denominado escala *ICRS (International Cartilage Repair Society) II* (Mainil-Varlet *et al.*, 2010). Al tratarse de una escala pensada para valorar modelos *in vivo*, se realizaron diversas modificaciones para adaptarlo a nuestro modelo *in vitro*.

La evaluación general se calculó realizando la media aritmética de los resultados obtenidos de los cinco parámetros estudiados.

Tabla II: Escala *ICRS II* modificada con los parámetros estudiados y sus características a valorar.

Parámetro histológico	Puntuación
Morfología tisular (vista bajo luz polarizada)	0% Las fibras de Col tienen un grosor completo 100% Birrefringencia normal del cartílago
Tinción de la matriz (metacromasia)	0% Sin tinción 100% Metacromasia completa
Morfología celular	0% Ausencia de células redondeadas/ovaladas 100% La mayoría son células redondeadas/ovaladas
Grupos isógenos (4 o más grupos de condrocitos)	0% Ausencia 100% Presencia
Arquitectura de la superficie	0% Delaminación o mayor irregularidad 100% Superficie lisa
Evaluación general	0% Malo (tejido fibroso) 100% Bueno (cartílago hialino)

7. RESULTADOS

7.1 Conjunto celular aislado

7.1.1 Caracterización morfológica

Tras el aislamiento del conjunto celular, se obtuvo una población con las características típicas de las CME-MO_h. Aunque se trata de un grupo celular con morfología heterogénea, podemos distinguir determinados puntos comunes. Entre ellos, cabe destacar la morfología fibroblástica (Figura 9) y un citoplasma irregular con numerosas prolongaciones citoplasmáticas. Además, presentaron adherencia al plástico de los frascos de cultivo.



Figura 10: Imagen tomada en un microscopio invertido del conjunto celular aislado. Magnificación 10x.

7.1.2 Diferenciación multilínea *in vitro* del conjunto celular aislado

7.1.2.1 Adipogénesis

Las células estimuladas con medio de diferenciación adipogénico presentaron positividad (++) en la tinción *Oil-Red-O*, la cual nos permitió observar la presencia de vacuolas lipídicas intracelulares característica de la diferenciación adipogénica (Figura 10 A).

Por otra parte, las células sin estimular del control negativo no presentaron positividad (-) para esta tinción (Figura 10 B).

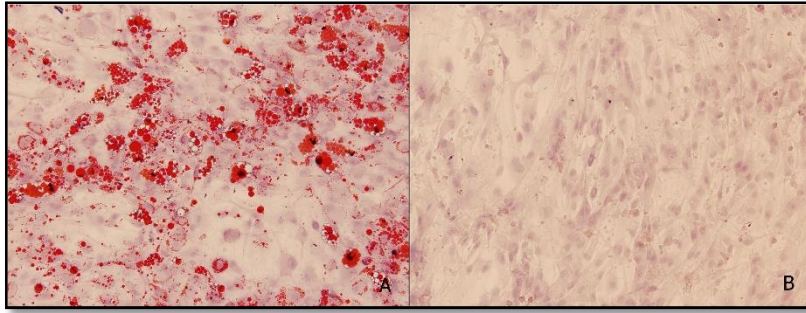


Figura 11: Tinción *Oil-Red-O* de las células estimuladas (A) (++) y de las células sin estimular cultivadas en *DMEM* 20 % (B) (-). Magnificación 10x.

7.1.2.2 Osteogénesis

Las células estimuladas con medio de diferenciación osteogénico presentaron una evidente positividad (+++) de tinción Rojo alizarina, la cual nos permitió distinguir una gran cantidad de depósitos de calcio (Figura 11 A).

Por otra parte, las células sin estimular del control negativo apenas presentaron positividad (+/-) (Figura 11 B).

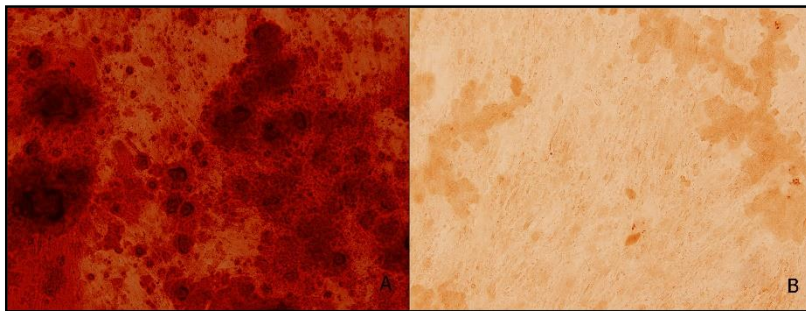


Figura 12: Tinción Rojo alizarina de células estimuladas (A) (+++) y de las células sin estimular cultivadas en *DMEM* 20 % (B) (+/-). Magnificación 10x.

7.1.2.3 Condrogénesis

La técnica de las micromasas empleada para la diferenciación condrogénica permitió observar el agregado celular. Una vez realizadas las tinciones H-E, SO y TM, se compararon dos muestras diferentes de células estimuladas frente al control negativo con células no estimuladas.

En las nueve muestras pudimos distinguir presencia celular. La tinción H-E (Figura 13 A-C) permitió observar en tono violáceo los núcleos de las células existentes. Su morfología era

redondeada, con pequeñas agrupaciones distribuidas por toda la superficie, aunque en mayor proporción en las zonas más externas. La tinción SO (Figura 13 D-F), mostró la presencia de PG en la MEC tanto de la micromasa control (+/-, Figura 13D) como de las estimuladas (++ y ++, Figuras 13E y 13F), evidenciada por la coloración anaranjada de la MEC. Mientras que su distribución en la micromasa control fue homogénea, en las estimuladas la tinción se distribuyó en determinadas zonas. La tinción para TM (Figura 13 G-I), mostró la presencia de Col en la MEC de todas las muestras analizadas, ya fueran control (+/-) (Figura 13G) o estimuladas (+++ y ++) (Figuras 14H y 14I), aunque en mayor proporción en la muestra de la Figura 14I. Las muestras estimuladas presentaron una mayor compactación que la muestra control debido principalmente a la gran cantidad de MEC que sintetizaron las células dentro de la micromasa. Además, las muestras estimuladas también fueron las que presentaron una mayor cantidad de Col.

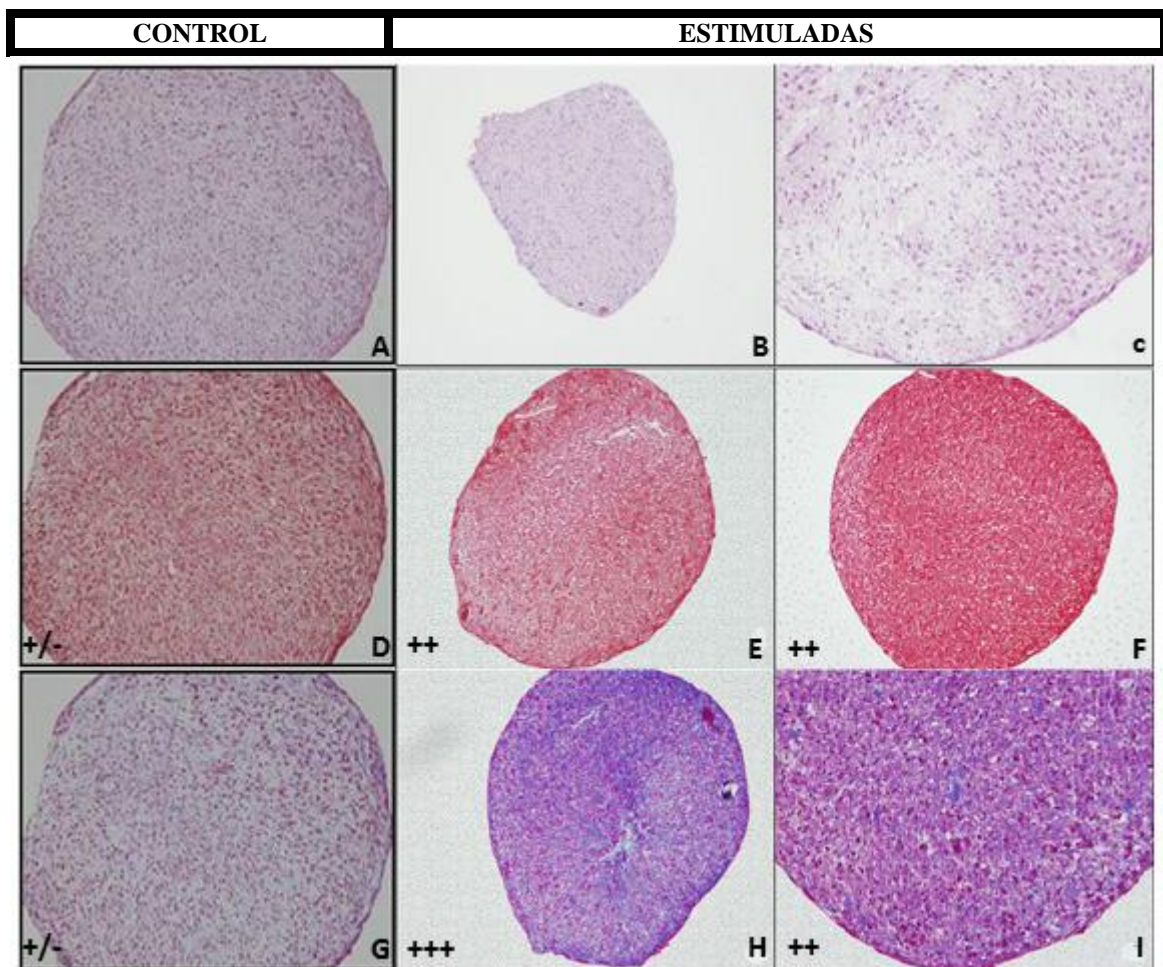


Figura 13: Tinción de las micromasas con H-E (A-C), SO (D-F) y TM (G-I). Tinciones control (A, D, G). Tinciones estimuladas (B, C, E, F, H, I). Magnificación 10x

7.1.3 Diferenciación condrogénica del conjunto celular sobre biomateriales.

7.1.3.1 Crecimiento del conjunto celular sobre el biomaterial colágeno tipo I

Al inicio del experimento (tiempo, $t=0$) el biomaterial de Col I estaba íntegro, con forma redondeada y en su parte central se observaban las células sembradas sobre su superficie (Figura 14). A los 16 días de cultivo ($t=16$), se observó una degradación patente del biomaterial, con pérdida de consistencia, pasando a tener una forma irregular (Figura 15). Además, la parte central donde se sembraron las células, presentó un aspecto más denso en comparación con la zona periférica que la rodeaba.

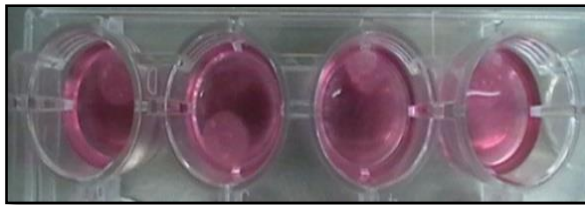


Figura 14: Biomateriales de Col I en medio condrogénico a $t=0$. En la imagen se muestran diferentes réplicas del cultivo de CME's sobre los soportes.

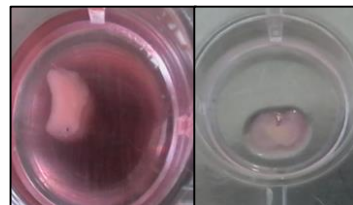


Figura 15: Biomateriales de Col I en medio condrogénico a $t=16$. En la imagen se muestra tanto el biomaterial inmerso en medio condrogénico, como en ausencia de él.

7.1.3.2 Análisis citológico e histológico del biomaterial de colágeno tipo I con células

La tinción con H-E (Figura 16) reveló que el porcentaje de células con respecto al área del biomaterial fue del 50%, mientras que su localización en el biomaterial fue tanto en la superficie como en el interior.

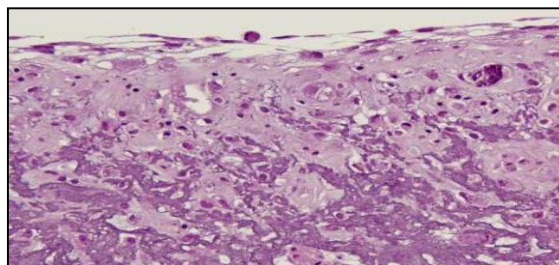


Figura 16: Tinción con H-E del biomaterial Col I con células. Magnificación 20x

Con esta tinción, distinguimos tres tonalidades que se corresponden, en orden de intensidad con: núcleos celulares con morfología redondeada (tonalidad violácea más fuerte), fibras del biomaterial (tonalidad violácea intermedia que se observa más abundantemente desde la zona intermedia hasta la profunda de la preparación) y el citoplasma (tonalidad rosácea y más débil que se aprecia desde la zona intermedia hasta la superficial de la preparación). Se observó abundante celularidad.

Con respecto a la MEC, se realizaron una serie de tinciones para observar la naturaleza del neotejido y se evaluaron de una forma cualitativa, como se describe en la tabla III.

Tabla III: Resultados de la valoración cualitativa de las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas del biomaterial Col I con células. (-) Negativo o ausencia, (+) Levemente positivo o presencia débil, (++) Moderadamente positivo, (+++) Muy positivo o presencia fuerte

Tinción	Células (Matriz extracelular)
TM	(-)/+
AT	++
SO	++
VK	(-)/+
Col I	+
Col II	++
Col X	+
<i>MMP13</i>	(-)/+
AG	+
PCNA	++

En cuanto a la tinción con TM de la MEC (Figura 17), se pudo apreciar una positividad muy débil (-/+, Tabla III) en tonos azulados, indicando que la MEC secretada contenía trazas de Col en su composición.

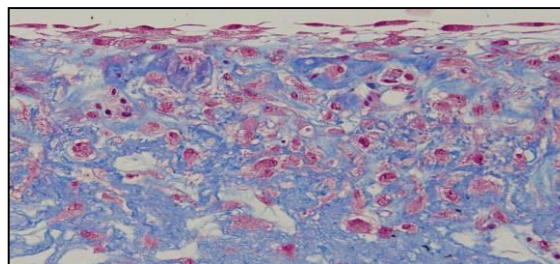


Figura 17: Tinción con TM del biomaterial Col I con células. Magnificación 20x

Respecto a la tinción con AT (Figura 18), observamos una moderada positividad (++, Tabla III) indicando la presencia de PG que, junto al Col, es un componente principal de la MEC.

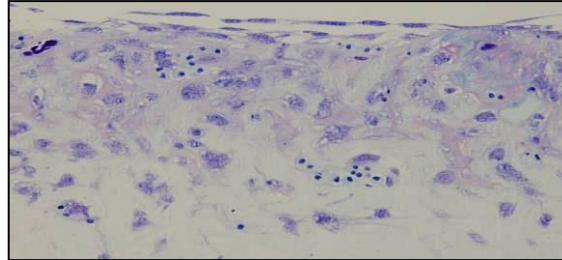


Figura 18: Tinción con AT del biomaterial Col I con células. Magnificación 20x

La tinción con SO (Figura 19), se calificó como moderadamente positiva (++, Tabla III). Esta tinción revela la presencia de PG adquiriendo una tonalidad anaranjada.

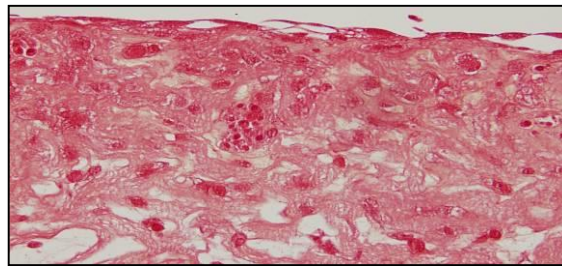


Figura 19: Tinción con SO del biomaterial Col I con células. Magnificación 20x

Por último, para comprobar que nuestras células no hipertrofiaron, se realizó una tinción VK (Figura 20). Esta tinción revela la presencia de depósitos de calcio típicos de la hipertrofia del cartílago y de la diferenciación osteogénica. En los constructos analizados, la positividad para VK fue evaluada como muy débil o ausente (-/+, Tabla III), lo que indica ausencia de osteogénesis.



Figura 20: Tinción con VK del biomaterial Col I con células. Magnificación 20x

7.1.3.3 Análisis inmunohistoquímico del biomaterial de colágeno de tipo I con células

Estas tinciones se realizaron para evaluar la composición bioquímica de la MEC sintetizada por las células.

En primer lugar, se evaluó la presencia de Col I (Figura 21) que fue débil (+, Tabla III). Una fuerte positividad en este caso indicaría la formación de tejido fibrocartilaginoso.

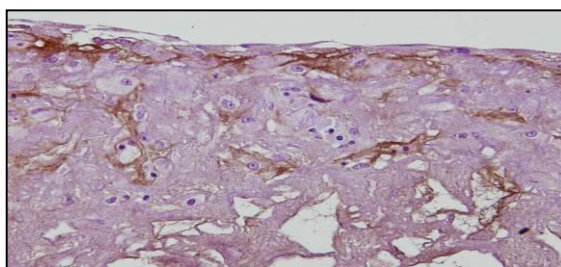


Figura 21: Tinción inmunohistoquímica para la detección de Col I en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.

A continuación, se determinó la presencia de Col II (Figura 22), componente mayoritario del cartílago articular. Su presencia se evaluó como moderadamente positiva (++, Tabla III).

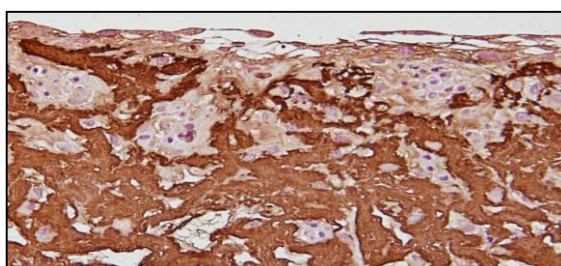


Figura 22: Tinción inmunohistoquímica para la detección de Col II en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.

Seguidamente, se testó la presencia de Col X (Figura 23) y *MMP-13* (Figura 24). La detección de estos componentes está estrechamente unida a la presencia de un cartílago hipertrófico. La presencia de Col X fue evaluada como débil (-/+ , Tabla III), mientras que la de *MMP-13* se calificó como negativa (-, Tabla III).

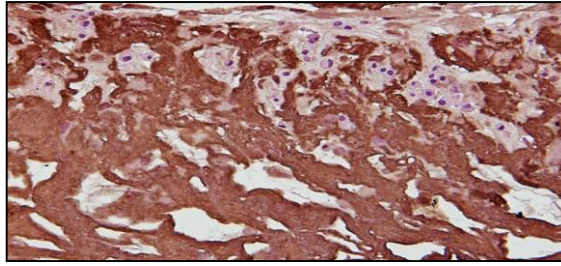


Figura 23: Tinción inmunohistoquímica para la detección de Col X en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.

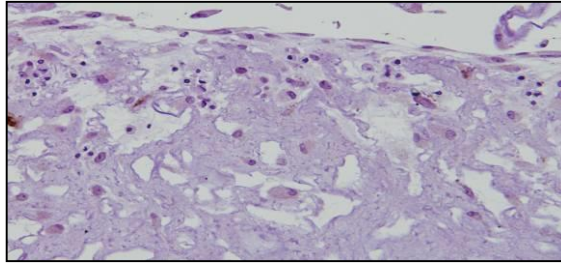


Figura 24: Tinción inmunohistoquímica para la detección de MMP-13 en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.

Para finalizar la detección de elementos presentes en la MEC, se realizó la tinción para la detección de AG. Esta tinción (Figura 25) mostró una presencia débil de AG (+, Tabla III), el PG más abundante de la MEC del cartílago hialino.

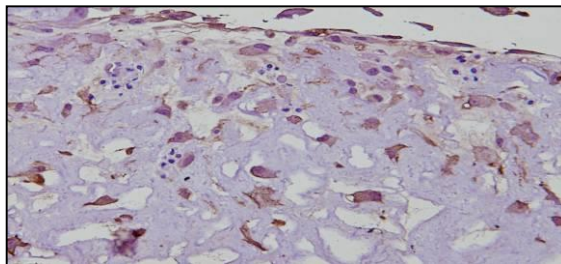


Figura 25: Tinción inmunohistoquímica para la detección de AG en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.

Además, se realizó la tinción *PCNA* (Figura 26), que mide la proliferación celular. Su resultado fue moderadamente positivo (++ , Tabla III), demostrando así que las células continuaban proliferando tras los 16 días de cultivo.

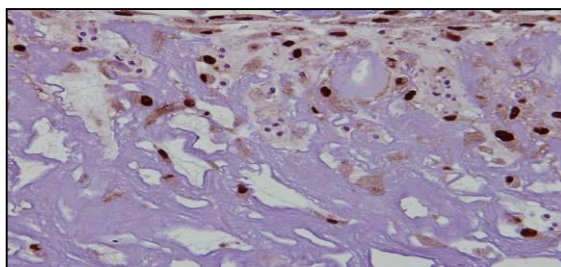


Figura 26: Tinción inmunohistoquímica para la detección de *PCNA* en el biomaterial Col I con células. Magnificación 20x.

7.2 Desarrollo del modelo de reparación de lesiones focales de cartílago articular humano empleando constructos condrogénicos

7.2.1 Análisis citológico e histológico del modelo de reparación *in vitro* de cartílago articular humano

La tinción con H-E del modelo de reparación (Figura 27A) mostró una forma regular en la lesión realizada con la fresa odontológica con una penetración en el cartílago adecuada. Se produjo un llenado total de la lesión proporcionando una superficie lisa y regular del cartílago. Asimismo, se observó una disposición lineal y un descenso en el grado de afectación de la superficie del cartílago articular. Con respecto a la celularidad del tejido neosintetizado, se observó una mayor densidad celular que en cartílago nativo. Por otra parte, a pesar de que la integración del tejido sintetizado con el cartílago nativo fue adecuada, en una integración completa, no se apreciaría la cicatriz divisoria.

Desde la zona intermedia hacia la zona profunda de la preparación (Figura 27B), se observó en tono rosáceo MEC secretada por las células con características similares a condrocitos; mientras que desde la zona intermedia hacia la zona superficial, observamos tinción en un tono algo más fuerte que sugiere mayor compactación.

Las células con características similares a condrocitos (en un tono violáceo más intenso) se distribuyeron por la totalidad de la lesión, sin formar agrupaciones o “*clusters*”. Se observa en detalle la MEC secretada y las células con una morfología heterogénea, tanto formas alargadas como ovaladas/circulares. La distribución de las células ovaladas coincidió con la zona más central y compacta del tejido de reparación, mientras que las células alargadas se localizaban en las zonas más periféricas y profundas del tejido neosintetizado (Figura 27C).

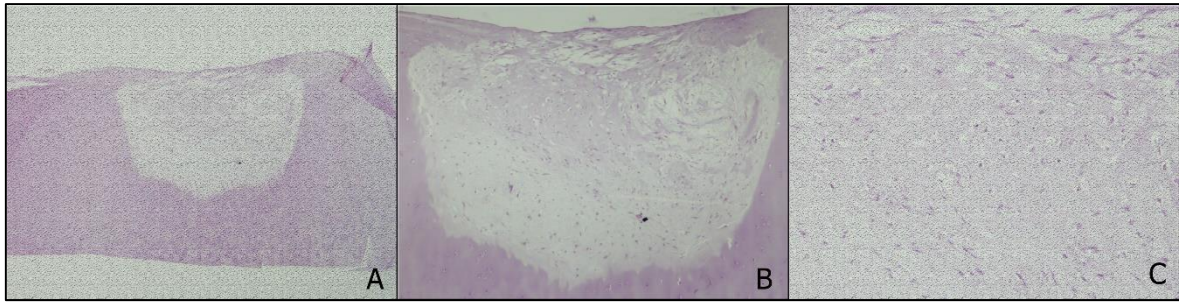


Figura 27: Tinción H-E del modelo de reparación *in vitro* de lesión del cartílago articular humano tras el implante del conjunto celular junto al biomaterial de Col I. Magnificación 2x (A). Detalle de la misma lesión. Magnificación 4x para observar sus características (B) y de la MEC sintetizada. Magnificación 10x (C).

La tinción con SO (Figura 28) reveló la presencia de PG prácticamente por la totalidad de la lesión. En la zona intermedia se aprecia una tinción más intensa y por debajo, las células, con características similares a condrocitos, secretando la MEC. La MEC secretada por estas células está bien distribuida, aunque parece que su compactación fue menor a la esperada. Entre la zona superficial y la zona media no se reveló presencia de PG, aunque el aspecto de la reparación es fibroso.

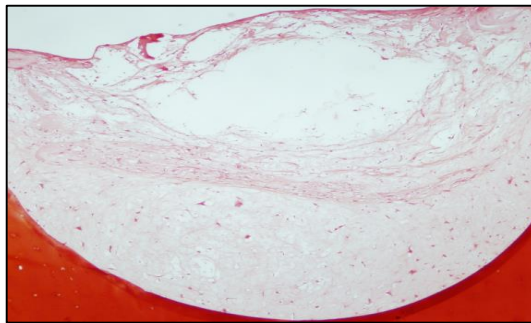


Figura 28: Tinción SO del modelo de reparación *in vitro* de lesión del cartílago articular humano tras el implante del conjunto celular junto al biomaterial de Col I. Magnificación 4x.

La tinción con SO-FG (Figura 29) sitúa en una misma tinción a los PG teñidos de rosa y al Col teñido de verde pálido. Así, se observó que en la zona superficial, la tinción en verde oscuro indica que hay una mayor proporción de Col. De igual manera, en la zona intermedia se observaron grandes fibras del mismo componente. Por debajo de ella, en la zona profunda, la tinción se tornaba en un color intermedio entre el verde pálido y el rosa, lo que se interpretó como presencia de Col y PG en la MEC neosintetizada.

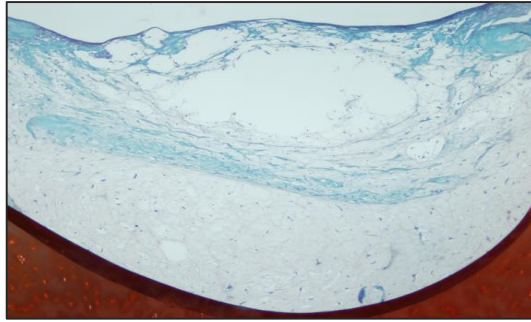


Figura 29: Tinción SO-FG del modelo de reparación *in vitro* de lesión del cartílago articular humano tras el implante del conjunto celular junto al biomaterial de Col I. Magnificación 4x.

7.2.2 Análisis inmunohistoquímico del modelo de reparación *in vitro* de cartílago articular humano

La tinción inmunohistoquímica para la detección de Col I (Figura 30A) reveló la presencia de dicho componente. Su distribución fue a lo largo de prácticamente toda la lesión, excepto en la parte comprendida entre la zona superficial y la zona intermedia. La tinción mostró que, a pesar de que las fibras consiguieron sellar superficialmente la lesión, la compactación fue insuficiente.

La tinción para la detección de Col II (Figura 30B), mostró una mayor positividad que la efectuada para Col I.

La zona intermedia, en la que se aprecia una mayor intensidad, mostró que su principal componente era Col II. En cuanto a la zona más profunda, la tonalidad es más débil.

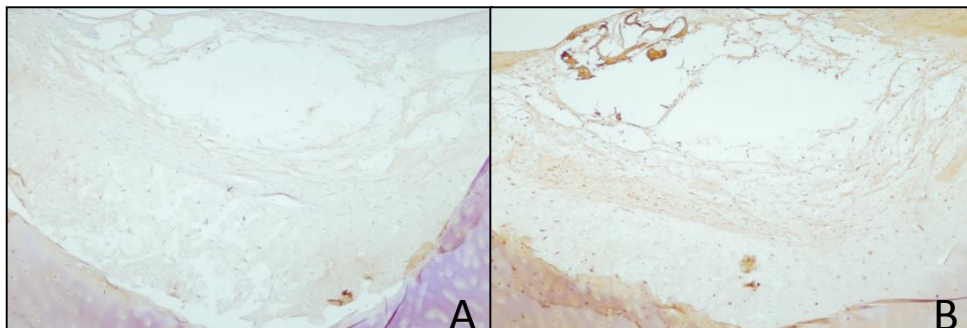


Figura 30: Tinción inunohistoquímica para la detección de Col I (A) y Col II (B) del modelo de reparación *in vitro* de lesión del cartílago articular humano tras el implante de CMEs-MO_h junto al biomaterial de Col I. Magnificación 4x.

Por último, la tinción para la detección de AG (Figura 31), que evidencia la presencia de AG (componente principal junto al Col II del cartílago articular hialino), mostró una positividad superior a los Col estudiados.

La zona más superficial tuvo una gran intensidad en la tinción. En la zona intermedia, la positividad detectada para AG, unida a los resultados de la detección de Col II, fueron compatibles con MEC neosintetizada de composición similar al cartílago articular hialino. En la zona más interna, que se corresponde con una menor compactación, la positividad para AG fue menor.

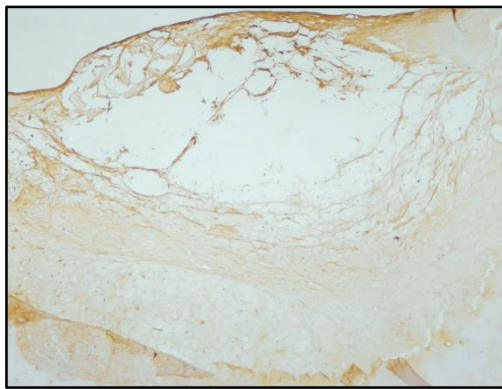


Figura 31: Tinción inmunohistoquímica para la detección de AG del modelo de reparación *in vitro* de lesión del cartílago articular humano tras el implante de CMEs-MOh junto al biomaterial de Col I. Magnificación 4x.

7.2.3 Análisis morfométrico del neot Tejido obtenido en los modelos *in vitro* de reparación de cartílago

En la tabla IV se muestran los resultados del análisis semicuantitativo de la reparación *in vitro* de la lesión de cartílago articular humano tras el implante del biomaterial de Col I con CMEs-MOh.

Tabla IV: Resultados de la valoración *ICRS II* modificada del modelo de reparación *in vitro* de lesión de cartílago articular humano

Parámetro histológico	Puntuación
Morfología tisular (vista bajo luz polarizada)	30%
Tinción de la matriz (metacromasia)	25%
Morfología celular	50%
Grupos isógenos (4 o más grupos de condrocitos)	85%
Arquitectura de la superficie	100%
Evaluación general	58%

A cada parámetro estudiado, se le asignó una puntuación cuantitativa expresada en porcentaje. En primer lugar, para valorar la morfología tisular, se estableció una puntuación comprendida entre el 1% que se corresponde con tejido fibroso y el 100%, perteneciente a cartílago articular hialino. La puntuación fue de un 30 % al apreciar fibras de Col distribuidas por la lesión. Al no precisar qué tinción era la adecuada, tomamos como referencia la de Col II.

Para valorar la tinción de la matriz, se tomó como referencia el contenido en PG y, en consecuencia, la tinción a observar fue la SO. Se evaluó con un 25% debido, principalmente, a la poca consistencia observada en la parte interna del modelo de reparación.

Respecto a la morfología celular, evaluada en base a la H-E, la puntuación era de 0% si la totalidad de la población celular presentaba morfología alargada. El 100% se correspondía con una totalidad de células con morfología redondeada. Se asignó un 50%.

El siguiente parámetro evaluado se refería a la existencia de grupos isógenos. Una abundante presencia de dichas agrupaciones de cuatro o más condrocitos, era penalizada con una puntuación de 0%. La no presencia de estos “*clusters*” se valoraba con un 100%. La tinción de referencia fue H-E, evaluándose con una puntuación de 85%.

El último ítem evaluado fue la arquitectura de la superficie. Se debía valorar con un 0% si la lesión no estaba cubierta y 100% si la lesión se rellenaba por su zona más superficial. La tinción referencia fue H-E en la que se observó una superficie lisa que cubría la totalidad de la lesión, por lo que su valoración fue del 100%.

Para obtener una valoración global, se realizó la media aritmética de los parámetros estudiados obteniendo como resultado final, un 58% lo que se correspondía con un grado de reparación de “fibrocartilago”.

8.DISCUSIÓN

Los recientes avances en IT la convierten en una disciplina muy prometedora para lograr la reparación de un gran número de tejidos, incluido el cartilaginoso (Bornes *et al.*, 2014). Para que esta técnica se realice con éxito, existen diversos factores que deben ser considerados.

El primero de ellos, una adecuada fuente celular. La población celular escogida y caracterizada en este trabajo fueron CMEs. Aunque son conocidas por otras denominaciones como células madre mesenquimales, células mesenquimales multipotentes o células troncales mesenquimales, dicha nomenclatura se adoptó basándonos en las recomendaciones de la *ISCT* (Krampera *et al.*, 2014). Las ventajas que aportan estas células para la IT de cartílago respecto a los condrocitos que se emplean en otras estrategias, son múltiples: mayor facilidad de obtención, mayor facilidad de cultivo *in vitro* (Abdallah y Kassem, 2007) y gracias a su capacidad proliferativa (Wyles *et al.*, 2015), la obtención de una gran población celular a partir de pocos subcultivos celulares. En nuestro caso, se obtuvo una numerosa población celular tras escasos pases celulares demostrando una evidente capacidad proliferativa.

Asimismo, poseen mayor capacidad de mantenimiento del fenotipo indiferenciado a medida que se suceden los pases celulares (Bornes *et al.*, 2014). Su capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos está ampliamente establecida y su obtención puede realizarse desde una amplia variedad de tejidos (Musumeci *et al.*, 2015). En nuestro experimento se trató con CMEs procedentes de MO (CMEs-MO_h) de pacientes artrósicos de cadera.

Otra fuente celular estudiada para la reparación del cartílago articular son las *induced pluripotent stem cells (iPS)*. Estas células reprogramadas se obtienen mayoritariamente a partir de fibroblastos y poseen todas las ventajas propias de las células madre embrionarias, sin los problemas éticos que conllevan. Por el contrario, existe el riesgo de la formación de teratomas que son subsanables mediante una diferenciación previa (Liu *et al.*, 2014, Yamashita *et al.*, 2015). Sin duda, se trata de una fuente celular que actualmente es objeto de múltiples investigaciones gracias al potencial demostrado. A pesar de todas estas ventajas, se requiere de más estudios que avalen y refuercen la seguridad en su empleo (Makris *et al.*, 2014)

Por todo lo anteriormente citado, las CMEs-MO_h son una fuente celular óptima para Terapia Celular e IT (Herlofsen *et al.*, 2013).

Nuestra población celular cumplió los requisitos establecidos en estudios previos (Dominici *et al.*, 2006) mostrando adherencia al plástico de los frascos de cultivo y morfología fibroblástica. Gracias a los protocolos estandarizados que se llevan a cabo en el laboratorio de cultivos del INIBIC para la obtención y aislamiento de CMEs-MO_h, se sabe que las poblaciones celulares aisladas son positivas para los marcadores de superficie propuestos por la *ISCT*; es el caso de CD73, CD90 y CD105. Además, muestran positividad para otros característicos de CMEs-MO_h como CD29, CD44, CD166 y SSEA-4. Por el contrario, no lo son para otros hematopoyéticos como son CD34 y CD45 (Cicione *et al.*, 2014).

Aun así, se decidió asegurar que estas células se trataban de CMEs. Por ello, se caracterizaron funcionalmente, induciendo la diferenciación de estas células hacia linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico, como se exige en los criterios mínimos propuestos por la *ISCT*. Las CMEs-MO_h fueron diferenciadas hacia estos tres linajes tras permanecer 21 días en cultivo con medios de estimulación adipogénico, osteogénico y condrogénico. En este último caso, este medio se suplementó con 10 ng/ml de *TGF-β3*, apoyándonos en la bibliografía consultada (Thorpe *et al.*, 2010).

La caracterización funcional de las CMEs-MO_h permitió demostrar la capacidad de diferenciación multilinaje de estas células. La diferenciación de estas células hacia osteoblastos fue mayor que hacia adipocitos y condrocitos. Esto se puede explicar desde el punto de vista de la fuente tisular de la que se obtuvieron las CMEs. Se ha demostrado que las CMEs-MO_h muestran un mayor potencial de diferenciación osteogénica que hacia otros tipos celulares (Siegel *et al.*, 2013). Además, las CMEs aisladas de un mismo tejido, pueden contener distintos subgrupos celulares con diferentes fenotipos (Muraglia *et al.*, 2000). Otra de las posibles causas para explicar estas disimilitudes en las diferenciaciones celulares puede estar relacionada con las especies reactivas de oxígeno (*Reactive Species Oxygen, ROS*). Según Atashi *et al.* (2015) las diferenciaciones adipogénica y osteogénica son, en parte, *ROS* dependientes. Así, las *ROS* mitocondriales atenúan la osteogénesis mientras que favorecen la adipogénesis mediante la inducción de factores adipogénicos.

La diferenciación condrogénica reveló pequeñas diferencias entre las células estimuladas y las células control, sobre todo a nivel de compactación de la MEC. Las tinciones histológicas de las células estimuladas mostraron mayor cantidad de Col y de PG. Está ampliamente

establecido en la literatura que el uso de factores de crecimiento como el *TGF- β 3* favorecen la condrogénesis (Zhen y Cao., 2014). Según Hagmann et al, (2013) el efecto de los factores de crecimiento en la expansión celular antes del proceso de diferenciación condrogénica, disminuye al aumentar los pases celulares. En este trabajo, las células con las que se realizaron los experimentos estaban en un pase superior a tres, y además, no se añadió ningún factor de crecimiento al medio de cultivo durante la expansión. Además, otro estudio (Mariani *et al.*, 2014) sostiene que los factores de crecimiento pertenecientes a la superfamilia *TGF- β* pueden promover la degeneración del cartílago articular en pacientes de avanzada edad o que sufran *OA*, dependiendo de las distintas rutas catabólicas que se activen. Como ya se ha comentado anteriormente, las muestras utilizadas provenían de pacientes *OA*.

Existen diversas rutas que favorecen la condrogénesis desencadenadas por un gran número factores de crecimiento, entre los que cabe destacar *Insulin Growth Factor (IGF)-1*, *Fibroblast Growth Factor (FGF)-2* y *Bone Morphogenetic Protein (BMP)-7* (Zhen y Cao., 2014). En este sentido, avanzar en el estudio del funcionamiento de estas rutas para obtener una combinación adecuada de varios factores de crecimiento, puede ser una estrategia interesante para promover la condrogénesis (Cicione *et al.*, 2015).

Otro elemento a tener en cuenta, además del tipo celular y los factores de crecimiento, son los biomateriales. Habitualmente formados por moléculas poliméricas, proporcionan el soporte estructural para la adhesión celular y el consiguiente desarrollo del tejido (Chan y Leong., 2008). El biomaterial empleado en este trabajo estaba compuesto por Col I, un material natural ampliamente utilizado en biomedicina gracias a su biocompatibilidad, baja antigenicidad, adecuada porosidad (Glowacki y Mizuno., 2008) y la capacidad de incorporar otros materiales en su composición para dotarle de distintas propiedades biológicas (Sanjurjo *et al.*, 2015). En él observamos proliferación celular, justificado por los resultados obtenidos con el *PCNA*, tras 16 días de cultivo.

Otra característica deseable en un biomaterial, es que se degrade en un ratio que optimice el crecimiento celular y el desarrollo del nuevo tejido (Sanjurjo *et al.*, 2015). La degradación que sufrió el biomaterial, necesaria para la obtención del nuevo tejido, podía observarse a simple vista. La tinción con H-E confirmó esta degradación y, además, se observó que la población celular sintetizó nueva MEC. El resto de tinciones histológicas mostraron positividad para Col y PG en la nueva MEC sintetizada, mediante las tinciones TM, SO y AT. Por el contrario, resultó negativa para VK, un marcador de diferenciación osteogénica.

En las tinciones inmunohistoquímicas, se evaluó la presencia de distintos componentes de la MEC. Así, la mayor positividad se encontró en la detección de Col II, siendo menos positiva la presencia de AG. En cuanto a componentes como el Col I y Col X, dos tipos de Col cuya positividad no era compatible con la composición del cartílago articular hialino, los resultados fueron de positividad débil. Asimismo, el marcador MMP-13 que mide la presencia de cartílago hipertrófico mostró un resultado negativo.

Estas evidencias pusieron de manifiesto que, efectivamente, la población de CMEs-MOH fue capaz de sufrir condrogénesis tras 16 días de cultivo en el biomaterial. Estos resultados coinciden con la bibliografía consultada (Mathieu *et al.*, 2014). Sin embargo, diversos estudios reportan que añadiendo heparán sulfato en diversas concentraciones a las esponjas de Col I, conseguían en el mismo espacio de tiempo, una mayor formación de MEC (Sanjurjo *et al.*, 2015). Esta mayor cantidad de matriz fue sintetizada debido a que la población celular era mayor que la presente en el modelo con Col I únicamente. Además, los biomateriales compuestos de Col I con heparán sulfato en su composición, se degradaban con mayor rapidez. Este ratio de degradación puede que se ajuste mejor al que necesitan las células para sintetizar nueva MEC. De esta manera, se demuestra que la presencia de PG en el biomaterial utilizado, incide directamente en la formación del neot Tejido y, por tanto, puede ser una buena estrategia de cara a futuros experimentos.

En la última parte de nuestro experimento, se comprobó si los resultados obtenidos en el biomaterial con células, podrían trasladarse a un modelo *in vitro* de reparación de lesión de cartílago articular.

La lesión practicada en el cartílago fue un factor determinante para la elección de la réplica. En nuestro experimento, la lesión alcanzaba una profundidad deseable, con una forma moderadamente regular. Aunque nos encontramos ante una población heterogénea con células de diversa morfología, en general podemos afirmar que las CMEs-MOH se diferenciaron a células con características similares condrocitos, reconocibles por su típica morfología ovalada/circular. En la MEC sintetizada, se apreciaban distintos niveles de compactación y, a pesar de su buena distribución, la tinción con H-E sugirió que la calidad histológica era mejorable. Según la bibliografía consultada, Mobasheri *et al.* (2014) aducía que uno de los principales problemas del desarrollo de modelos *in vitro* disponibles hoy en día, es que ninguno reproduce la organización de los condrocitos *in vivo*.

Según estudios recientes, en constructos que utilizaron CMEs se logró mayor integración en el cartílago en comparación con otros tipos celulares como los condrocitos (Rackwitz *et al.*, 2014). Nuestra integración no fue adecuada, ya que el biomaterial no se adhirió en su parte más interna a la base de la lesión. Se trata de un problema habitual en los modelos de reparación de cartílago y que podría subsanarse con la adición de *cross-linkers* de Col y pegamentos biológicos (Hunzinker, 2002).

Otras limitaciones de los modelos *in vitro* vienen dadas por la ausencia de estímulos biomecánicos, provocando disminución en la síntesis y aumento de la degradación de PG, fibrilación de la superficie articular y disminución del grosor del cartílago (Hermida-Gómez, 2010). El tiempo limitado de cultivo es otra desventaja que presentan los modelos *in vitro* con respecto a modelos animales estudiados en la literatura. Mientras que algunos autores sostienen que el tejido de reparación adquiere características de cartílago con el incremento del tiempo de cultivo en modelos animales (Fuentes-Boquete y Blanco-García, 2004), otros autores obtuvieron hipertrofia de condrocito (Day *et al.*, 2005, Kock *et al.*, 2011).

Como se ha podido comprobar, existen múltiples fuentes celulares, una amplia variedad de factores de crecimiento y multitud de biomateriales que se están investigando en la IT de cartílago. Y, precisamente ahí, radica la gran ventaja de los modelos de reparación *in vitro*. Permiten una gran reproducibilidad, introduciendo diversas condiciones experimentales. A pesar de las dificultades que entraña trasladar todas las variables a un modelo *in vivo* (Johnstone *et al.*, 2013), la investigación con modelos *in vitro* se ha demostrado como una herramienta útil y eficaz.

9. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo y se aisló una población celular de médula ósea humana.
2. La caracterización morfológica y la diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica permitieron considerar a la población celular aislada como una población de CMEs-MOh.
3. Las células aisladas de MO humanas cultivadas sobre biomateriales de Col I mostraron capacidad de crecimiento y de producir nuevo tejido fibrocartilaginoso en el interior de las lesiones del modelo de reparación *in vitro* de cartílago articular humano.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdallah, B. and Kassem, M. (2007). Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Therapy*, 15(2), pp.109-116.
2. Atashi, F., Modarressi, A. and Pepper, M. (2015). The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation: A Review. *Stem Cells and Development*, 24(10), pp.1150-1163.
3. Bernales, D., Caride, F., Lewis, A. and Martin, L. (2004). Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y Ósea guiadas. *Revista Cub De Investigaciones Biomédicas*, 23(2), pp.65-74.
4. Bhosale, A. and Richardson, J. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*, 87(1), pp.77-95.
5. Bian, L., Zhai, D., Tous, E., Rai, R., Mauck, R. and Burdick, J. (2011). Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- β from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 32(27), pp.6425-6434.
6. Bornes, T., Adesida, A. and Jomha, N. (2014). Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Res Ther*, 16(5).
7. Buckwalter, J. and Mankin, H. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, 47, pp.477-486.
8. Buckwalter, J. and Martin, J. (1995). Degenerative Joint Disease. *Clin Symp*, 47(2), pp.1-32.
9. Cañete Crespillo, J., Pablos Álvarez, J. and Blanco García, F. (2007). *Técnicas de investigación básica en reumatología*. Madrid [etc.]: Médica Panamericana.
10. Chan, B. and Leong, K. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17(S4), pp.467-479.
11. Day, T., Guo, X., Garrett-Beal, L. and Yang, Y. (2005). Wnt/ β -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis. *Developmental Cell*, 8(5), pp.739-750.
12. Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Lafont, J., Denoix, J., Audigié, F., Mallein-Gerin, F., Legendre, F. and Galera, P. (2014). Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), pp.2414-2440.
13. Dewan, A., Gibson, M., Elisseeff, J. and Trice, M. (2014). Evolution of Autologous Chondrocyte Repair and Comparison to Other Cartilage Repair Techniques. *BioMed Research International*, 2014, pp.1-11.
14. Dhollander, A., Sánchez, V., Almqvist, K., Verdonk, R., Verbruggen, G. and Verdonk, P. (2012). The Use of Scaffolds in the Treatment of Osteochondral Lesions in the Knee: Current Concepts and Future Trends. *Journal of Knee Surgery*, 25(03), pp.179-186.

15. Díaz-Prado, S., Fuentes-Boquete, I. and Blanco, F. (2010). Cell Therapy and Tissular Engineering to Regenerate Articular Cartilage. *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*, pp.193-216.
16. Evans, N., Gentleman, E. and Polak, J. (2006). Scaffolds for stem cells. *Materials Today*, 9(12), pp.26-33.
17. Ferruzzi, A., Buda, R., Faldini, C., Vannini, F., Di Caprio, F., Luciani, D. and Giannini, S. (2008). Autologous Chondrocyte Implantation in the Knee Joint: Open Compared with Arthroscopic Technique Comparison at a Minimum Follow-up of Five Years. *J Bone Joint Surg*, 90, pp.90-101.
18. Fuentes-Boquete, I., Arufe Gonda, M., Díaz Prado, S., Hermida Gómez, T., de Toro Santos, F. and
19. Blanco García, F. (2007). Tratamiento de lesiones del cartílago articular con terapia celular. *Reumatología Clínica*, 3, pp.S63-S69.
20. Fuentes-Boquete, I., Arufe Gonda, M., Diaz Prado, S., Gomez, T., Santos, F. and Blanco, F. (2008). Cell and Tissue Transplant Strategies for Joint Lesions. *The Open Transplantation Journal*, 2(1), pp.21-28.
21. Gago-Fuentes, R., Carpintero-Fernandez, P., Goldring, M., Brink, P., Mayan, M. and Blanco, F. (2014). Biochemical evidence for gap junctions and Cx43 expression in immortalized human chondrocyte cell line: a potential model in the study of cell communication in human chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(4), pp.586-590.
22. Glowacki, J. and Mizuno, S. (2008). Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*, 89(5), pp.338-344.
23. Glyn-Jones, S., Palmer, A., Agricola, R., Price, A., Vincent, T., Weinans, H. and Carr, A. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, 386(9991), pp.376-387.
24. Gomoll, A. and Minas, T. (2014). The quality of healing: Articular cartilage. *Wound Repair and Regeneration*, 22, pp.30-38.
25. Hagmann, S., Moradi, B., Frank, S., Dreher, T., Kämmerer, P., Richter, W. and Gotterbarm, T. (2013). Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14(1), p.223.
26. Haq, S. and Davatchi, F. (2011). Osteoarthritis of the knees in the COPCORD world. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 14(2), pp.122-129.
27. Herlofsen, S., Bryne, J., Høyby, T., Wang, L., Issner, R., Zhang, X., Coyne, M., Boyle, P., Gu, H., Meza-Zepeda, L., Collas, P., Mikkelsen, T. and Brinchmann, J. (2013). Genome-wide map of quantified epigenetic changes during in vitro chondrogenic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *BMC Genomics*, 14(1), p.105.
28. Hermida-Gómez, T. (2010). Estudio descriptivo de las células madre mesenquimales en la articulación artrósica y su aplicación en terapia celular para reparar cartílago articular humano.
29. Hunziker, E. (2002). Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(6), pp.432-463.

30. Hwang, H. and Kim, H. (2015). Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *IJMS*, 16(11), pp.26035-26054.
31. Johnstone, B., Alini, M., Cucharini, M., Dodge, G., Eglin, D., Guilak, F., Madry, H., Mata, A., Mauck, R., Semino, C. and Stoddart, M. (2013). Tissue Engineering For Articular Cartilage - The State of Art. *European Cells and Materials*, 25, pp.248-267.
32. Johnstone, B., Hering, T., Caplan, A., Goldberg, V. and Yoo, J. (1998). In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Experimental Cell Research*, 238(1), pp.265-272.
33. Kock, L., van Donkelaar, C. and Ito, K. (2011). Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res*, 347(3), pp.613-627.
34. Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K. and Sensebe, L. (2014). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy*, 16(4), p.S81.
35. Kraus, V., Blanco, F., Englund, M., Karsdal, M. and Lohmander, L. (2015). Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(8), pp.1233-1241.
36. Liu, J., Nie, H., Xu, Z., Niu, X., Guo, S., Yin, J., Guo, F., Li, G., Wang, Y. and Zhang, C. (2014). The Effect of 3D Nanofibrous Scaffolds on the Chondrogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells and Their Application in Restoration of Cartilage Defects. *PLoS ONE*, 9(11), p.e111566.
37. Lizarbe, M. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los biomaterials a la Ingeniería Tisular. *Rev.R.Acad.Cienc.Exactas.Nat. (Esp)*, 101(1), pp.227-249.
38. Mainil-Varlet, P., Van Damme, B., Nestic, D., Knutsen, G., Kandel, R. and Roberts, S. (2010). A New Histology Scoring System for the Assessment of the Quality of Human Cartilage Repair: ICRS II. *The American Journal of Sports Medicine*, 38(5), pp.880-890.
39. Makris, E., Gomoll, A., Malizos, K., Hu, J. and Athanasiou, K. (2014). Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol*, 11(1), pp.21-34.
40. Mariani, E., Pulsatelli, L. and Facchini, A. (2014). Signaling Pathways in Cartilage Repair. *IJMS*, 15(5), pp.8667-8698.
41. Mathieu, M., Vigier, S., Labour, M., Jorgensen, C., Belamie, E. and Noël, D. (2014). Induction of mesenchymal stem cells differentiation and cartilage formation by cross-linker-free collagen microspheres. *European Cells and Materials*, 28, pp.82-97.
42. Mazor, M., Lespessailles, E., Coursier, R., Daniellou, R., Best, T. and Toumi, H. (2014). Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: an update. *J. Cell. Mol. Med.*, 18(12), pp.2340-2350.
43. Mobasheri, A., Kalamegam, G., Musumeci, G. and Batt, M. (2014). Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas*, 78(3), pp.188-198

44. Muraglia, A., Cancedda, R. and Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 113, pp.1161-1166.
45. Musumeci, G. (2014). New perspectives for articular cartilage repair treatment through tissue engineering: A contemporary review. *WJO*, 5(2), p.80.
46. Musumeci, G., Aiello, F., Szychlinska, M., Di Rosa, M., Castrogiovanni, P. and Mobasheri, A. (2015). Osteoarthritis in the XXIst Century: Risk Factors and Behaviours that Influence Disease Onset and Progression. *IJMS*, 16(3), pp.6093-6112.
47. Navarro Sarabia, F. and Moreira Navarrete, V. (2013). Estado actual del tratamiento de la artrosis. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(46), pp.2741-2746.
48. Poole, C. (1997). Review. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anatomy*, 191(1), pp.1-13.
49. Rackwitz, L., Djouad, F., Janjanin, S., Nöth, U. and Tuan, R. (2014). Functional cartilage repair capacity of de-differentiated, chondrocyte- and mesenchymal stem cell-laden hydrogels *in vitro*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(8), pp.1148-1157.
50. Richler, C. and Yaffe, D. (1970). The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Developmental Biology*, 23(1), pp.1-22.
51. Sakalauskiene, G. and Jaunikiene, D. (2010). Osteoarthritis: etiology, epidemiology, impact on the individual and society and the main principles of management. *Continuing Medical Education*, 46(11), pp.790-797.
52. Sanjurjo-Rodríguez C., Martínez-Sánchez A.H.; Hermida-Gómez, T; Fuentes-Boquete, I.; Díaz-Prado, S.; Blanco, F.J. (2015). Human Cartilage Tissue Engineering Using Type I Collagen/Heparan Sulfate Scaffolds. *J Regen Med*, 03(02).
53. Sarzi-Puttini, P., Cimmino, M., Scarpa, R., Caporali, R., Parazzini, F., Zaninelli, A., Atzeni, F. and Canesi, B. (2005). Osteoarthritis: An Overview of the Disease and Its Treatment Strategies. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 35(1), pp.1-10.
54. Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H. and Schäfer, R. (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Medicine*, 11(1), p.146.
55. Sophia Fox, A., Bedi, A. and Rodeo, S. (2009). The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach*, 1(6), pp.461-468.
56. Steinert, A., Ghivizzani, S., Rethwilm, A., Tuan, R., Evans, C. and Nöth, U. (2007). Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther*, 9(3), p.213.
57. Thorpe, S., Buckley, C., Vinardell, T., O'Brien, F., Campbell, V. and Kelly, D. (2010). The Response of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Dynamic Compression Following TGF- β 3 Induced Chondrogenic Differentiation. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(9), pp.2896-2909.
58. Vega Alvarez, J., García-Suárez, O., Fernández Monjil, D. and Del Valle Soto, M. (2002).

- Biochemistry and biology of the articular cartilage. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 46(5), pp.391-400.
59. Velasco Peña, M. and Garzón Alvarado, D. (2010). Scaffolds implants for the bone regeneration. Materials, techniques and modeling by means of reaction-diffusion systems. *Revista Cubana de investigaciones Biomédicas*, 29(1), pp.140-154.
 60. Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J. and Noël, D. (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in Biotechnology*, 27(5), pp.307-314.
 61. Wyles, C., Houdek, M., Behfar, A. and Sierra, R. (2015). Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, p.117.
 62. Yamashita, A., Morioka, M., Yahara, Y., Okada, M., Kobayashi, T., Kuriyama, S., Matsuda, S. and Tsumaki, N. (2015). Generation of Scaffoldless Hyaline Cartilaginous Tissue from Human iPSCs. *Stem Cell Reports*, 4(3), pp.404-418.
 63. Zhen, G. and Cao, X. (2014). Targeting TGF β signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35 (5), pp.227-2

11. AGRADECIMIENTOS

Este estudio pudo llevarse a cabo gracias al apoyo de:

- Servizo Galego de Saúde.
- Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red-Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN).
- Red Gallega de Terapia Celular (REDICENT, R2014/050) y Grupo con Potencial de Crecimiento (GPC, GPC2014/048), Xunta de Galicia.
- Bruna Parma (OPOCRIN S.p.A., Italia) por el suministro de los biomateriales de Col.
- Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña, INIBIC.
- Universidade da Coruña, UDC.
- Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Departamento de Medicina, Universidade da Coruña.
- Cátedra Bioibérica de la Universidade da Coruña.
- Fundación Profesor Novoa Santos.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores, la Dra. Silvia Díaz Prado y el Dr. Isaac Fuentes Boquete por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutela. Gracias por vuestra confianza, paciencia y por todas las enseñanzas que me habéis proporcionado.

Asimismo, quiero agradecer al director científico del INIBIC, el Dr. Francisco J. Blanco por poner a mi disposición todos los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Quisiera agradecer de manera muy especial a Clara y Rocío por guiarme en el día a día, ofreciéndome su apoyo, sus conocimientos y su total disponibilidad para resolver todas mis dudas.

Agradecer a todo el personal del Grupo de Reumatología, en especial a la Dra. Tamara Hermida Gómez y a María José Sánchez por ofrecerme todas sus enseñanzas y consejos. A los Servicios Centrales de Histomorfología, Purificación Filgueira y Noa Goyanes, por su inestimable colaboración y al Departamento Ortopédico del CHUAC, por las muestras proporcionadas para llevar a cabo los experimentos.

Gracias al Máster en Biotecnología Avanzada de la Universidade da Coruña, en la persona de su coordinador, el Dr. Manuel Becerra Fernández por facilitarme la incorporación al INIBIC.

Y por último, gracias a mis padres y a mi hermana, por ofrecerme su apoyo y su cariño y por sentirlos siempre tan cerca a pesar de la distancia.

12. ANEXOS



INFORMACIÓN PARA O PACIENTE E CONSENTIMENTO INFORMADO

D. / Dna.:

INTRODUCCIÓN.-

Propónselle participar nun proxecto de investigación sobre enfermidades do aparato locomotor que será realizado polo Servizo de Reumatoloxía do Complexo Hospitalario Universitario A Coruña, baixo a dirección do Dr. Blanco. Este proxecto será realizado na Unidade de Investigación do C.H.U. A Coruña.

OBXETIVO DO PROXECTO.-

O obxectivo deste estudo céntrase en estudar os mecanismos que participan na patoxénese das enfermidades do aparato locomotor.

DESCRICIÓN DO PROXECTO.-

Vostede foi sometido a unha intervención cirúrxica na que se lle extraeron tecidos articulares os cales, seguindo a normativa de eliminación de residuos biolóxicos, serán incinerados. Se vostede decide participar neste estudo, os seus tecidos, en lugar de ser eliminados, serán enviados á Unidade de Investigación do C.H.U. A Coruña para que se almacenen no Banco de Mostras do devandito Hospital para, posteriormente, realizar os estudos de investigación encamiñados a coñecer mellor por que se producen algunhas enfermidades do aparato locomotor.

Así mesmo solicítaselle autorización para a extracción de saliva ou 10 ml de sangue, sendo extraída esta última seguindo o procedemento rutineiro para efectuar análise estándar de sangue.

RISCOS.-

Vostede non vai sufrir ningún tipo de inconveniente ou risco físico adicional ao da

propia intervención cirúrxica á que se lle someteu, por consentir a utilización das mostras que se lle extraeron durante esta.

COMPENSACIÓN.-

Vostede non recibirá ningún tipo de compensación económica ou de calquera outro tipo pola súa participación, independentemente de que os resultados dos estudos que se van realizar poidan dar lugar a patentes con fins médicos.

CONFIDENCIALIDADE.-

Toda a información que se obteña de analizar a súa mostra, así como toda a información clínica referente a vostede utilizada nas investigacións futuras, será considerada confidencial e tratada en consecuencia, de acordo co establecido na Lei Orgánica 15/1999, do 13 de Decembro, de Protección de Datos de Carácter Persoal e a Lei 14/2007, de 3 de Xullo de Investigación Biomédica. Para garantir a confidencialidade da súa identidade (asegurar que a información da súa mostra de sangue non se relaciona coa súa identidade), a súa mostra só irá identificada dende o mesmo momento da extracción cun código. Só este código, e nunca a súa identidade aparecerá nas bases de datos onde figure a información clínica ou xenética referida a vostede. A relación entre o seu código e a súa identidade quedará custodiada polo persoal autorizado do equipo investigador, adoptándose as medidas necesarias para que tal información non estea dispoñible salvo para o persoal autorizado, o cal ten o deber legal de gardar segredo. Deste xeito podemos asegurar que calquera información que se obteña a partir da súa mostra de sangue permaneza confidencial.

É importante que entenda que existe a posibilidade de que os seus datos e parte da súa mostra sexan transferidos a outros equipos de investigación que traballen no mesmo campo. En tal caso, asegurarse que estes datos sexan tratados coa mesma confidencialidade descrita anteriormente. Por outro lado, é posible que os resultados das investigacións sexan publicados na literatura científica, pero entendendo estes resultados como os obtidos da totalidade das mostras, non os resultados individuais. Se este fose o caso, a súa identidade permanecerá completamente confidencial e nunca formará parte de ningunha publicación.

Coa súa aceptación a participar no proxecto, vostede accede a que esta información poida ser transferida nas mencionadas condicións.

NOVOS ACHADOS E RESULTADOS.-

Como xa se describiu, adoptaranse estritas medidas de seguridade para garantir a confidencialidade dos resultados dos estudos realizados. A avaliación dos resultados farase só por grupos (por exemplo, homes / mulleres, grupos de idade, etc.) e non de forma individual. Debe comprender que os resultados de valor que se puidesen obter provirían do estudo de múltiples mostras, e en ningún caso da súa exclusivamente. As implicacións médicas dos resultados das distintas probas, se é que os hai, só serán coñecidas cando se completen os proxectos de investigación. Vostede debe saber que, en cumprimento da Lei 14/2007, do 3 de Xullo, de Investigación Biomédica, ten dereito a coñecer ou, non a información obtida coa análise das súas mostras.

No caso de que vostede decida non ser informado, a lei establece que cando a información obtida sexa necesaria para evitar un grave prexuízo para a saúde dos seus familiares biolóxicos, se poderá informar os afectados ou os seus representantes legais.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA.-

A súa participación no proxecto de investigación é totalmente voluntaria. Se asina o consentimento informado, confirmará que desexa participar. Pode negarse a participar ou retirar o seu consentimento en calquera momento posterior á firma sen ter que explicar os motivos.

Se decide retirar o seu consentimento, a súa mostra será destruída e só se gardará a información obtida ata ese momento.

O seu non-participación ou retirada posterior do consentimento non afectará en modo ningún á súa asistencia médica presente ou futura.

OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL. –

Vostede pode contactar con calquera membro do Servizo de Reumatoloxía do C.H.U. A Coruña se lle xorde calquera dúbida sobre a súa participación neste proxecto ou sobre os seus dereitos como paciente, no teléfono 981176399. En todo momento se poñerán os medios necesarios para facilitarlle a información máis axeitada.

CONSENTIMENTO INFORMADO DO PACIENTE

Eu, _____(nome do paciente),

Lin a información que se me entregou.

Puiden facer preguntas sobre o proxecto.

Recibín suficiente información sobre este.

Falei diso con _____

Comprendo que a miña participación é voluntaria.

Comprendo que podoo retirar o meu consentimento:

1º. Cando queira.

2º. Sen ter que dar explicacións.

3º. Sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.

Presto libremente a miña conformidade para participar no proxecto.

ASINADO DO PACIENTE

Nome

Data

Expliquei por completo os detalles relevantes deste proxecto ao doador e/ou a persoa autorizada a dar o consentimento no seu nome.

ASINADO

Nome

Data

CONSENTIMENTO INFORMADO DO ACOMPAÑANTE

Eu, _____ (nome do acompañante do paciente), con DNI: _____ e en calidade de _____ (parentesco co doador) certifico que a _____ (nome do paciente)

Léuselle a información establecida neste escrito

Entregóuselle copia desta información.

Puido facer preguntas sobre o proxecto.

Recibiu suficiente información sobre este.

Falamos diso con _____

Comprende que a súa participación é voluntaria.

Comprende que pode retirar o seu consentimento:

1º. Cando queira.

2º. Sen ter que dar explicacións.

3º. Sen que isto repercuta nos seus coidados médicos.

Presta libremente a súa conformidade para participar no proxecto

Autorízame a asinar no seu nome.

ASINADO DO ACOMPAÑANTE DO PACIENTE **Nome** **Data**

Expliquei por completo os detalles relevantes deste proxecto ao doador e/ou a persoa autorizada a dar o consentimento no seu nome.

ASINADO **Nome** **Data**