

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



## **TESIS DOCTORAL**

Efectos de la utilización de membrana amniótica en fresco en la  
regeneración condral en ovejas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Diego Jesús García Rodríguez**

Directores

**Javier Vaquero Martín**  
**Francisco Forriol Campos**

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Cirugía**



**EFFECTOS DE LA UTILIZACIÓN DE MEMBRANA  
AMNIÓTICA EN FRESCO EN LA REGENERACIÓN  
CONDRALE EN OVEJAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Diego Jesús García Rodríguez**

Directores:

**Javier Vaquero Martín  
Francisco Forriol Campos**

**Madrid, 2012**

Don Javier Vaquero Martín, Profesor Titular de Cirugía Ortopédica y Traumatología de la Universidad Complutense de Madrid, y Jefe del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo titulado, **Efectos de la utilización de membrana amniótica en fresco en la regeneración condral en ovejas**, realizado bajo mi dirección por el licenciado don Diego Jesús García Rodríguez, reúne todos los requisitos científicos y formales para proceder a su lectura y defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, y a petición del interesado, firmo el presente certificado en Madrid, a 20 de Febrero de 2012.



Fdo.: Prof. Javier Vaquero Martín

Don Francisco Forriol Campos, Catedrático de Anatomía Humana y de Cirugía Ortopédica y Traumatología de la Universidad CEU San Pablo de Madrid

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo titulado, **Efectos de la utilización de membrana amniótica en fresco en la regeneración condral en ovejas**, realizado bajo mi dirección por el licenciado don Diego Jesús García Rodríguez, reúne todos los requisitos científicos y formales para proceder a su lectura y defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, y a petición del interesado, firmo el presente certificado en Madrid, a 20 de Febrero de 2012.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Forriol', with a horizontal line drawn across the bottom of the signature.

Fdo.: Dr. Francisco Forriol Campos

*A mi mujer, Yanira, por estar siempre a mi vera.*

## **AGRADECIMIENTOS**



A los doctores D. Javier Vaquero Martín y D. Francisco Forriol Campos, cuya dirección y asesoramiento ha permitido la culminación de esta Tesis.

A mis excompañeros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón por su amistad ofrecida y los buenos momentos vividos.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital General Universitario Puerta de Hierro por su acogida y aliento.

Al Departamento de Investigación del Hospital de FREMAP de Majadahonda, durante el periodo de desarrollo de la tesis, en especial al Dr. Forriol, a Raúl y a Elsa.

A mis padres, por haberme infundido su capacidad de esfuerzo y trabajo sin olvidar nunca el verdadero sentido de la vida. A ellos les debo todo lo que soy.

A mis hermanos y a mis suegros por su continuo apoyo.

Por último y de manera muy especial a mi mujer, Yanira. Sin su constante ánimo y su profundo cariño no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
▪ <b>Biología del cartílago articular.....</b>	<b>4</b>
▪ <b>Incidencia de las lesiones del cartílago articular.....</b>	<b>6</b>
▪ <b>Tipos de lesiones del cartílago articular.....</b>	<b>7</b>
▪ <b>La membrana amniótica.....</b>	<b>16</b>
▪ <b>Propiedades de la membrana amniótica.....</b>	<b>20</b>
- <i>Células pluripotenciales de la membrana amniótica.....</i>	<i>23</i>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.....</b>	<b>33</b>
▪ <b>Obtención de la membrana amniótica.....</b>	<b>34</b>
▪ <b>Modelo experimental.....</b>	<b>36</b>
- <i>Cuidados y mantenimiento de los animales.....</i>	<i>36</i>
- <i>Cuidados pre-operatorios.....</i>	<i>36</i>
- <i>Preparación.....</i>	<i>36</i>
- <i>Anestesia de animal.....</i>	<i>38</i>
- <i>Cirugía según los grupos.....</i>	<i>39</i>
- <i>Cuidados post-operatorios.....</i>	<i>44</i>
- <i>Sacrificio de los animales.....</i>	<i>44</i>
▪ <b>Estudios realizados.....</b>	<b>45</b>
- <i>Histología.....</i>	<i>45</i>
- <i>Cultivo de las células pluripotenciales mesenquimales....</i>	<i>47</i>
- <i>Análisis estadístico.....</i>	<i>48</i>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>

▪ <b>Resultados clínicos.....</b>	<b>50</b>
▪ <b>Resultados macroscópicos.....</b>	<b>50</b>
▪ <b>Histología.....</b>	<b>53</b>
- <i>Grupo control.....</i>	<i>53</i>
- <i>Grupo membrana amniótica congelada.....</i>	<i>55</i>
- <i>Grupo de microfracturas.....</i>	<i>63</i>
- <i>Grupo con células madre mesenquimales cultivadas.....</i>	<i>74</i>
- <i>Grupo de membrana en fresco.....</i>	<i>85</i>
- <i>Resumen de los hallazgos histológicos.....</i>	<i>94</i>
▪ <b>Escala de O´Driscoll.....</b>	<b>95</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>98</b>
▪ <b>Objetivo del tratamiento de las lesiones del cartílago hialino.....</b>	<b>99</b>
▪ <b>Diseño del estudio.....</b>	<b>101</b>
▪ <b>Membrana amniótica como fuente celular.....</b>	<b>105</b>
▪ <b>Membrana amniótica como matriz tridimensional.....</b>	<b>108</b>
▪ <b>Membrana amniótica y factores de crecimiento.....</b>	<b>114</b>
▪ <b>Influencia de los distintos métodos de conservación de la membrana amniótica en su potencial uso en ingeniería tisular.....</b>	<b>118</b>
▪ <b>Futuro en el tratamiento de las lesiones del cartílago articular.....</b>	<b>122</b>
▪ <b>Limitaciones.....</b>	<b>123</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>124</b>

7. BIBLIOGRAFÍA..... 126

## Índice de figuras

- Figura 1. Estructura del cartílago hialino..... 3
- Figura 2. Estructura de la placenta.....17
- Figura 3. Estructura de la membrana amniótica..... 18
- Figura 4. Histología de la membrana amniótica..... 20
- Figura 5. Formación del disco germinativo bilaminar al 8<sup>o</sup>-9<sup>o</sup> día de la fecundación..... 24
- Figura 6. Formación de la cavidad amniótica..... 24
- Figura 7. Gastrulación..... 25
- Figura 8. Tipos celulares de la membrana amniótica..... 26
- Figura 9. Placenta y varios fragmentos de membrana amniótica recién obtenidas..... 35
- Figura 10. Membrana amniótica aplicada sobre papel de nitrocelulosa en placa de Petri..... 35
- Figura 11. Anestesia, colocación y preparación de la oveja en la mesa de quirófano..... 37
- Figura 12. Preparación del campo quirúrgico..... 38
- Figura 13. Artrotomía parapatelar medial..... 39
- Figura 14. Exposición del cóndilo femoral interno de la oveja..... 40
- Figura 15. Delimitación de la lesión condral sobre el cóndilo femoral con escoplos..... 40
- Figura 16. Desarrollo de la lesión condral..... 41
- Figura 17. Lesión condral que no alcanza el hueso subcondral..... 41
- Figura 18. Lesión condral tapizada por la membrana amniótica dispuesta en multicapas..... 42
- Figura 19. Desarrollo de la técnica utilizada para el mantenimiento de la membrana en la lesión..... 43
- Figura 20. Desarrollo de las microfracturas sobre la lesión condral generada..... 44
- Figura 21. Muestra macroscópica de una lesión tras el estudio..... 50
- Figura 22. Varias muestras macroscópica de lesiones tras el estudio..... 51
- Figura 23. Tejido fibroso sobre la lesión condral en una de las muestras del estudio..... 51-52

- Figura 24. Varias muestras con restos de membrana amniótica que permanecían sobre la lesión al final del estudio..... 52
- Figura 25. Muestras donde se observa una alteración de la superficie tibial al final del estudio..... 53
- Figura 26. Muestra histológica del grupo control: ausencia de respuesta reparativa..... 53
- Figura 27 A y B. Muestra histológica del grupo control: ausencia de actividad celular..... 54
- Figura 28. Muestra histológica del grupo con membrana congelada: intento reparativo en la zona perilesional sana..... 55
- Figura 29 A, B y C. Muestra histológica del grupo con membrana congelada: integración de la membrana en el tejido perilesional sano..... 56-57
- Figura 30 A y B. Muestra histológica del grupo de microfacturas: tejido fibroso en el interior de los orificios realizados..... 63-64
- Figura 31. Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas: aparición de grupos celulares isogénicos..... 74
- Figura 32. Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas: aparición de grupos celulares isogénicos..... 74
- Figura 33. Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas aparición de grupos celulares isogénicos..... 75
- Figura 34. Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas: numerosos clusters..... 75
- Figura 35 A y B. Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas: estructura de la membrana..... 76
- Figura 36. Muestra histológica del grupo con membrana en fresco: aparición de clusters celulares..... 85
- Figura 37. Muestra histológica del grupo con membrana en fresco: clusters con un gran número de células en su interior..... 85
- Figura 38. Muestra histológica del grupo con membrana en fresco: localización apical de los clusters..... 86
- Figura 39. Muestra histológica del grupo con membrana en fresco: situación de los clusters en la matriz extracelular cartilaginosa..... 86
- Figura 40. Muestra histológica del grupo con membrana en fresco: elevado contenido en proteoglicanos en la tinción con safranina..... 87

- Figura 41. Muestra histológica del grupo con membrana en fresco: estructura de la membrana..... 87
- Figura 42. Muestra histológica donde se observa la aparición de clusters celulares en el interior de la lesión cartilaginosa en el grupo de la membrana amniótica en fresco..... 106
- Figura 43. Intensa tinción de las muestras histológicas en el grupo de la membrana amniótica en fresco..... 107
- Figura 44. Corte histológico donde se observa la integración de la membrana amniótica con los bordes de la lesión..... 112
- Figura 45. Corte histológico teñido con safranina donde se observa la integración de la membrana amniótica con los bordes de la lesión..... 112
- Figura 46. Adhesividad y viscoelasticidad de la membrana amniótica..... 113

## Índice de tablas

- Tabla 1. Escala de O´Driscoll..... 47
- Tabla 2. Resultados de la escala de O´Driscoll en las distintas muestras..... 95
- Tabla 3. Representación gráfica de los resultados de la escala de O´Driscoll en las distintas muestras..... 96
- Tabla 4. Resultados de la escala de O´Driscoll (tinción con safranina) en las distintas muestras..... 96
- Tabla 5. Puntuación media de los resultados de la escala de O´Driscoll en las distintas muestras..... 97

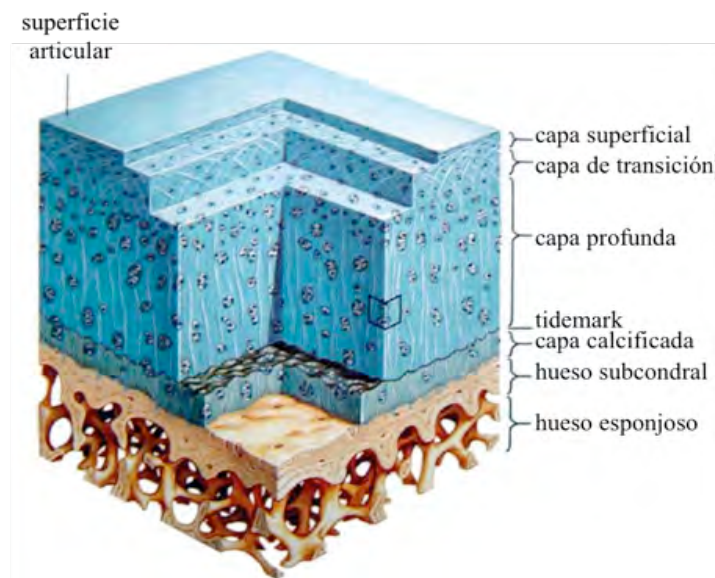
## **1. INTRODUCCIÓN**

Existe un interés creciente en los últimos tiempos por desarrollar técnicas que consigan la reparación de las lesiones del cartílago articular. Desde el siglo XVIII los tratamientos de las lesiones cartilaginosas de la rodilla han sufrido un cambio continuo en un intento de encontrar la solución a un problema que hoy por hoy todavía no se ha resuelto (1). Años atrás, esta patología se dejaba evolucionar hasta realizar una sustitución articular o se realizaban gestos mínimos sobre la misma, sin control de los resultados (2). En la actualidad, este concepto ha cambiado y cada vez son más los esfuerzos que surgen en un intento de poder regenerar este tejido del que se reconoce su incapacidad para realizarse por sí mismo.

El cartílago articular es un tejido conectivo viscoelástico. Macroscópicamente es blanco, brillante y liso. Está localizado en las diartrodias. Transfiere y distribuye las sollicitaciones en distintas posiciones articulares (3) y, junto con el líquido sinovial, ofrece una superficie articular lubricada, reduciendo la fricción y permitiendo que los huesos se deslicen y giren uno sobre otro sin desgastarse. Se ve sometido a un promedio de 10 millones de ciclos de carga articular por año (4). Carece de nervios, vasos sanguíneos y linfáticos. Se nutre del líquido sinovial, por un mecanismo de difusión que se realiza durante la carga articular.

Básicamente está constituido una población homogénea celular, los condrocitos, y por una densa y única matriz extracelular (MEC), formada fundamentalmente por macromoléculas estructurales (proteoglicanos y fibras de colágeno) y agua, la cual es responsable de sus características biomecánicas. Los condrocitos son los responsables tanto de la síntesis como de la degradación de los componentes de dicha matriz. Clásicamente se divide en cuatro zonas (figura 1), la capa superficial, la capa de transición, media o radial, la capa profunda y el cartílago calcificado (4). En cada una de ellas varían la estructura y composición, el volumen y la forma celular, el diámetro y la orientación de las fibras de colágeno, así como la concentración de

proteoglicanos.



**Figura 1.** Estructura del cartílago hialino.

El grosor total del cartílago articular varía según las diferentes especies, según la localización anatómica dentro de una articulación y según la congruencia de la articulación de forma que es más grueso en las articulaciones más incongruentes.

El condrocito y la matriz que lo rodea se denominan condrón y constituye la unidad anatómica y mecánica del cartílago. La matriz pericelular es rica en proteoglicanos sulfatados y proteínas no colagénicas, hialuronato (5) y en colágeno tipo VI (6), formando una especie de cesta alrededor de los condrocitos que los protege frente a las cargas y las deformaciones. Esta matriz se encarga de satisfacer sus necesidades metabólicas, unir las membranas celulares, y proteger las células del daño originado por las deformaciones mientras que la matriz extracelular interterritorial define las propiedades mecánicas del tejido.

## BIOLOGÍA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago articular es un tejido dinámico capaz de sintetizar, degradar y regular de forma constante todos los componentes de la matriz extracelular. Durante toda la vida sufre un remodelado interno. Los condrocitos reemplazan las moléculas de la matriz perdidas a través de la degradación. Para la realización de estas funciones sus mecanismos metabólicos se ven influenciados por los factores de crecimiento y las interleuquinas. Con la edad, estas células especializadas del cartílago, pierden la capacidad de mantener y restaurar su propia estructura y con ello aumenta el riesgo de degeneración de la superficie articular. La alteración de la regulación de la síntesis (anabólica) y la actividad de reabsorción (catabólica) de los condrocitos residentes, resulta en una pérdida neta de los componentes de la matriz cartilaginosa y deterioro en las propiedades funcionales y estructurales del cartílago. Quiere decir que el deterioro de la función de los condrocitos se acompaña de cambios en la matriz extracelular. El efecto que produce la edad en los condrocitos humanos es una disminución en la actividad mitótica y sintética (7) (8) y una menor respuesta a los estímulos anabólicos (9-11). Los mecanismos de acción de ambos grupos de factores, tanto anabólicos como catabólicos (12), son múltiples, potenciando o inhibiendo la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (colágenos, agreganos, etc.) y modulando la actuación de moléculas que degradan el cartílago, como son las proteasas, o los inhibidores tisulares de las mismas.

Sokoloff (3) consideró al cartílago articular, el líquido sinovial, la membrana sinovial y el hueso subcondral como una unidad funcional a la que hoy se deben añadir el intercambio de oxígeno, de nutrientes y la liberación de hormonas y factores de crecimiento (13). Estos últimos, son moléculas solubles cuya función es esencial en las interacciones célula-célula. Ejercen sus efectos por vía paracrina, en la que los productos de una célula modulan las actividades de las adyacentes, o por vía

autocrina, cuando los productos de una célula actúan directamente sobre sí misma. Realizan su acción sobre las células “diana” mediante la unión a un receptor específico que inicia, por un sistema de transducción de señales a través de segundos mensajeros, la activación de genes nucleares que determinan la proliferación, la diferenciación o la muerte celular.

Las principales familias de factores de crecimiento relacionados con la biología del cartílago articular son las del IGF, TGF, PDGF, EGF, FGF y las neurotrofinas (14). A pesar de lo mucho que se han estudiado los efectos de los factores de crecimiento sobre el cartílago articular los resultados publicados son pocos homogéneos y en muchos casos contradictorios. Se admite que los principales efectos de los factores de crecimiento sobre los condrocitos son la estimulación de la síntesis de la matriz extracelular del cartílago y la inhibición o activación de las proteasas (15-17). Las proteasas, y más específicamente las metaloproteinasas de la matriz (MMP), son un grupo de enzimas sintetizadas por el condrocito, presentes en la matriz extracelular, cuya principal función es la renovación constante de los componentes de la matriz (18) (19). Son producidas tanto en condiciones normales como patológicas, formando parte del complejo sistema para mantener la matriz. Los colágenos intersticiales (tipo I, II y III) son los principales blancos de destrucción, y las colagenasas secretadas (MMP-1 y MMP-13) tienen una función primordial en este proceso. Es probable que la sobreactividad de algunas de estas enzimas sea la responsable de la degradación del cartílago en procesos como la artrosis y la artritis reumatoide. Su actividad está controlada por unos inhibidores (inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, TIMP (20). Ambos, MMP y TIMP, son un factor importante en el proceso condrolítico que contribuye a los cambios degenerativos del cartílago (21-23) y son sintetizadas por los condrocitos y células de la sinovial (20-23).

## INCIDENCIA DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

Anualmente se realizan unas 500.000 cirugías sobre el cartílago en Estados Unidos (24). La frecuencia real de las lesiones traumáticas del cartílago y osteocondrales es desconocida. Shelbourne et al. (25), en 2270 reconstrucciones de LCA encontraron 125 lesiones articulares (Outerbridge tipo 3 y 4) con el menisco intacto. También se han encontrado en un 23% de las lesiones agudas del LCA y en un 54% de las lesiones crónicas del LCA, laxitud o inestabilidad (26) (27).

Los trabajos de Curl y Hjelle (28) (29) señalan que la incidencia de los defectos articulares en la población es del 5%. La Prade et al. (30) en sujetos asintomáticos encontraron cambios patelofemorales en el 3.7% de su población de estudio, mientras que la incidencia en grupos con trabajos intensos y actividades deportivas alcanza entre el 22 y el 50%. Kaplan et al. (31), evaluaron a jugadores de baloncesto asintomáticos, y encontraron una incidencia de lesiones de cartílago articular por RMN, de un 47.5% mientras que Major y Helms (32) encontraron un 41% de lesiones cartilaginosas en jugadores juveniles. Se ha descrito que un 10% de los pacientes que presentan una lesión aguda de rodilla con hemartros después de un traumatismo, presentarán una lesión osteocondral (33). Aroen et al. (34) analizaron las artroscopias realizadas en tres centros hospitalarios durante seis meses, revisando un total de 1005 rodillas. Las radiografías preoperatorias mostraron un 13% de articulaciones con signos degenerativos. Encontraron patología condral, de diversa consideración, en el 66% de los casos, y un defecto condral en el 20% de las rodillas, mientras que una lesión profunda (ICRS grado 3 y 4) se encontró en el 11%, y un 6% de todas las rodillas tenían defectos superiores a 2 cm<sup>2</sup>. Curl et al. (28), revisaron más de 31.000 artroscopias de rodilla en pacientes con síntomas en sus rodillas, con una media de edad de 43 años y encontraron lesiones condrales en el 63% de los pacientes. Observó además, que en los pacientes menores de 40 años, un 5% tenían un

Outerbridge grado IV en el cóndilo femoral interno. Hjelle et al. (29) evaluaron prospectivamente 1000 artroscopias por lesiones osteocondrales y encontraron que un 61% de los pacientes tenían lesiones del cartílago con una extensión media de 2,1 cm<sup>2</sup>.

El método ideal para diagnosticar las lesiones del cartílago articular de la rodilla es la visualización artroscópica. La RMN se ha introducido como una técnica no invasiva con un grado elevado de fiabilidad. Sin embargo, se ha discutido sus garantías. Friemert et al. (35), señalan una sensibilidad del 33 al 53% y una especificidad entre el 98 y el 99% para detectar lesiones del cartílago comparando con la artroscopia. Estos datos contrastan con los de Palosaari et al. (36) quienes reflejan una sensibilidad entre el 80 y 96%.

La historia natural de estas lesiones no ha sido todavía documentada. Se asume que estos defectos condrales u osteocondrales pueden aumentar progresivamente y jugar un papel en el desarrollo de cambios artrósicos. La prevalencia de cambios artrósicos radiográficos en adultos en los EEUU se estima en un 32.5% o 42.4 millones. El 80% ocurren mayores de 55 años (37). La enfermedad sintomática ocurre en un 25% de aquellos con lesiones radiográficas (38). La artrosis tiene un impacto importante en los sistemas de salud. Se estima que el 9% de la población de los EEUU por encima de 30 años padece clínicamente artrosis (39).

## **TIPOS DE LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

El cartílago articular tiene poca o carece de capacidad para repararse. Es probable que la ausencia de vasos sanguíneos, la falta de movilidad celular, la densa matriz extracelular o el pequeño número de células progenitoras sean las causas. La

capa más profunda del cartílago articular, la llamada zona calcificada, separa al cartílago propiamente dicho del hueso subcondral y con ello de los vasos sanguíneos.

Podemos diferenciar de forma básica dos tipos de lesiones cartilaginosas:

1. Superficiales o de espesor parcial, aquellas en las que no se alcanza al hueso subcondral (no traspasan la capa calcificada). Suponen el 95% de las lesiones (29).
2. Profundas o de espesor completo, aquellas que alcanzan al hueso subcondral subyacente.

Esta diferenciación es importante porque toda lesión que no alcance al hueso subcondral y con ello a los vasos sanguíneos no va a demostrar ninguna respuesta reparadora. Por el contrario, aquella que si lo logre, va a producir una reparación espontánea a cargo de células mesenquimales derivadas de la médula ósea y del espacio vascular (*respuesta extrínseca*). Sin embargo esta reparación va a ser limitada en cuanto a la cantidad y calidad del tejido regenerado. Este tejido neoformado no va a tener ni la misma composición bioquímica (es fibrocartílago y no cartílago hialino con colágeno tipo II) ni el mismo comportamiento biomecánico que el tejido nativo. Además, incluso no va a ser capaz de perdurar como tal de forma indefinida sino que irá perdiendo sus propiedades y con ello su eficacia con el tiempo. Es por ello por lo que se considera que los defectos cartilaginosos tienen una *capacidad intrínseca* (producida por los propios condrocitos) de curación muy limitada. Carece de células pluripotenciales capaces de regenerar el tejido perdido. Embriológicamente el cartílago articular se forma a partir de células mesenquimales que se agrupan y comienzan a sintetizar una matriz alrededor. Estas células llegan a organizarse y son reconocidas como cartílago cuando acumulan la matriz que separa a las células. Morfológicamente estas células van adquiriendo una forma más esférica. Cuando el cartílago madura hay una pérdida de las células multipotenciales y los

nuevos condrocitos pierden la capacidad de migrar, proliferar y participar en una respuesta reparativa. Estas características limitan seriamente la curación potencial del cartílago articular. Los condrocitos maduros también tienen una limitada capacidad para incrementar la síntesis de la matriz que les rodea. Hay una degeneración celular programada que limita la capacidad de responder a estímulos y sintetizar algunos tipos de proteoglicanos (1).

Se ha descrito un tercer tipo de respuesta de reparación que es el llamado *flujo de cartílago o de matriz* (“cartilage flow” o “matrix flow”) que es el que surge de los bordes de la lesión, a modo de ola, migrando desde el perímetro de la lesión al centro de la misma (40).

Una lesión parcial produce solamente una inducción temporal de la replicación de los condrocitos y de la síntesis de matriz extracelular en las áreas adyacentes al defecto. La respuesta inflamatoria que típicamente se observa en los procesos curativos de otros tejidos es solo observada en los defectos de espesor completo que penetran en el hueso subcondral (41).

Se sabe poco de la evolución natural de estas lesiones. Una lesión cartilaginosa al repararse no forma nunca el mismo tejido. Una lesión osteocondral puede rellenarse de colágeno tipo II con tejido de reparación que a los 2 años comenzará a fibrilarse y posiblemente a degenerar. Por eso, no está claro si todas las lesiones condrales deben ser reparadas. Los pacientes con una lesión condral tienen periodos de tiempo asintomáticos seguidos de otros con molestias o dolor soportable. Sin embargo, no existen resultados de larga evolución que comparen los tratamientos con la historia natural del proceso. Son necesarios estudios epidemiológicos para analizar y conocer los factores que determinan las lesiones que acabarán afectando de forma generalizada al cartílago articular.

El objetivo del tratamiento quirúrgico de las lesiones del cartílago articular es en primer lugar, conseguir reparar el defecto con métodos poco agresivos. Crear un tejido de reparación con características bioquímicas, estructurales y funcionales equivalentes a las del cartílago hialino natural.

Han sido propuestos varios métodos quirúrgicos para intentar regenerar el cartílago articular. Todos ellos tienen problemas inherentes a cada procedimiento. No hay ninguna técnica que garantice un buen resultado y hay pocos métodos que restauren el cartílago hialino y produzcan un tejido morfológica y biomecánicamente similar al cartílago original. Actualmente se desconocen los factores que contribuyen a conseguir una reparación con éxito. También resulta desconocida, la duración del tejido reparado y la relación coste-beneficio. Muchas de las cirugías utilizadas actualmente basadas en la biotecnología se asocian con un elevado coste y alta morbilidad (42). Se han hecho diferentes algoritmos de tratamiento, uno de los más conocidos y seguidos es el propuesto por Cole et al. (43) quienes se fijan en dos aspectos, el tamaño de la lesión y la actividad del paciente. Sin embargo, al contrario de lo esperado, no se ha establecido una relación entre el tamaño del defecto y la evolución clínica después del tratamiento (44-46). La actividad del paciente debería tener una influencia en el resultado (47) y parece mejor la evolución en pacientes activos que en los sedentarios. También deben considerarse el tiempo de evolución, la edad y, especialmente, la profundidad de la lesión. Cuanto más jóvenes son los pacientes mejores resultados obtienen; son mejores en pacientes menores de 30 años (47-50) y también se ha visto una interdependencia con el tiempo que cada paciente tuvo que esperar desde la aparición de los síntomas hasta la cirugía (44) (51). Estos hallazgos pueden estar relacionados con el envejecimiento celular y de los tejidos y, por lo tanto, con la respuesta regenerativa. La edad puede estar relacionada con el proceso degenerativo alrededor del defecto o como factor perturbador de la articulación (52). Hay otros aspectos secundarios a considerar, como son la integridad

articular (el estado de los meniscos o de los ligamentos y el morfotipo o alineación de la extremidad inferior que obligan a cirugías complementarias pero ninguna de ellas es decisiva para seguir un tratamiento), el sobrepeso del paciente (un índice de masa corporal mayor de 30 ofrece peores resultados (53) o la localización de la lesión (no se comporta de la misma forma una lesión rotuliana que de la meseta tibial o de los cóndilos femorales (44) (54).

Tradicionalmente se han agrupado en tres, las formas de intentar curar una lesión cartilaginosa. La primera consiste en reparar la lesión, aumentando la capacidad intrínseca de curación del propio cartílago lesionado. Esto resulta muy dificultoso debido a que el cartílago hialino es un tejido avascular y el carece de células pluripotenciales con capacidad reparadora. La segunda consiste en remplazar el cartílago dañado por un injerto osteocondral. Sustituir por otro tejido cuyo objetivo es que cumpla la función del anterior. Es el también llamado trasplante osteocondral. La tercera forma consiste en intentar regenerar el cartílago articular dañado mediante el crecimiento de un nuevo cartílago. En búsqueda de este último se puede intentar imitar las condiciones embriológicas originarias en la formación del cartílago (citoquinas, factores de crecimiento, células madre...) cosa que puede llegar a ser prácticamente imposible (40). Esto es el principio de la ingeniería tisular: aprovechar técnicas de bioingeniería para desarrollar un tejido. Aplicada a la regeneración del cartílago articular tiene 3 componentes (55). En primer lugar una población celular capaz de proliferar y diferenciarse en condrocitos maduros. En segundo lugar el uso de un andamiaje o matriz tridimensional ("scaffold") que pueda transportar estas células, proporcione un ambiente favorable para el funcionamiento celular y pueda servir como vehículo de liberación de factores de crecimiento, el tercer componente de la ingeniería tisular. Es el uso de señales moleculares y factores de crecimiento que estimulen la respuesta celular (proliferación y diferenciación condrogénica) y la producción de matriz extracelular.

Las primeras células en usarse fueron los condrocitos autólogos. Es el denominado comúnmente como trasplante de condrocitos. Fue descrito por primera vez en 1994 por Brittberg como tratamiento de defectos cartilagosos profundos (56). Actualmente es el único método de reparación del cartílago basado en terapia celular aprobado por la FDA. Consiste en la aplicación de condrocitos autólogos expandidos in vitro bien como células en suspensión (ACI o implante autólogo de condrocitos) o, en una versión mejorada, junto con una matriz de soporte (MACI o implante autólogo de condrocitos en matriz) en el lugar del defecto, en un intento de que estas células regeneren el cartílago destruido. A partir de una biopsia de cartílago hialino articular, se digiere el tejido cartilaginoso obtenido, se cultivan y expanden las células y después de un tiempo, una vez conseguida la cantidad adecuada de células, se implantan en el paciente. Se le realiza una artrotomía, se limpia adecuadamente la zona de la lesión, respetando cuidadosamente el hueso subcondral, sobre el que se depositan los condrocitos cultivados y se recubre con una membrana, periostio, que se sutura al cartílago sano y se sella con fibrina. En el caso de lesiones osteocondrales profundas, Brittberg y cols. (57) propusieron el relleno del defecto con injerto óseo, la colocación de una membrana sobre la que se depositan las células que se vuelven a recubrir con otra membrana, suturada y sellada, por lo que la técnica fue denominada ACI "en sandwich". Añadido a las desventajas de la extracción y recogida de las células, el cultivo in vitro de los condrocitos está asociado con dificultades como que la expansión celular en monocapa, necesaria para alcanzar un número suficiente de células, produce una alteración fenotípica del condrocito conocida llamada desdiferenciación que los hace parecidos a los fibroblastos y que produce una disminución de los niveles de mRNA para moléculas específicas de cartílago. Esto hace que frecuentemente este nuevo cartílago sintetizado es más fibroso que hialino, cuyas propiedades no pueden compararse fisiológica y biomecánicamente con las del cartílago sano. Es por ello por lo que en la última generación de ACI se implantan condrocitos maduros fenotípicamente estables (una subpoblación de condrocitos con un perfil de

marcadores específicos que pueden predecir la capacidad de mantener la forma y función) o también últimamente condrocitos jóvenes alógenicos o condrocitos autógenos directamente, sin expandir previamente en cultivo. Se ha observado también, que la edad del paciente disminuye la efectividad de los condrocitos autólogos ya que con los años se pierde densidad celular en el cartílago y los condrocitos pierden capacidad de proliferación y formar cartílago in vivo (58). El hecho de lesionar el cartílago sano de zonas articulares de no carga en la cirugía previa, necesaria para la toma de biopsias, no es sólo una morbilidad añadida para el paciente sino que se ha sugerido que causando esta lesión se puede aumentar el riesgo a largo plazo de desarrollo de artrosis (59). Debido a estos problemas y a la limitada capacidad de los condrocitos de proliferación y de regeneración intrínseca, se estudia el uso de otras fuentes celulares con potencial condrogénico, entre ellas, las células madre mesenquimales (CMM). La fácil accesibilidad a las CMM desde varios tejidos como la médula ósea (MO), el tejido adiposo, la membrana sinovial, el hueso trabecular y otros tejidos mesenquimales y su elevada capacidad proliferativa, han hecho de ellas una fuente celular alternativa al uso de los condrocitos (60). Es conocido el papel importante que juegan estas células en el desarrollo, crecimiento postnatal, reparación y regeneración de los tejidos mesenquimales. Mantienen una elevada capacidad de expansión y multipotencialidad que incluye la diferenciación de las mismas hacia condrocitos (61). Es por ello por lo que su uso ha tenido tanta expansión en el campo de la medicina regenerativa del cartílago. Pueden provenir del propio paciente (autólogas), de un donante humano inmunológicamente no idéntico (alógenicas) o de otra especie diferente (xenogénicas). Las autólogas representan la principal fuente debido al bajo riesgo de complicaciones inmunológicas. Sin embargo su uso no es barato, ni su calidad es fácilmente controlable como para poder generalizar su uso clínico. Por el contrario, las alógenicas ofrecen ventajas respecto a las autólogas en términos de uniformidad, estandarización del procedimiento, control de calidad y coste-efectividad. El uso actualmente de las CMM se basa en: aplicarlas

previamente expandidas en cultivo, la aplicación en la lesión de una matriz autóloga que induzca la condrogénesis junto con la realización de microfracturas para reclutar a las mismas o más recientemente la aplicación de un concentrado de células madres mesenquimales provenientes de MO. Friedenstein (62) fue el primer autor que describió la existencia de CMM y mostró que la MO contiene células que son capaces de diferenciarse hacia hueso y cartílago. Posteriormente este trabajo inicial ha sido ampliado por diversos investigadores, confirmando que las CMM aisladas de la MO tienen la capacidad de autorregenerarse y diferenciarse hacia múltiples líneas celulares incluyendo la condral. La condrogénesis de las CMM fue originariamente descrita por Ashton y cols. (63) y el medio para la misma, *in vitro*, fue descrito por Johnstone y cols (64). Es un procedimiento que está estandarizado (59). En primer lugar se extrae la población celular deseada. Después de su aislamiento, se expande *in vitro*. La condrogénesis es inducida con TGF- $\beta$ , resultando en la apariencia fenotípica condrocítica caracterizada por el incremento en la expresión de moléculas específicas del cartílago como el colágeno tipo II, IX, agreganos, biglicanos y decorin. Histológicamente la identificación de colágeno tipo II y de proteoglicanos define una diferenciación exitosa. Sin embargo, se ha observado que los protocolos comunes para diferenciación condrogénica de las CMM producen condrocitos que alcanzan el fenotipo hipertrófico de forma prematura y desarrollan un cartílago endocondral transitorio (con posterior calcificación y depósito mineral) más que un cartílago articular estable. Además se ha observado también que la invasión vascular en el tejido puede inducir la calcificación / mineralización del mismo.

Para poder entender y dar explicación a este proceso, tenemos que observar que es lo que ocurre en el desarrollo normal del cartílago (59). Durante el desarrollo embriológico, las CMM dan origen a dos tipos diferentes de cartílago, el permanente y el transitorio. El cartílago permanente es originado exclusivamente desde las CMM situadas en los extremos de los huesos en desarrollo. Después de una condensación

inicial, las células madres se diferencian en condrocitos estables que sintetizan la característica matriz extracelular hialina del cartílago articular. Por otro lado vamos a tener otro tipo de cartílago, el transitorio, también originado por las CMM. Previamente a la formación del esqueleto óseo, los condrocitos derivados de las CMM forman un modelo transitorio cartilaginoso de hueso que es posteriormente reemplazado por un hueso mineralizado, en un proceso conocido como osificación endondral. Después de que se haya formado la matriz cartilaginosa, los condrocitos situados en la zona media de la diáfisis, cesan de proliferar y alcanzan el estado hipertrófico, lo que conlleva que morfológicamente aumentan de tamaño y funcionalmente expresan el marcador de la hipertrofia, la molécula de colágeno tipo X, la MMP13, e incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina. Posteriormente, los condrocitos hipertróficos comienzan la calcificación de la matriz extracelular circundante y se diferencian hacia osteoblastos o entran en apoptosis. La mineralización de la matriz va seguida de la vascularización de la misma, y se inicia la migración de osteoclastos que degradan la matriz y de osteoblastos que forman hueso. Entre este núcleo de osificación primario y otro epifisario secundario, se forma la placa de crecimiento donde el cartílago transitorio, mediante el proceso de osificación endondral, es responsable del crecimiento en longitud postnatal del hueso.

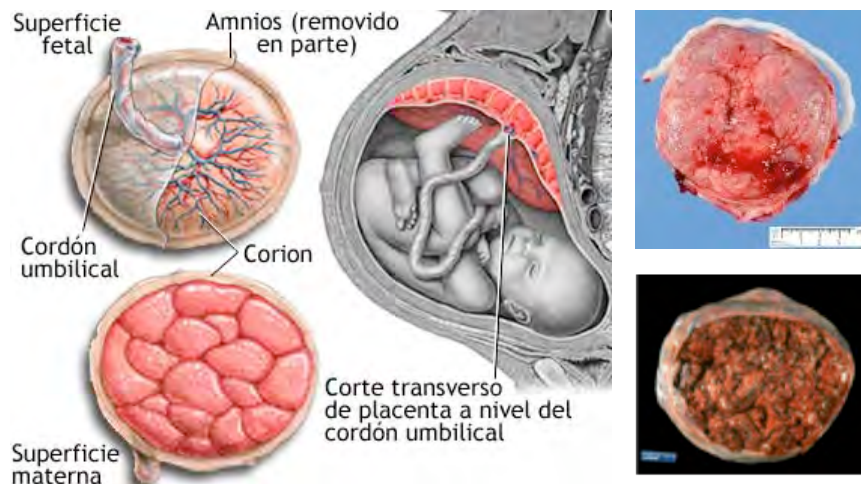
Cuando se usan las CMM para la reparación del cartílago articular, el mayor reto durante la condrogénesis es el conseguir condrocitos que no alcancen el estado final de diferenciación a condrocitos hipertróficos (59). Como se ha mencionado anteriormente, las CMM pueden ser aisladas de una gran variedad de tejidos mesenquimales adultos. A pesar de que las provenientes de MO han mostrado en muchos estudios mejores resultados en comparación con otras (55) (61), hay otros estudios que muestran que la aplicación de las condiciones habituales para la diferenciación condrogénica in vitro, en CMM de MO inducen rasgos característicos de fibrocartílago (como la expresión de colágeno tipo I y osteopontina) y de condrocitos

hipertróficos (65). Las CMM derivadas del tejido adiposo, muestran una reducida capacidad de diferenciación condrogénica bajo las condiciones de estímulo estándar (66). Se ha demostrado que este tipo celular presentan una reducida expresión endógena de BMP-2, BMP-4 y BMP-6 que debe ser compensada mediante el suplemento exógeno de BMP al TGF- $\beta$ . La administración de BMP-6 en combinación con TGF- $\beta$  elimina completamente el potencial reducido de diferenciación de las CMM derivadas de tejido adiposo. Los condrocitos derivados de CMM provenientes del tejido adiposo sin embargo, también revelan al igual que los derivados de las de MO, una síntesis de colágeno tipo X y un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina. Esto demuestra por una lado que la predisposición observada de las CMM de MO para la osteogénesis y calcificación de la matriz no es debido a su origen óseo y por otro que las CMM derivadas de diferentes tejidos no representan una misma población celular y varían en cuanto al perfil de expresión y la respuesta a diferentes factores de crecimiento relevantes para la condrogénesis. Es por ello por lo que, hoy por hoy, no existe una población celular ideal capaz de crear un tejido idéntico al cartílago articular nativo y se sigue investigando acerca del uso de otras o subtipos de las mismas. Entre ellas, se encuentran las células procedentes de la membrana amniótica.

## LA MEMBRANA AMNIÓTICA

En la placenta se diferencian dos caras, una materna y otra fetal (figura 2). La fetal se encuentra orientada hacia la cavidad amniótica y está tapizada por el *amnios*, una membrana delgada, lisa, semitransparente y brillante. Este amnios o membrana amniótica está bañada por el líquido amniótico. La capa subyacente al amnios se denomina *corion*. La tercera capa y más profunda de la placenta es la *decidua* que es

la adaptación del endometrio al embarazo. Por lo tanto tenemos dos capas de origen fetal (el amnios y el corion) y otra de origen materno (la decidua).



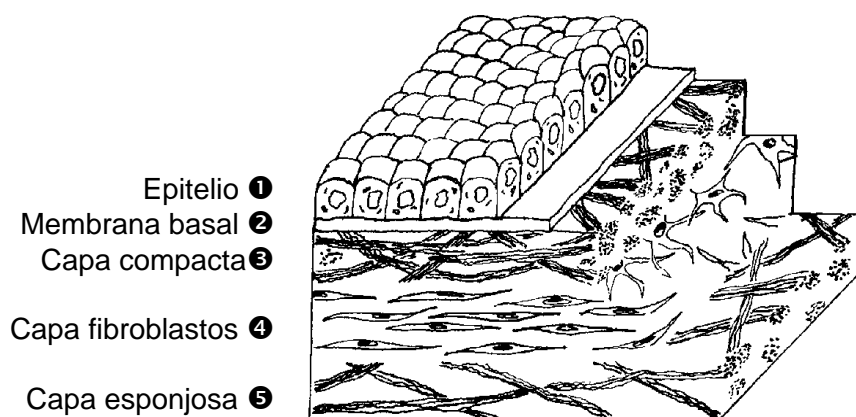
**Figura 2.** Estructura macroscópica de la placenta

La membrana amniótica no contiene nervios, vasos sanguíneos ni linfáticos. Los nutrientes que requiere son adquiridos directamente mediante difusión desde el líquido amniótico o desde la decidua subyacente.

La membrana amniótica se compone de cinco capas (figura 3):

1. epitelio amniótico (monocapa de células cuboideas o columnares)
2. membrana basal (muy gruesa)
3. mesodermo amniótico, capa mesenquimatosa, matriz estromal o estroma: zona avascular donde se diferencian a su vez 3 zonas:
  - capa compacta
  - capa de fibroblastos
  - capa esponjosa

Podemos dividirla en una capa apical epitelial y una capa basal mesodérmica.



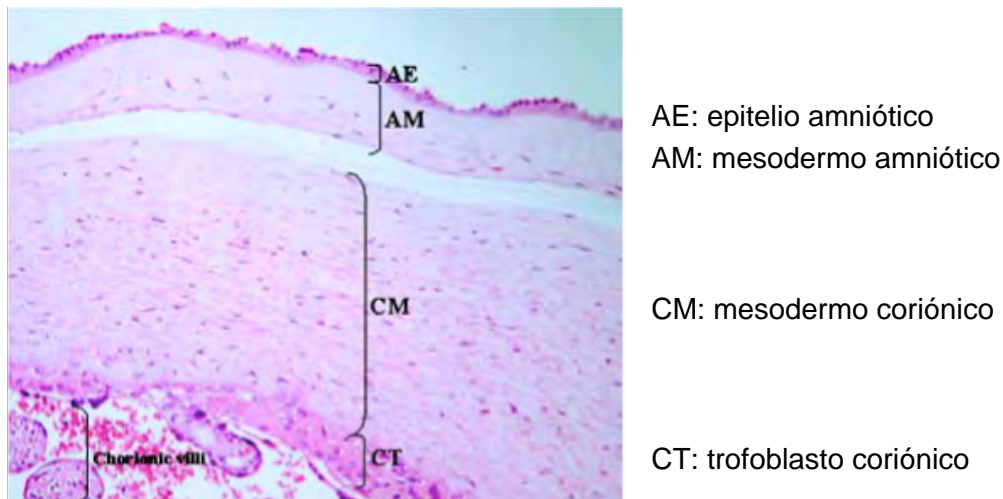
**Figura 3.** Estructura de la membrana amniótica.

El epitelio de la membrana amniótica está formado por una monocapa de células cuboideas o columnares fuertemente adherida a la membrana basal. La membrana basal es una de las membranas más gruesas encontradas entre los tejidos humanos y es parte fundamental del soporte estructural proporcionado al feto por la membrana amniótica durante todo el embarazo. Las células amnióticas están conectadas entre sí mediante desmosomas. Observadas al microscopio, las células epiteliales, presentan numerosas vacuolas. Este epitelio posee capacidad de secreción y reabsorción activas, en relación con la formación de líquido amniótico. La superficie apical de las células amnióticas tiene muchos microvilli. En la base, los procesos ciliares o pedículos se extienden dentro de la membrana basal a modo de podocitos. Los procesos de las células basales tienen una unión con la membrana basal tipo hemidesmosoma con tonofilamentos, y la sustancia de la membrana basal subyacente es parcialmente amorfa y parcialmente microfibrilar. El citoplasma contiene muchas vesículas pinocíticas, abundantes organelas incluyendo cisternas del retículo endoplásmico y aparato de Golgi. El núcleo tiene una configuración muy irregular con un gran número de indentaciones de la membrana nuclear. El nucleolo es, a menudo, grande y homogéneo, sugiriendo actividad nucleolar.

La ultraestructura del epitelio sugiere que el amnios tiene múltiples funciones especializadas. Está especialmente adaptado a sus tres funciones principales:

1. epitelio de recubrimiento
2. actividad secretora
3. transporte intercelular y transcelular intensos.

Subyacente al epitelio y a la membrana basal se encuentra una *capa acelular compacta*, la cual forma el principal esqueleto fibroso de la membrana amniótica. Está formada por colágeno tipo I, III, V y VI y fibronectina. El colágeno intersticial (tipo I y III) es el predominante y forma bandas paralelas que mantienen la integridad mecánica de la membrana amniótica. Los colágenos tipo V y VI forman conexiones ligamentosas entre el colágeno intersticial y la membrana basal epitelial. El colágeno de esta capa compacta es sintetizado por las células mesenquimales situadas en la *capa fibroblástica o capa estromal*, que se encuentra más en profundidad. En ella se sitúa una red dispersa de células mesenquimales fibroblastos-like (denominadas por algunos autores más recientemente, células estromales mesenquimales amnióticas, AMSC) y escasos macrófagos (denominados también células monocito-like). La *capa esponjosa* es rica en proteoglicanos y glicoproteínas y en ella se distribuyen fibras de colágeno tipo III sobretodo de forma más libre o desorganizada. Esta capa separa el amnios del corion, en el cual se puede diferenciar la región mesodérmica y la región trofoblástica. Esta unión entre la capa esponjosa y la membrana coriónica es débil y fácilmente separable mediante disección roma ya que nunca se fusionan a nivel celular (figura 4).



**Figura 4.** Histología de la membrana amniótica.

## PROPIEDADES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

Es un *tejido metabólicamente activo*. La membrana amniótica posee un epitelio que regula la composición del líquido amniótico y produce gran variedad de compuestos activos: factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. Se ha observado que la membrana amniótica nativa, intacta, contiene unos niveles elevados de EGF, FGF, HGF y  $\beta$ -FGF comparado con la membrana desnuda de epitelio (67), lo que sugiere que esos factores de crecimiento está predominantemente presentes en el epitelio amniótico. También han sido detectados en las células epiteliales amnióticas TNF- $\alpha$ , NGF, BDNF, nogina y activina. Se ha visto que el epitelio amniótico contiene citoquinas que juegan un papel crucial en el microambiente de algunas células progenitoras. Varios estudios han destacado la importancia de las señales procedentes del microambiente celular articular para inducir la formación de cartílago y mantener este fenotipo (59).

Tiene *efectos antiinflamatorios* (67) (68). Una reacción inflamatoria puede producir el fallo de un injerto trasplantado. Se ha observado que la membrana amniótica disminuye la inflamación, la fibrosis y la angiogénesis mediante la supresión o síntesis de ciertas citoquinas que van a tener como resultado final una inhibición de los fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos. Cuenta con *propiedades antibacterianas*. La membrana amniótica humana ha demostrado clínica y experimentalmente que reduce el crecimiento bacteriano y promueve la curación de heridas infectadas (69-71). Por lo dicho anteriormente favorece la curación de heridas y la epitelización del tejido (67).

Posee unas *características biomecánicas favorables* que han sido ampliamente investigadas en el estudio de la rotura prematura de membrana (antes del inicio del parto). Es semipermeable. A pesar de actuar como una barrera anatómica, la membrana amniótica permite el paso de moléculas. Esto explica el derrame de líquido amniótico sin rotura de membrana (hidrorrea amniótica) y la acumulación de líquido entre el amnios y el corion (bolsa amniocorial). Posee muy buena adhesividad. Se adhiere firmemente a la superficie expuesta. Esto permite poder incluso aplicarla en muchas superficies tisulares sin necesidad de suturarla o de recubrirla con otro tejido.

Es a su vez fuerte y resistente, pero al mismo tiempo delgada y muy flexible (67). La membrana fetal debe soportar la carga de la presión hidrostática del líquido amniótico durante la gestación. Además de la presión constante durante un embarazo normal, también debe soportar las pequeñas cargas repetidas, como las contracciones de Braxton-Hicks. La membrana amniótica es aproximadamente el 20% del grosor del amniocorion a término, pero es mayor la respuesta mecánica de la bicapa en cuanto a rigidez y fuerza que la producida por el corion aislado. De ahí que la fuerza de la membrana corioamniótica intacta se deba a la membrana amniótica. Es por eso por lo que en el momento de la rotura de bolsa durante el parto, el corion suele desgarrarse en primer término. La membrana amniótica demuestra una respuesta mecánica que es

inherentemente dependiente del tiempo, descrita como viscoelasticidad. Se ha propuesto que la elastina sea responsable de la base molecular de la elasticidad de la membrana amniótica y que la capa acelular compacta proporcione la fuerza a la tensión. Esta resistencia mecánica es importante en el diseño y selección de una matriz para vehicular células en la ingeniería tisular. Traduce la durabilidad requerida de esta matriz celular para resistir las fuerzas de carga y cizallamiento producidas en el interior de la articulación.

Otra ventaja para su utilización en clínica sería su *escasa o nula inmunogenicidad* (67) (72), lo que justifica la inexistencia de rechazo tras su implantación. La respuesta inmune del huésped contra el injerto, si es que la hay, es nula o muy ligera y no supone un riesgo para el trasplante. Se ha observado que el trasplante de membrana amniótica sin inmunosupresión no produce reacción inmune aguda y es capaz de perdurar en el huésped largos periodos de tiempo. No se han detectado anticuerpos HLA en el suero de los receptores. El cultivo in vitro de células aisladas de la membrana amniótica y coriónica inhiben la proliferación linfocitaria. Ha sido comprobada la presencia de células amniocoriónicas humanas en diferentes órganos de animales inmunocompetentes largo tiempo después de su infusión intravenosa, lo que sugiere una migración activa e integración e indica una tolerancia activa a las células xenogénicas (73), debido a varias razones:

- es un tejido que carece de vasos sanguíneos, su nutrición parece realizarse por difusión, por lo que carece de células maternas;
- las células epiteliales amnióticas no expresan antígenos HLA-A, -B, -D y -DR en la superficie celular. El papel de estas moléculas polimórficas clásicas de clase I es el de inducir una respuesta inmune específica presentando los péptidos antigénicos a las células T;
- existencia de un “privilegio inmunológico” de los tejidos fetales. La membrana amniótica es de origen fetal, es decir tiene la mitad de su

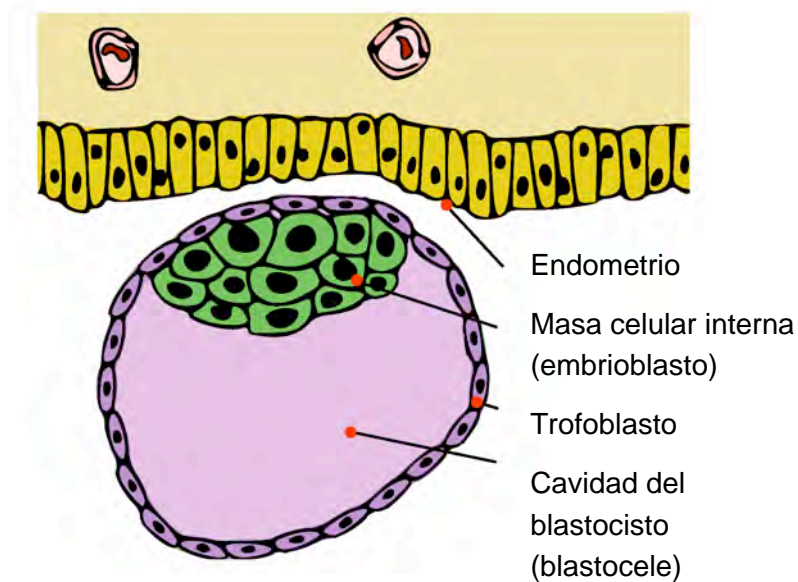
contenido genético procedente de la madre y la otra mitad del padre. Sin embargo, no se produce ninguna reacción en contra de la misma por parte de la madre durante el embarazo. Esto se cree es debido fundamentalmente a la expresión por parte de las células de origen fetal de antígenos de superficie HLA-G. Se piensa que las HLA-G están involucradas en la inducción de la tolerancia inmune actuando como ligando de los receptores inhibidores presentes en las células NK y en los macrófagos. Ha sido publicado que la expresión génica en las células epiteliales conjuntivales y limbares del HLA-G se encuentra aumentada cuando son cultivadas en membrana amniótica desnuda.

La membrana amniótica cuenta con una considerable *presencia de células mesenquimales pluripotenciales*.

### ***Células pluripotenciales de la membrana amniótica***

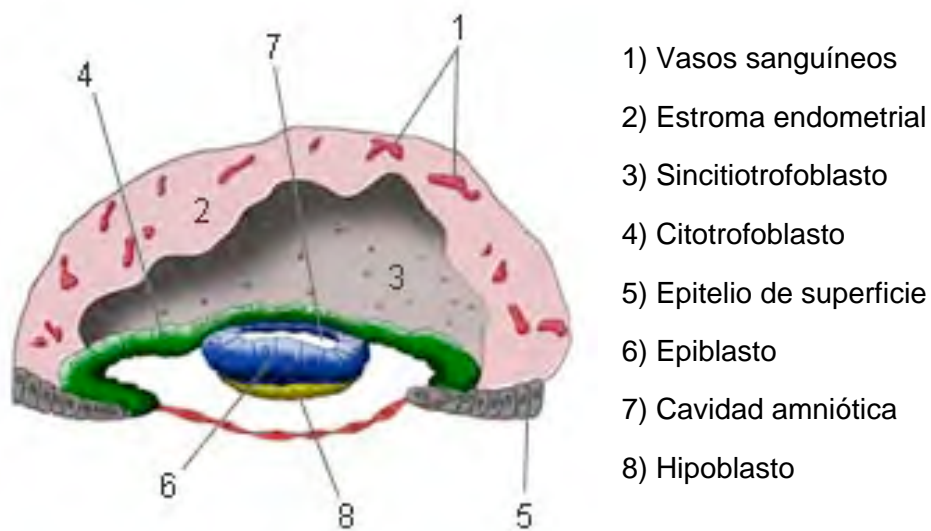
La placenta, además de jugar un papel fundamental en el desarrollo fetal, en la nutrición y en la tolerancia inmunológica, puede también representar una reserva de células madre progenitoras (73). Esto es debido a que su formación embrionaria va a comenzar antes de la gastrulación.

Al 8º ó 9º día después de la fecundación, la masa de células internas del blastocisto (figura 5) se diferencia en 2 capas: el epiblasto y el hipoblasto.



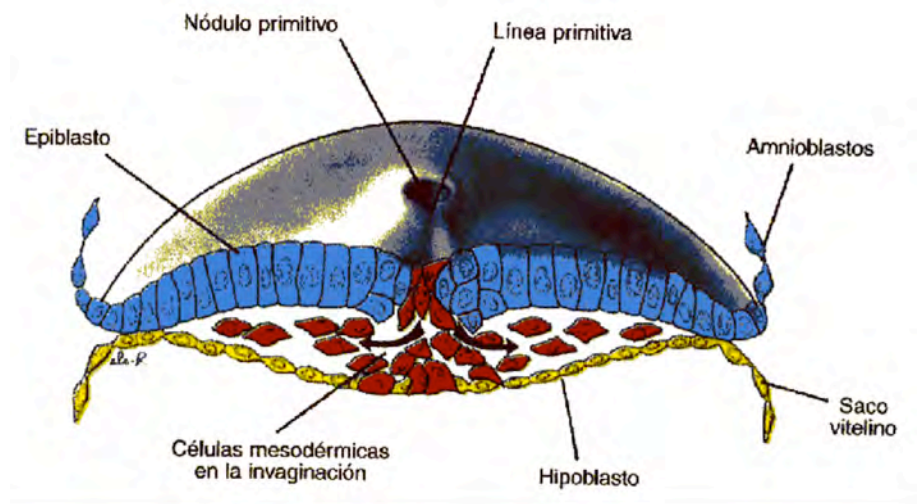
**Figura 5.** Formación del disco germinativo bilaminar al 8º-9º día de la fecundación.

Subsecuentemente, desde el epiblasto, pequeñas células que posteriormente constituirán el epitelio amniótico, aparecen entre el trofoblasto y el disco embrionario y cierra un espacio que llegará a ser la cavidad amniótica. En el lado opuesto, entre el hipoblasto y el citotrofoblasto, la membrana exocelómica y su cavidad forman el saco vitelino (figura 6).



**Figura 6.** Formación de la cavidad amniótica.

La gastrulación es el proceso por el cual el disco germinativo bilaminar formado por el epiblasto y el hipoblasto se diferencian hacia las tres capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo (figura 7). Este proceso ocurre en torno a la 3ª semana de la fecundación (73).



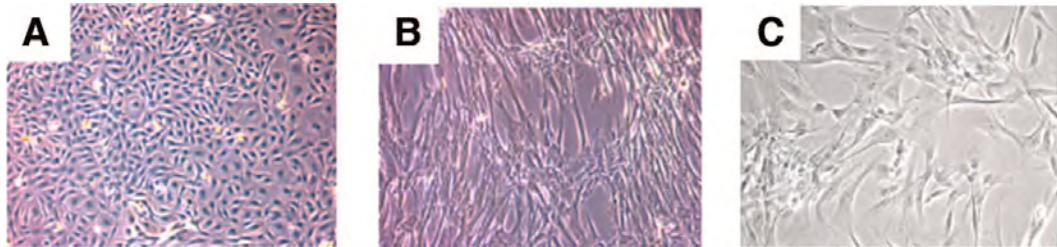
**Figura 7.** Gastrulación.

Se ha visto que este proceso es muy importante en la diferenciación y especificación de las células fetales y ocurre 2 semanas después de la formación de las células amnióticas epiteliales. Éste es el motivo por el cual el amnios puede conservar las propiedades pluripotenciales de las células epiblasticas tempranas que lo originó (74).

Como se ha mencionado previamente, la placenta está formada por tres capas: la decidua, el corion y el amnios. Cada capa es derivada de diferentes fuentes. Mientras que la decidua es de origen materno, el amnios y el corion son de origen embrionario. El corion es derivado del trofoblasto y el amnios del epiblasto.

Podemos diferenciar en la placenta dos tipos celulares fundamentales (figura 8), las células epiteliales aisladas de la membrana amniótica (A) y las

células mesenquimales estromales aisladas tanto de la membrana amniótica (estroma) (B) como del corion (C).



**Figura 8.** Tipos celulares de la membrana amniótica.

En la membrana amniótica por lo tanto tendremos tanto células epiteliales como estromales. En ambas se ha demostrado una plasticidad celular variable. Debido a esta plasticidad, han sido denominadas células madre pero quizás no es en la actualidad el término más apropiado siempre, ya que no se han podido demostrar claramente dos de las características fundamentales de estas células, la capacidad indefinida de autorrenovación y la jerarquización celular. Algunos autores (75) (76) proponen un concepto de célula madre alternativo donde la plasticidad sería esencial para definir a este tipo de células mientras que la capacidad para autorrenovarse de forma indefinida y la jerarquía en la diferenciación posterior serían opcionales.

Se ha observado que las *células amnióticas epiteliales* aisladas de la placenta humana a término expresan marcadores de superficie normalmente presentes las células madre embrionarias y en células germinales. Además expresan el factor de transcripción específico de las células madres pluripotenciales Oct-4 (octamer-bindingprotein 4) y nanog (73) (74). Basado en análisis inmunohistoquímico y genético, las células epiteliales amnióticas tienen el potencial de diferenciación hacia las 3 capas germinales (74). Van a mantener

algún potencial de diferenciación de su origen, el epiblasto. *In vitro* se ha conseguido la diferenciación de estas células hacia las tres capas germinativas, endodermo, mesodermo y ectodermo (67) (68) (74) (77). Estas células también producen numerosas sustancias que pueden aumentar la reparación y regeneración tisular (78).

Las *células mesenquimales estromales* del amnios (CME-A) y del corion (CME-C) parecen derivarse del mesodermo extraembrionario. Observadas al microscopio de transmisión de electrones, las amnióticas presentan características epiteliales y mesenquimales. Este fenotipo híbrido es interpretado como un signo de multipotencialidad y no es encontrado en las coriónicas. Los marcadores de superficie de las CME-A, de las CME-C y de las células de la médula ósea del adulto son similares. Ha sido publicada la diferenciación de ambas hacia la línea mesodérmica clásica (osteogénica, condrogénica y adipogénica) (73) así como hacia células nerviosas (79). Las características fenotípicas generalmente aceptadas de las células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea incluida la ausencia de marcadores endoteliales y hematopoyéticos y la expresión de CD29, CD44, CD73, CD105 y CD166 ha sido también descrita en las células mesenquimales derivadas de placenta (80) sin que las propiedades de estas últimas puedan verse afectadas con la edad o con diversas enfermedades como ha sido publicado para el autotransplante de las primeras (81). *In vivo* se han injertado con éxito y de forma persistente células amnióticas y coriónicas en múltiples órganos y tejidos. Tras un trasplante intravenoso o intraperitoneal de este tipo de células de origen humano en ratas y cerdos recién nacidos se observa una migración activa a numerosos tejidos (cerebro, pulmón, médula ósea...) lo que implica una expresión de moléculas de adhesión y migración (L-selectina, VLA-5, CD29 y P-selectina ligando) así como proteinasas de la matriz celular (MMP-2 y MMP-9) (73).

Se ha observado que estas células tienen ciertas ventajas respecto al uso de las células embrionarias (67). Una está relacionada con el método de cultivo. Estas células son *capaces de proliferar sin necesidad de un segundo tipo celular que actúe como capa alimentadora*. Las células amnióticas epiteliales crean su propia capa alimentadora con algunas células que se disponen en el fondo de la placa de cultivo. Esta capa basal de células epiteliales que se adhiere a la placa de cultivo puede jugar un papel como capa alimentadora autóloga, servir como substrato de unión o quizás proporciona / secreta factores que pueden inducir o mantener indiferenciadas a las células. Con esto, al no tener que utilizar un alimentador celular de origen murino (fibroblastos embriogénicos de ratón o MEFs) necesario para el cultivo de las células embrionarias humanas, se evita la introducción de contaminantes xenogénicos que pudiera limitar su uso en humanos y de una posible fuente inesperada de variabilidad cuando se intentan controlar las condiciones experimentales. Otra ventaja es la *elevada cantidad que existe* de estas células. Se ha observado un rendimiento de 100 millones de células epiteliales amnióticas por cada amnios recogido. Estas células además tienen la capacidad de reproducirse de forma muy intensa ante ciertos factores de crecimiento como la EGF (74), teniendo un elevado número de células amnióticas potencialmente disponibles usando la membrana amniótica como fuente. Por el contrario, como existe un número limitado de aporte de células embrionarias, es necesario su costosa expansión *in vitro* para obtener un número de células suficientes para su uso terapéutico. Otra ventaja observada es la ausencia de formación de tumores (67) (68) (74). Las células indiferenciadas que retienen la pluripotencialidad, pueden dar origen a tumores conocidos como teratomas *in vivo*. No hay evidencia de la formación de teratomas ni otro tipo de tumores cuando han sido trasplantadas células amnióticas aisladas en ratones inmunodeficientes o en humanos voluntarios

para examinar la inmunogenicidad o en pacientes con enfermedades lisosomales. Esto las diferencia de las células embrionarias. Es posible que la pérdida de actividad telomerasa en las células epiteliales amnióticas, pueda contribuir a la supresión tumoral *in vivo* (67).

Finalmente plantean *escasos problemas éticos derivados de su uso*. Al ser un tejido que se desecha después del parto, su obtención está ausente de los problemas éticos asociados al uso de células madre embrionarias. Es un tejido disponible (teóricamente ilimitado), relativamente barato y fácil de conseguir sin métodos invasivos (73). Sin embargo el tejido está en posesión de la madre así que su uso debe ser aprobado por el comité de ética de cada institución y debe ser obtenido un consentimiento informado firmado por parte de la madre (68).

Como hemos observado, la membrana amniótica puede ser usada como:

1. banco de tejido (andamiaje o soporte estructural relativamente inerte)
2. fuente de células o factores de crecimiento.

Esto se debe fundamentalmente a los diferentes métodos que existen de conservación / esterilización. La membrana amniótica puede ser usada en fresco o procesada y esterilizada para garantizar la calidad y conservación de la misma. Han sido descritos varios métodos incluyendo el almacenaje en hipotermia (4° C), congelado en seco, gamma-esterilización, conservación en glicerol y criopreservación (-80° C) (67). Es sabido que los distintos métodos utilizados para la esterilización / conservación de los tejidos, alteran de una manera u otra las características del mismo (73). Las influencias de estos diferentes métodos de conservación en la viabilidad de la células y en los factores de crecimiento de la membrana amniótica está por determinar todavía, pero en general todos los métodos de conservación van a producir una alteración en la viabilidad celular así como en las propiedades de los diversos

factores de crecimiento / citoquinas presentes en el tejido. Hasta el presente, en la mayoría de los casos, el uso clínico de la membrana amniótica como injerto ha sido clínicamente aplicada criopreservada (congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) (68). Varios autores han constatado la disminución de forma muy importante de la viabilidad y capacidad proliferativa de las células de la membrana amniótica con la congelación de la misma (82) (83). Estos datos van en contra de que a pesar de muchas de las características similares que poseen las células epiteliales amnióticas con las células madre, éstas últimas tienen como una de las características más importantes el que sobreviven a la congelación / descongelación (67). Kubo et al. (84) demostraron que a los 2 meses tras congelar la membrana amniótica solo se encuentran viables el 50% de las células epiteliales cuboideas, mientras que tras un año y medio de congelación, no fue capaz de demostrar la supervivencia de ninguna célula. La función principal de la membrana amniótica cuando se emplea en oftalmología es la de servir de soporte-membrana basal para la proliferación celular del tejido sano circundante y no por el trasplante de células epiteliales vivas y funcionalmente activas (83).

Hasta el momento no se ha publicado ningún estudio que intente utilizar ambas propiedades de la membrana amniótica al unísono: aplicar un soporte estructural o matriz que contiene diversas citoquinas / factores de crecimiento así como células pluripotenciales capaces de diferenciarse hacia múltiples.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Nuestra **hipótesis** es que la membrana amniótica aplicada por su cara celular sobre una lesión condral es capaz de regenerar el tejido cartilaginoso lesionado.

El **objetivo principal** de nuestro trabajo es valorar la regeneración del cartílago articular en lesiones condrales de espesor parcial de 0,8 cm<sup>2</sup>, producidas experimentalmente en el cóndilo femoral interno de la rodilla en la oveja esqueléticamente madura, tras la aplicación de membrana amniótica conservada en fresco y comparar estos resultados con los obtenidos tras la aplicación de la membrana amniótica congelada aislada, con células mesenquimales y recubriendo a la lesión tratada con microfracturas, utilizando un grupo con la misma lesión sin tratamiento como grupo control.

Como **objetivos secundarios**, valoraremos la biocompatibilidad de la membrana amniótica al ser usada como tejido para alotrasplante, la actividad biológica y la proliferación celular observada en el interior de la misma, el contenido en proteoglicanos existente en el tejido de reparación originado y la técnica usada para la aplicación de la membrana amniótica en la lesión cartilaginosa.

Nuestra **hipótesis nula** es que la aplicación de membrana amniótica en fresco no altera la evolución natural de una lesión condral de espesor parcial.

### **3. MATERIAL Y METODOLOGÍA**

Diseñamos un estudio experimental con ovejas esqueléticamente maduras para determinar el efecto de la membrana amniótica sobre la regeneración del cartílago articular. El proyecto fue aprobado por el comité de ética de experimentación animal del Hospital FREMAP de Majadahonda (Madrid).

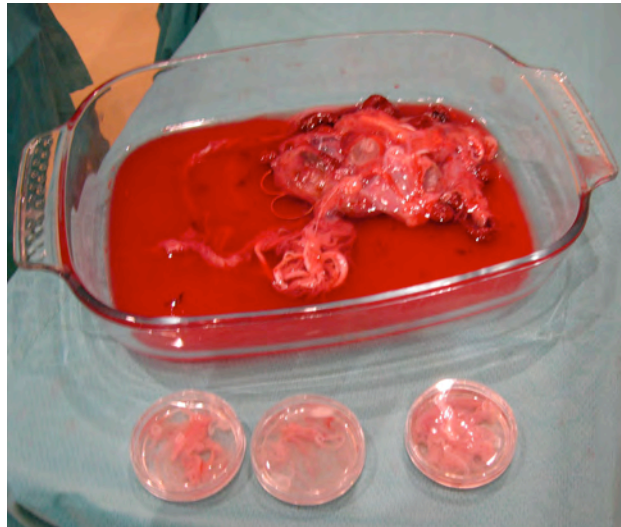
Se utilizaron 17 ovejas sanas de 3 años de edad para evitar la regeneración natural del cartílago inmaduro.

Los animales pasaron dos semanas previas a la intervención en el estabulario donde, además, fueron controlados y desparasitados por el personal veterinario. Dos de los animales se encontraban en periodo gestacional que fue confirmado y determinado el tiempo de evolución por ecografía realizada por el veterinario del centro. Los 15 restantes se aleatorizaron en 5 grupos, quedando de la siguiente manera:

- Grupo 1: Grupo control (3 animales)
- Grupo 2: Grupo membrana amniótica congelada (3 animales)
- Grupo 3: Grupo membrana congelada y microfracturas (3 animales)
- Grupo 4: Grupo membrana amniótica congelada con células (3 animales)
- Grupo 5: Grupo membrana amniótica fresca (3 animales)

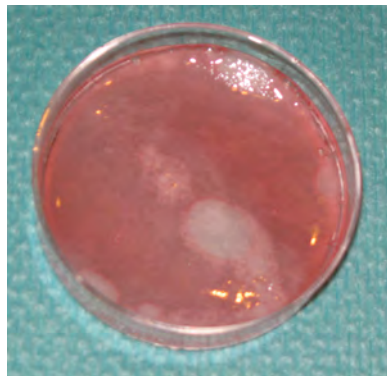
## **OBTENCIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA**

Las membranas amnióticas se obtuvieron de dos placentas obtenidas de las ovejas preñadas mediante la realización de una cesárea en gestación a término determinadas mediante ecografía (figura 9).



**Figura 9.** Placenta y varios fragmentos de membrana amniótica recién obtenidas.

Se utilizó para la extracción de la misma el protocolo de Tseng (85). Una vez obtenidas las membranas, se cortaron de forma circular y se colocaron en placas de cultivo celular sobre un papel de nitrocelulosa con la cara celular hacia abajo (figura 10).



**Figura 10.** Membrana amniótica aplicada sobre papel de nitrocelulosa en placa de Petri.

Una vez extraídas las membranas se trataron según el grupo al que estuvieran asignadas. Unas se almacenaron en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  al menos durante 6 semanas, y las otras se almacenaron en fresco cubiertas de medio de cultivo (DBM)

en un frigorífico a 4°C hasta el momento de su utilización, siempre en un tiempo inferior a 24 horas (70). Todos los animales a los que se aplicó una membrana fresca fueron intervenidos inmediatamente después de su obtención, no pasando más de 6 horas entre su obtención y la colocación en el animal experimental.

## **MODELO EXPERIMENTAL**

Los pasos seguidos en la técnica quirúrgica fueron los siguientes:

### ***Cuidados y mantenimiento de los animales***

Los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en el quirófano experimental del Hospital FREMAP de Majadahonda, Madrid, dotado con los medios técnicos y el personal necesario para realizar las intervenciones con estrictas medidas de asepsia.

### ***Cuidados pre-operatorios***

Los animales llegaron al animalario una semana antes de su operación para su adaptación a las nuevas condiciones ambientales. A su llegada al recinto, fueron esquilados y desparasitados, y dos días antes de la operación permanecieron en ayuno y con poca agua. El día anterior a su operación, se lavaron con jabón antiséptico y se procedió a su secado con estufas de aire caliente.

### ***Preparación***

Se colocó al animal en decúbito supino sobre la mesa de operaciones (figura

11).



**Figura 11.** Anestesia, colocación y preparación de la oveja en la mesa de quirófano.

Se procedió al rasurado cuidadoso de la extremidad sobre la zona a intervenir. Se prosiguió con un lavado minucioso con detergente antiséptico de la extremidad y posterior pincelado de la misma con solución alcohólica de yodo al 0,5%, aislando mediante un vendaje estéril el extremo distal de la extremidad hasta el nivel de la epífisis distal tibial. Seguidamente se preparó el campo quirúrgico estéril (figura 12).



**Figura 12.** Preparación del campo quirúrgico.

### ***Anestesia del animal***

Se utilizó anestesia general con intubación endotraqueal. Para proceder a la administración de la medicación anestésica, se canuló la vena cefálica presente en la extremidad anterior derecha. Una vez canulada se conectó a un sistema de gotero a través del cuál se suministró también fluidoterapia de mantenimiento con suero glucosado al 5%. El catéter fue del tipo Abbocath, de calibre 14 ó 18.

#### **1. Inducción:**

La inducción anestésica se consiguió mediante la administración por vía intravenosa de:

- Tiobarbital®, (Abbot) a una dosis de 12 mg/Kg
- Atropina®, (B. Braun) 0,5 mg/Kg
- Fentanil® (Kern), a una dosis de 0,015 mg/Kg

Durante la misma se administró la profilaxis antibiótica.

#### **2. Mantenimiento:**

La anestesia se mantuvo posteriormente con los siguientes fármacos:

- Tiobarbital® a una dosis de 10 mg/Kg
- Fentanil® a una dosis de 0,015 mg/Kg

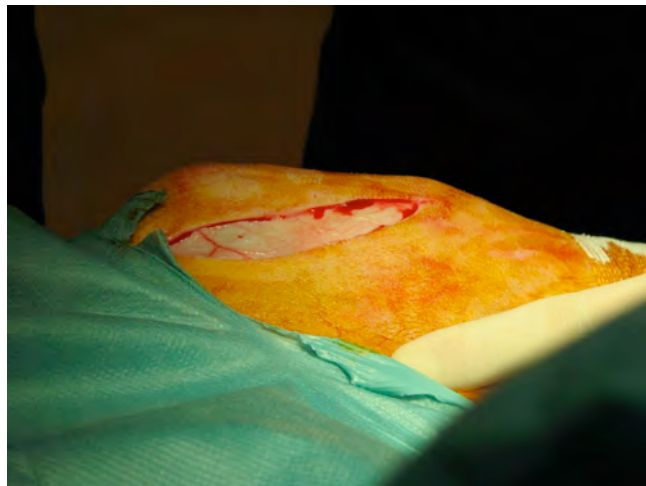
Con esta medicación se logró una depresión del estado de consciencia del animal junto con un buen efecto analgésico, sin afectar a la actividad respiratoria espontánea, suficiente para poder practicar las operaciones programadas.

### 3. Despertar

El despertado del animal se realizó de forma espontánea.

### *Cirugía según los grupos*

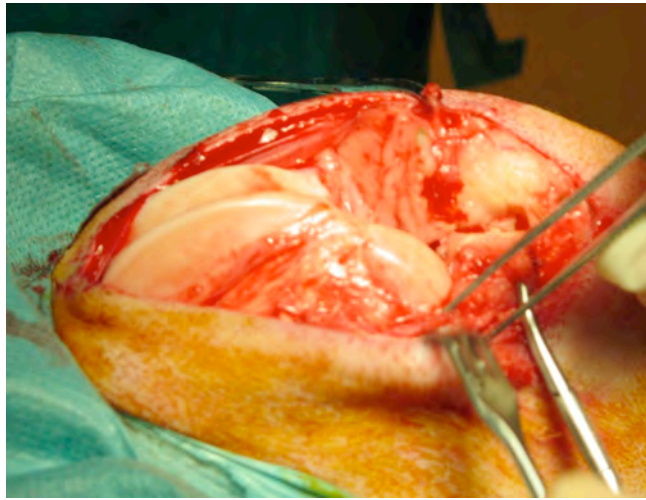
Se realizó una incisión en la piel y una artrotomía parapatelar medial (figura 13).



**Figura 13.** Artrotomía parapatelar medial.

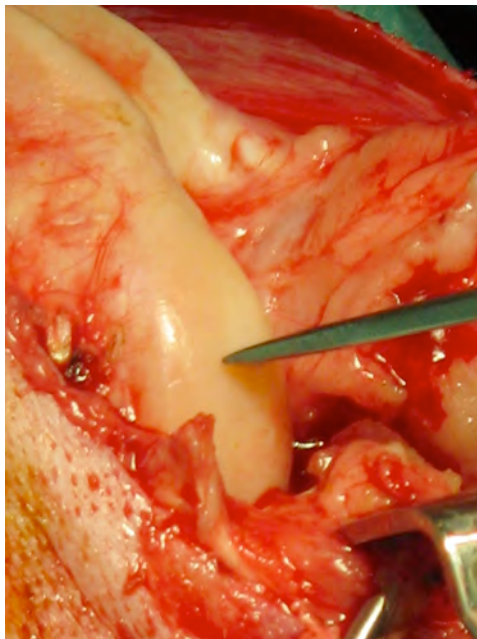
Abriendo la cápsula se luxó la rótula hacia fuera. Flexionando la rodilla se observó la escotadura. Liberando la cápsula y el ligamento adiposo y flexionando la rodilla al máximo se observaron los cóndilos femorales. Abriendo con una incisión transversa, menor de 5 mm, el ligamento lateral interno permitió visualizar los

meniscos rotando la tibia (figura 14).



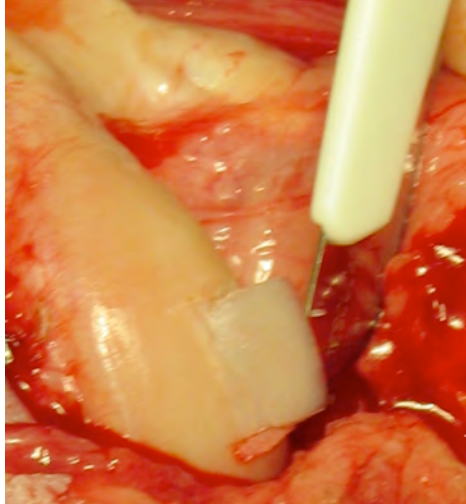
**Figura 14.** Exposición del cóndilo femoral interno de la oveja.

En el cóndilo femoral externo se marcó un rectángulo de 0,8 cm de ancho por 1 cm de largo con unos escoplos de dicho tamaño (figura 15).



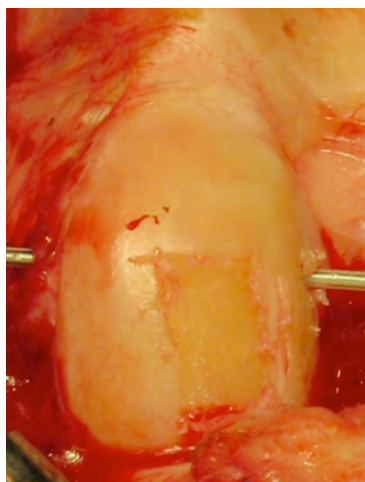
**Figura 15.** Delimitación de la lesión condral sobre el cóndilo femoral con escoplos.

Primero con un bisturí y después con una cucharilla se vació de cartílago (figura 16), dejando visible y palpable el hueso subcondral, sin que llegase nunca a sangrar.



**Figura 16.** Desarrollo de la lesión condral.

Produjimos en todas las ovejas, lesiones de espesor parcial, retirando la capa calcificada sin alcanzar el hueso subcondral (figura 17), para garantizar que los efectos que se puedan producir sean debidos al tejido aplicado y no a las células procedentes de la médula ósea (86).

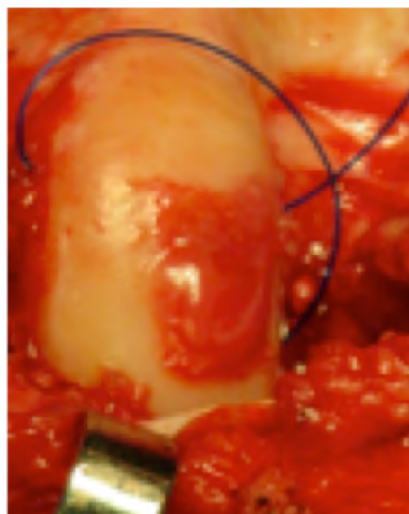


**Figura 17.** Lesión condral que no alcanza el hueso subcondral.

En caso de sangrar se descartó el animal para el estudio, a excepción, lógica, del grupo de microfracturas. Las realizamos de forma unilateral para no producir un déficit importante en la capacidad de deambulación del animal.

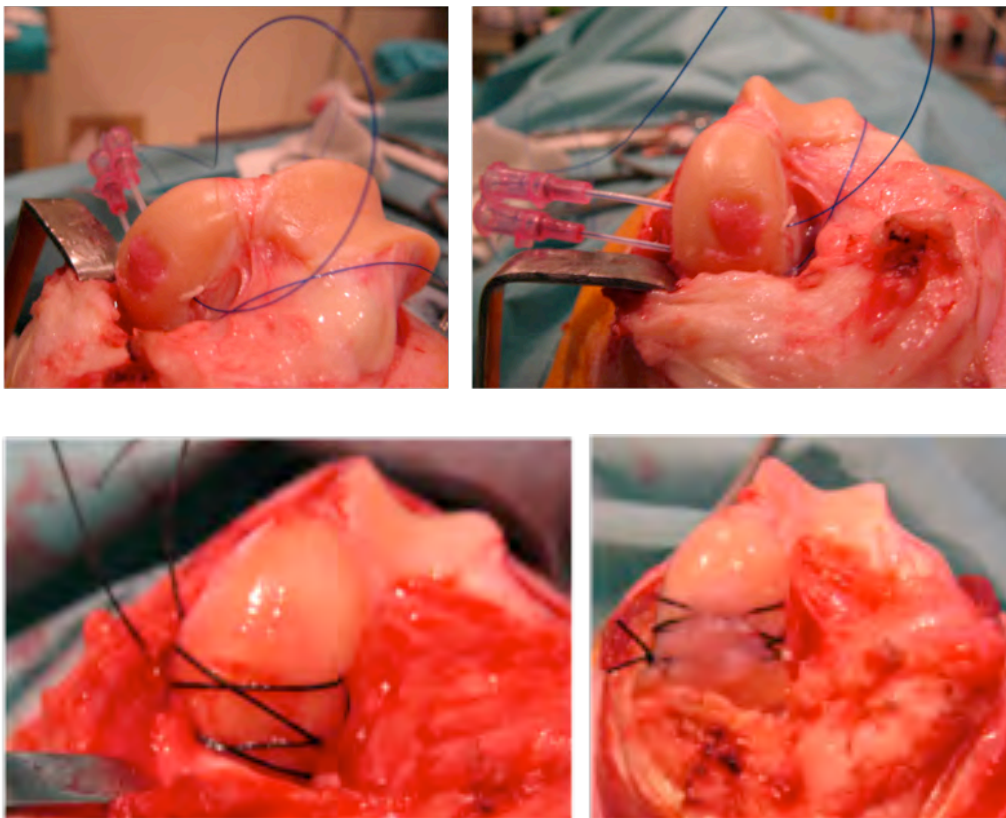
Como grupo experimental utilizamos la membrana en fresco que fue comparada con la utilización de membrana amniótica conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , la membrana amniótica conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  asociada a perforaciones en la lesión y la membrana amniótica conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  previo cultivo con células madres mesenquimales. Así mismo, compararemos todos los grupos con la lesión dejada a su evolución natural.

En el grupo control, después de limpiar de cartílago el interior de la lesión, se colocó la rótula en posición anatómica y se cerró por planos. En los grupos en los cuales se usó la membrana, se efectuó la limpieza de cartílago y se colocó la membrana amniótica con la capa celular contactando con el hueso subcondral y rellenando el espesor de la lesión con el resto de la membrana a modo de multicapas (figura 18).



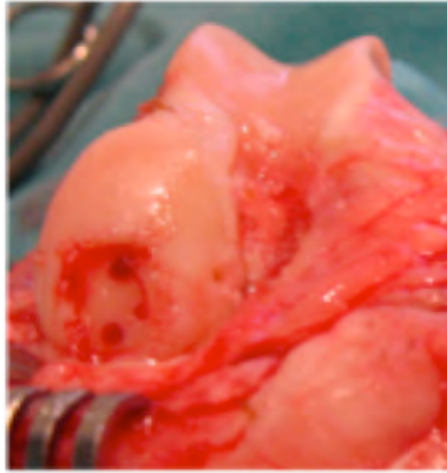
**Figura 18.** Lesión condral tapizada por la membrana amniótica dispuesta en multicapas.

Se hicieron tres túneles transcondíleos por donde se pasó una sutura no reabsorbible de forma cruzada (seda o monofilamento de 2-0). Un pasahilos de nitinol facilitó la técnica. Formamos dos cruces de la sutura, formando dos "X" para mantener la membrana apuesta a la lesión (figura 19). De esta forma evitamos perforar el hueso cerca de la lesión y evitamos el sangrado que podría contribuir a la reparación de las lesiones efectuadas.



**Figura 19.** Desarrollo de la técnica utilizada para el mantenimiento de la membrana en la lesión.

En el grupo de microfractura recubierta de membrana, realizamos dos orificios con un picahielos de Steadman separados por tres milímetros de distancia (figura 20) y lo recubrimos con membrana amniótica congelada según se ha descrito previamente.



**Figura 20.** Desarrollo de las microfracturas sobre la lesión condral generada.

### ***Cuidados post-operatorios***

Hasta que cesaron los efectos de la anestesia los animales permanecieron en una sala anexa al quirófano, retirándose la cánula endovenosa, y desde allí fueron trasladados al animalario donde permanecieron estabulados, hasta la fecha del sacrificio.

La pauta analgésica utilizada fue de Ketoprofeno 3 mg/Kg, vía intramuscular (IM), cada 24 horas durante los 3 días posteriores a la intervención. Los animales deambularon libremente en su jaula y dispusieron de comida y agua *ad libitum* desde el primer día después de la intervención.

Los animales fueron controlados diariamente, para evaluar su deambulación y la evolución de la herida quirúrgica.

### ***Sacrificio de los animales***

Antes del sacrificio, el animal fue sedado mediante la administración de una

dosis (IM) de Ketamina (10 mg/Kg) y Xilacina (0,2 mg/Kg). Seguidamente se le administró vía endovenosa (vena safena) 1 gramo de Tiobarbital® y 20 ml de cloruro potásico (KCl). Todos los animales fueron sacrificados a las 12 semanas de evolución.

## **ESTUDIOS REALIZADOS**

Comparamos si existe diferencia histológica en cuanto a regeneración del cartílago hialino entre los grupos control, y el grupo a estudio (membrana amniótica en fresco), para lo cual se analizaron con técnicas histoquímicas las biopsias obtenidas.

### *Histología*

Después del sacrificio del animal se extrajo completamente la rodilla, se desarticuló y se obtuvo la extremidad distal del fémur que se cortó con la sierra. Después se hizo otro corte, dejando el cóndilo externo que se volvió a cortar, coronalmente, por delante a ras de la lesión y también por su borde posterior. Finalmente, se efectuó un corte transversal para dejar la lesión con un grosor máximo de un centímetro y facilitar así la decalcificación y posterior corte.

La fijación de las piezas se efectuó en formol, al 4%, tamponado con fosfatos, durante 24 horas. La deshidratación se realizó mediante alcoholes de gradación creciente (70%, 80%, 96% y 100%), cambiando dichos alcoholes cada 12 horas manteniéndose en agitación constante en un sistema automático (LEICA). Posteriormente se introdujeron en xileno durante 4 horas y se incluyeron en parafina a una temperatura de 60°C. Finalmente se realizaron cortes de 4 µm de grosor en un microtomo convencional (Microm®; modelo HM 350 S, Alemania) y se tiñeron con tricrómico de Masson y safranina-O. Se efectuó un estudio microscópico y una

valoración de la calidad del tejido producido con la escala de O'Driscoll (87) (88) (tabla 1).

CARACTERÍSTICA	PUNTUACIÓN
<b>1. NATURALEZA DEL TEJIDO PREDOMINANTE</b>	
Morfología celular	
Cartílago articular hialino	4
Mesenquima diferenciado incompleto	2
Tejido fibroso o hueso	0
Tinción con safranina-O de la matriz	
Normal o casi normal	3
Moderada	2
Ligera	1
No	0
<b>2. CARACTERÍSTICA ESTRUCTURAL</b>	
Regularidad de la superficie	
Suave e intacta	3
Laminación superficial horizontal	2
Fisuras 25-100% del grosor	1
Grave disrupción, fibrilación	0
Integridad estructural	
Normal	2
Ligera disrupción, quistes	1
Grave desintegración	0
Grosor	
100% o cartílago adyacente normal	2
50-100% de cartílago normal	1
0-50% de cartílago normal	0
Unión con cartílago adyacente	
Unido en ambos extremos del injerto	2
Unido en un extremo del injerto	1
No hay unión	0

<b>3. CAMBIOS CELULARES DE DEGENERACIÓN</b>	
Hipoceularidad	
Celularidad normal	3
Hipoceularidad ligera	2
Moderada hipoceularidad	1
Grave hipoceularidad	0
Clusters celulares	
No hay clusters	2
<25% de las células	1
25-100% de las células	0
<b>4. CAMBIOS DEGENERATIVOS EN CARTÍLAGO ADYACENTE</b>	
Celularidad normal, sin clusters, tinción normal	3
Celularidad normal, algunos clusters, tinción moderada	2
Hipoceularidad ligera o moderada, ligera tinción	1
Grave hipoceularidad, tinción pobre o no visible	0
<b>TOTAL</b>	<b>0 – 24</b>

**Tabla 1.** Escala de O'Driscoll.

### ***Cultivo y aislamiento de las células madres pluripotenciales mesenquimales***

Las células mononucleares de médula ósea fueron aisladas por centrifugación por la densidad de Ficoll. Las células mononucleares ( $1 \times 10^6$ /ml) se cultivaron en medio Dulbecco modificado Eagles (1000 mg/l de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) (Sigma Aldrich, EE.UU), con un 1% penicilina / estreptomycin, 10% de suero bovino fetal (Gibco BRL, EE.UU) a 37° C en el 95% aire con dióxido de carbono 5% a 100% de humedad. Se distinguieron por su morfología, adherencia al plástico de cultivo y expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo.

### *Análisis estadístico*

Nuestro análisis estadístico previsto será descriptivo. La variable principal de nuestro estudio será la calidad del tejido neoformado macroscópico y microscópico, cuantificándolo siguiendo la escala de O'Driscoll (87) (88).

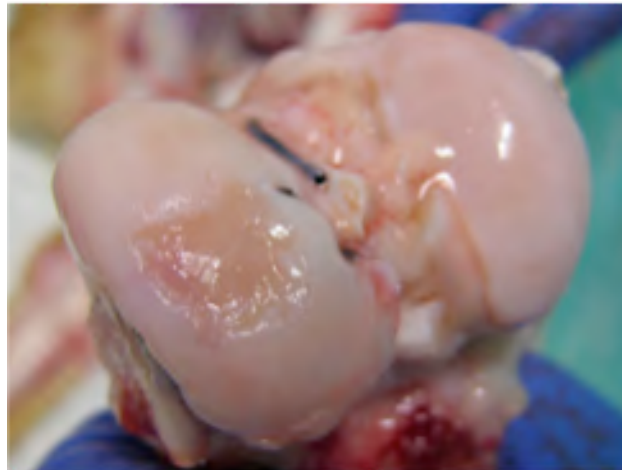
## **4. RESULTADOS**

## RESULTADOS CLÍNICOS

No se detectó ninguna infección a lo largo de todo el periodo de seguimiento del animal. En ningún caso se observó ninguna reacción inflamatoria que pudiera sugerir un rechazo del huésped hacia el tejido trasplantado.

## RESULTADOS MACROSCÓPICOS

En todos los casos fue identificable la lesión producida (figura 21) y en ningún caso se observó la regeneración completa de la misma.



**Figura 21.** Muestra macroscópica de una lesión tras el estudio

Las muestras obtenidas fueron muy variadas. En ocasiones permanecía la sutura cuando habíamos utilizado monofilamento. No encontramos ninguna sutura de seda en su posición en el momento del sacrificio (figura 22).



**Figura 22.** Varias muestras macroscópica de lesiones tras el estudio.

También observamos en algún caso la lesión recubierta por un tejido fibroso, fácil de identificar, que sospechamos eran los restos de la membrana amniótica (figura 23) aunque también vimos restos de la membrana colocada en la lesión (figura 24).



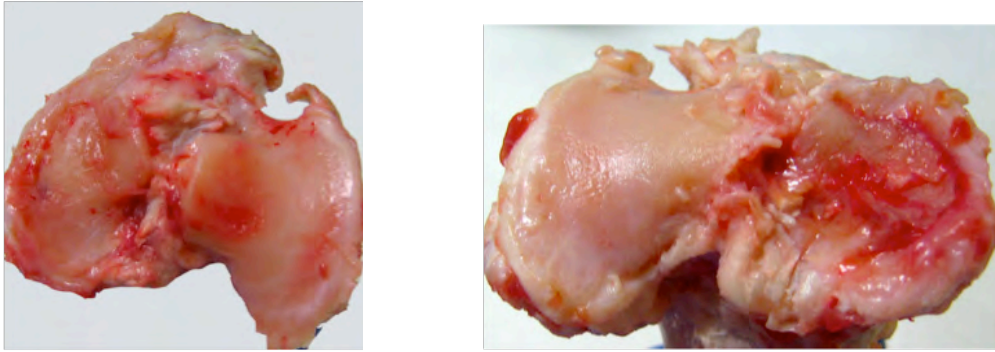


**Figura 23.** Tejido fibroso sobre la lesión condral en una de las muestras del estudio.



**Figura 24.** Varias muestras con restos de membrana amniótica que permanecían sobre la lesión al final del estudio

Aunque no fue objeto de nuestro estudio, observamos alteraciones en la superficie tibial correspondiente, a pesar de que no actuamos sobre ella ni extirpamos el menisco (figura 25).



**Figura 25.** Muestras donde se observa una alteración de la superficie tibial al final del estudio

## HISTOLOGÍA

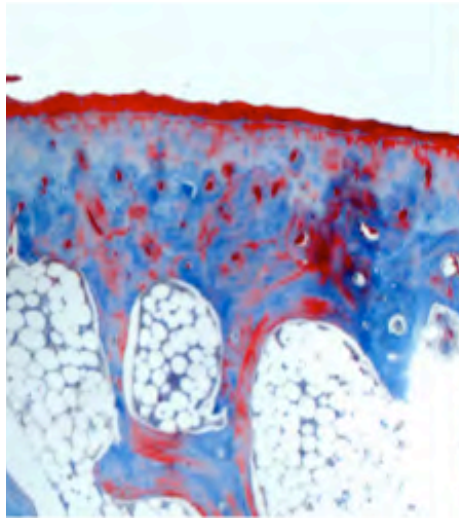
### *Grupo control*

En el grupo control no se observó ninguna respuesta reparativa ni en el la zona del defecto, ni en la zona perilesional sana (figura 26).

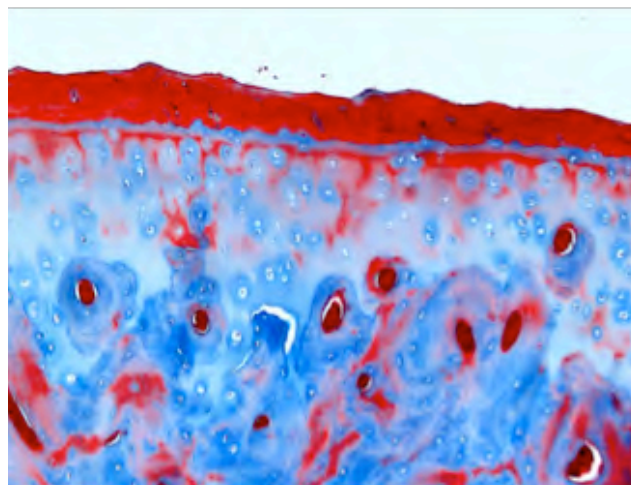


**Figura 26.** Muestra histológica del grupo control (x4)

Los animales analizados del grupo control no mostraron ninguna evidencia de formación de cartílago. En ningún caso se observó una imagen de regeneración total o parcial de la lesión. En las imágenes se apreció el hueso subcondral intacto, las trabéculas metafisarias con aspecto normal y una capa muy fina de cartílago en algunas zonas sin proliferación celular, si bien ha desaparecido en la mayoría (Figura 27 A y B).



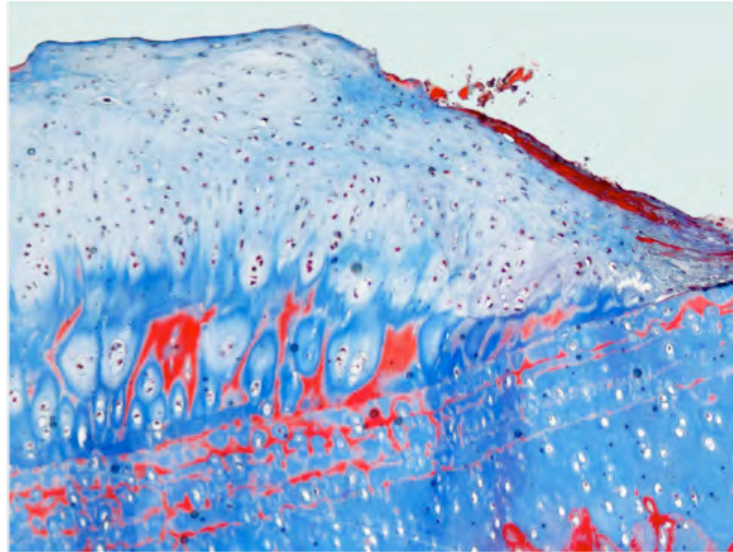
**Figura 27 A.** Muestra histológica del grupo control (x4)



**Figura 27 B.** Muestra histológica del grupo control (x10)

### *Grupo con membrana amniótica congelada*

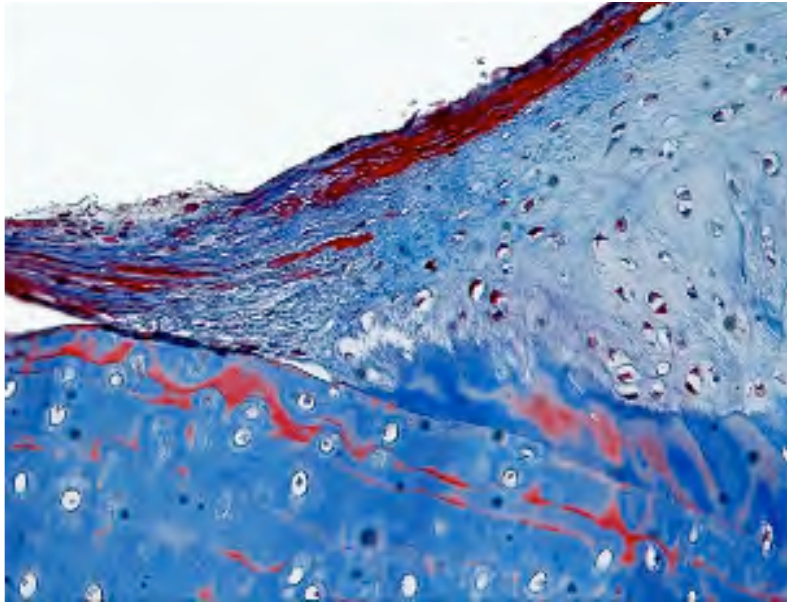
En todos los defectos condrales donde se aplicó la membrana amniótica, congelada o en fresco, se observaron respuestas de intentos reparativos en la zona perilesional sana (figura 28).



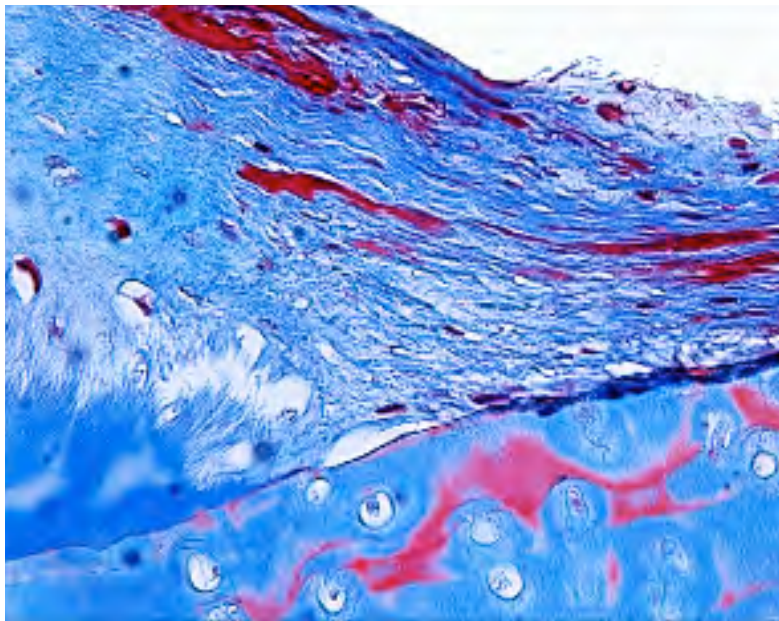
**Figura 28.** Muestra histológica del grupo con membrana congelada (x 10)

Si bien se vio una disrupción de la matriz extracelular, también se acompañó de la formación de grupos isogénicos de condrocitos. En algunas muestras, se observaron células con una morfología redondeada semejante a condrocitos dispuestos en las capas de las zonas más superficiales.

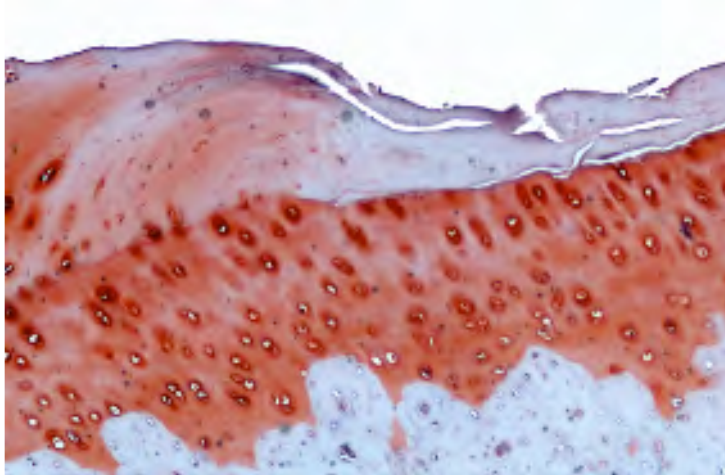
Por otra parte, aunque fueron restos, en ocasiones observamos que la membrana amniótica trasplantada estaba integrada en la zona perilesional dando un tejido de transición entre el tejido cartilaginoso, de la articulación, y el tejido fibroso de la membrana (figura 29 A, B y C). En otras muestras, sin embargo, no encontramos restos de la membrana implantada.



**Figura 29 A.** Muestra histológica del grupo con membrana congelada (x 10)



**Figura 29 B.** Muestra histológica del grupo con membrana congelada (x 20)

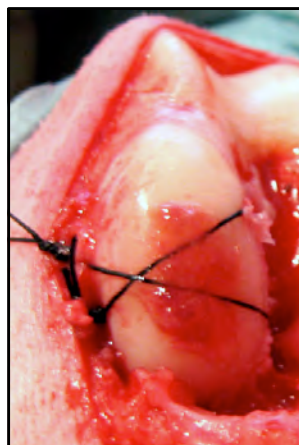


**Figura 29 C.** Muestra histológica del grupo con membrana congelada (Safranina x10)

Revisando las muestras obtenidas en este grupo, describimos los hallazgos histológicos más representativos de las mismas.

#### **Muestra 1.A.**

La muestra 1.A. fue intervenida quirúrgicamente al igual que en otras, con un buen recubrimiento y relleno con la membrana congelada.



**Figura 1.A macro**

En el límite entre la lesión efectuada y el cartílago no lesionado apareció la reacción característica del intento de reparación del cartílago con desestructuración de la matriz extracelular y formación de grupos isogénicos de condrocitos. En algunas zonas más superficiales aparecieron células redondeadas, como condrocitos, dispuestas en hileras.

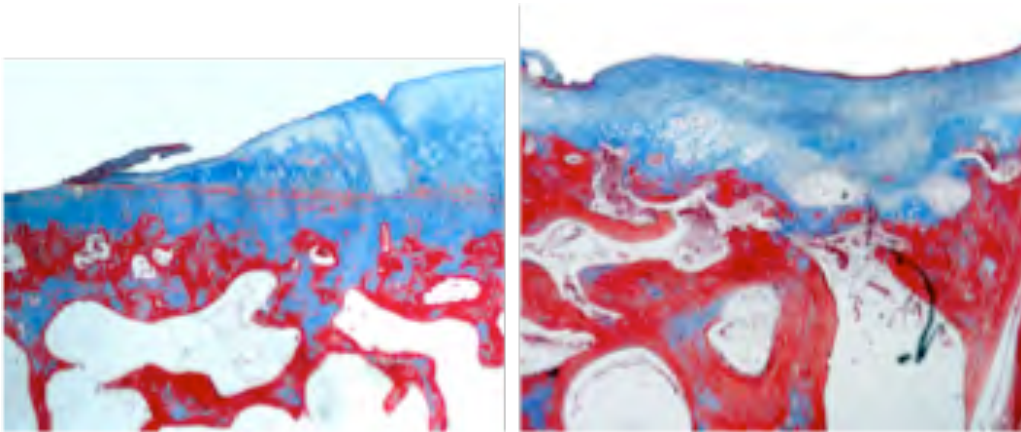


Figura 1.A. (x 4)

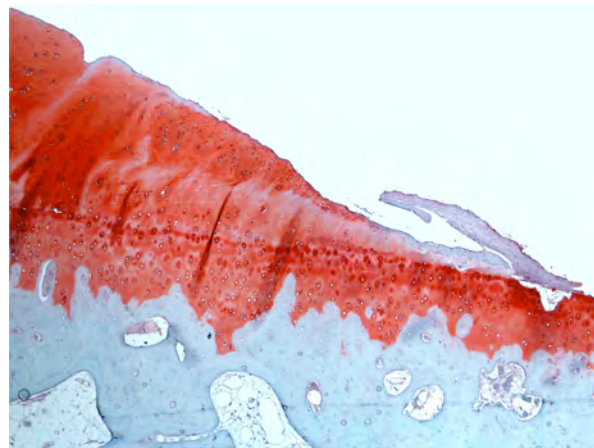


Figura 1.A. (Safranina x 4)

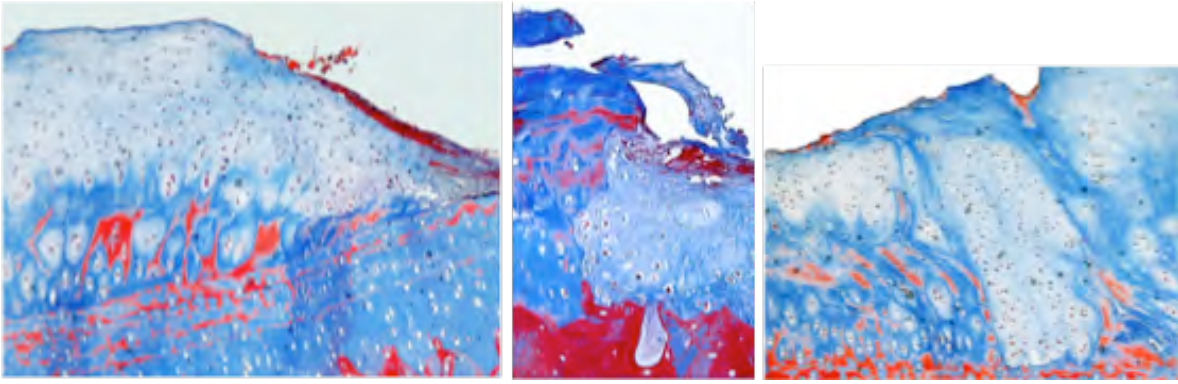


Figura 1.A (x 10)

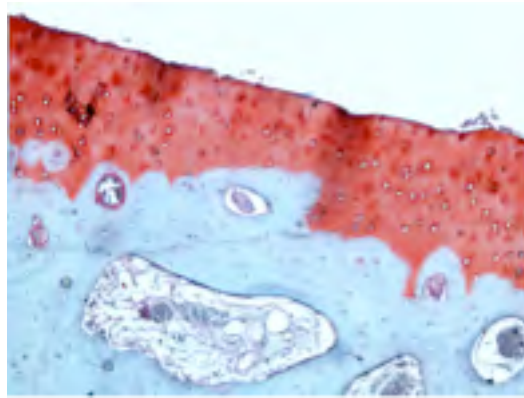


Figura 1.A. (Safranina x 10)

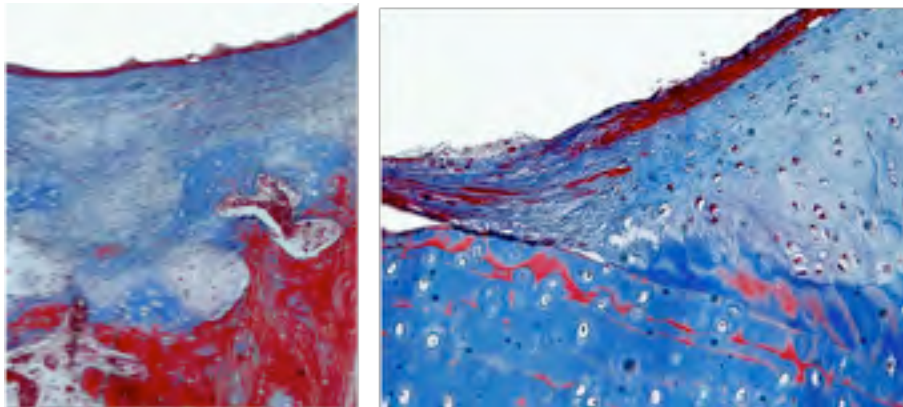


Figura 1.A. (x 2,5 y x 10 TM)

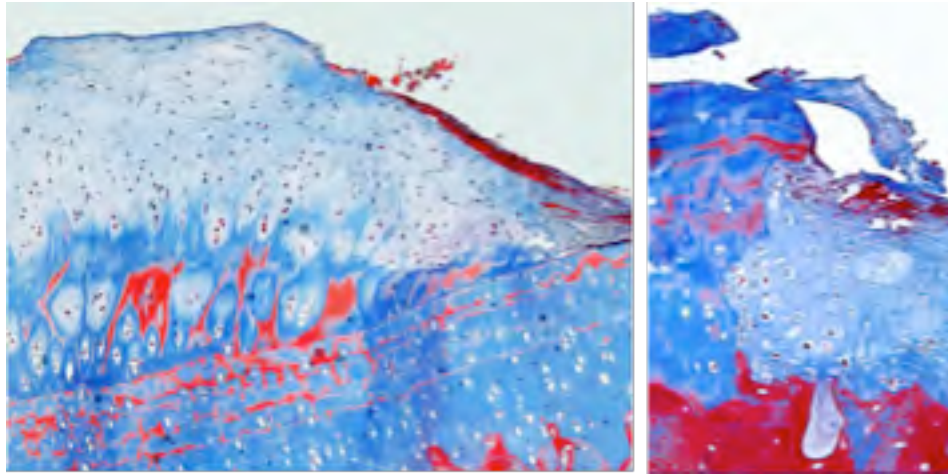


Figura 1.A. (x 10)

A mayor aumento (x20) se observó una perfecta integración de las fibras de colágeno de la membrana con el propio cartílago articular.

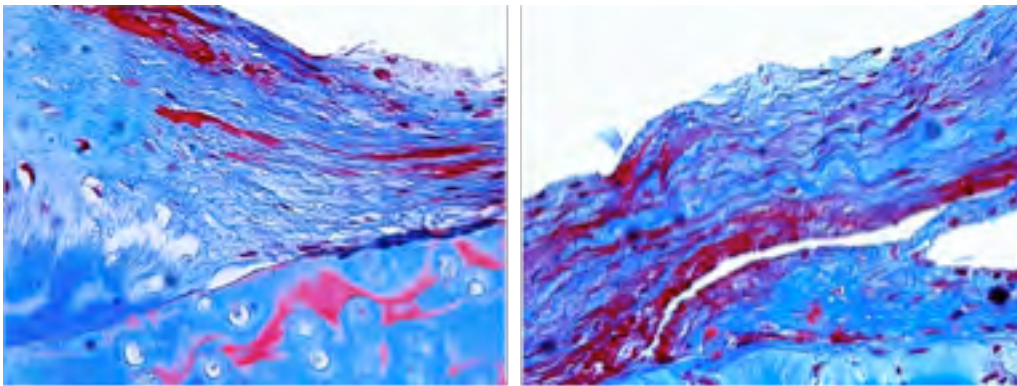


Figura 1.A. (x 20)

### **Muestra 1.B.**

La muestra 1.B quedó después de la cirugía recubierta y rellenada por la membrana. La pieza macroscópica, después del sacrificio, presentó una imagen de la lesión sin recubrir por tejido.

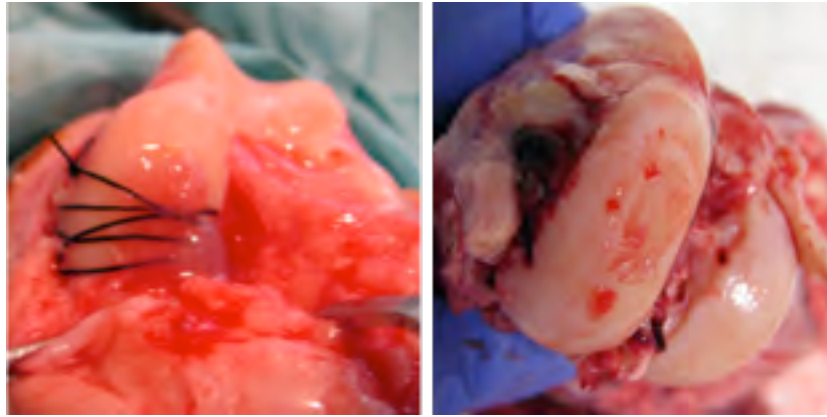


Figura 1.B. macro

Los cortes histológicos no mostraron signos de reparación, si bien quedaron restos de la membrana ocupada por pocas células redondeadas, aisladas, en nichos sin comunicarse con sus vecinas, que recuerdan condrocitos. También apreciamos células hemáticas. Se observó la misma imagen en los bordes de cartílago no alterado que en las piezas anteriores y la zona del cartílago existente por debajo de la lesión mostró tinción con la safranina sin observarse alteraciones morfológicas.

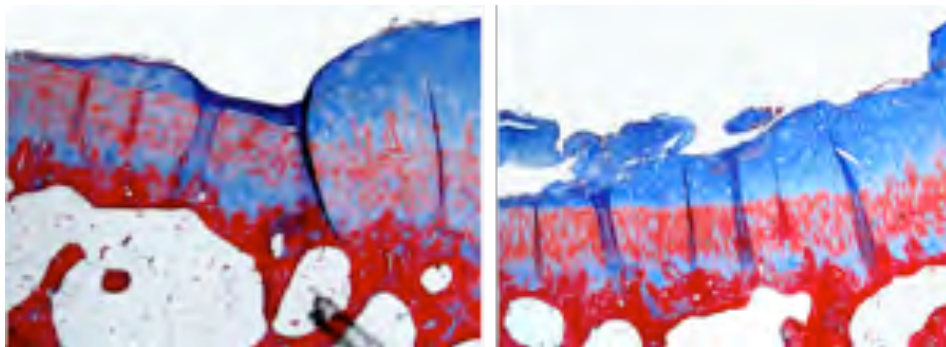


Figura 1.B. (x 4)

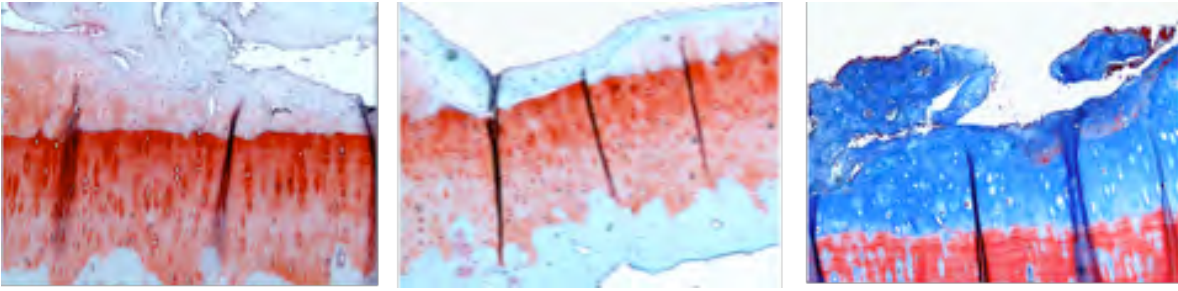


Figura 1.B. (x 10)

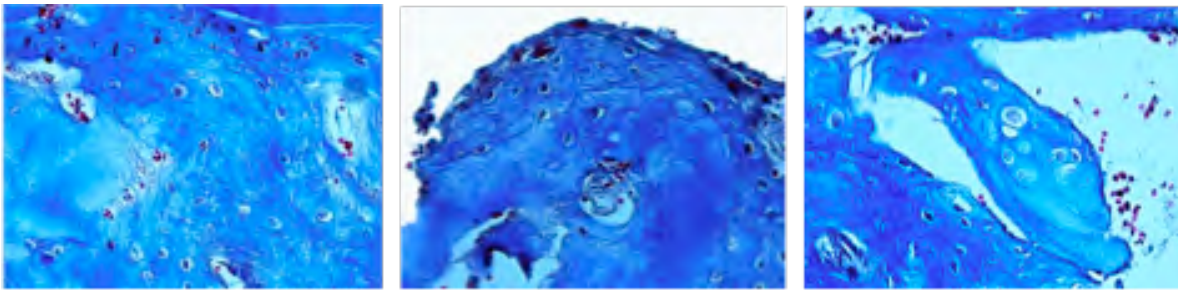


Figura 1.B. (x 20)

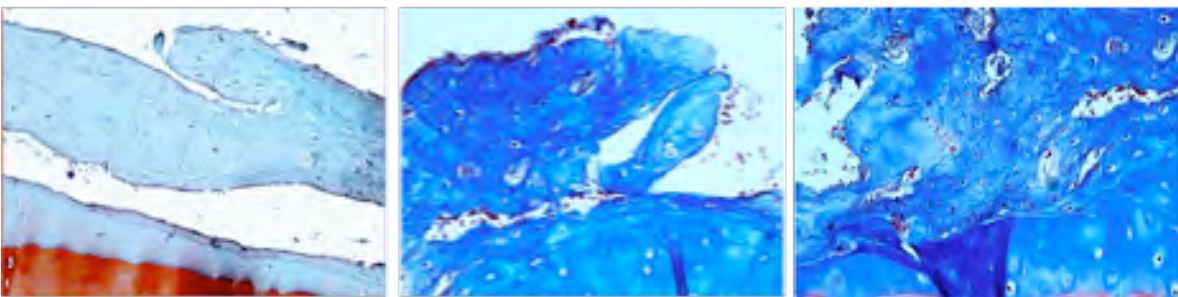
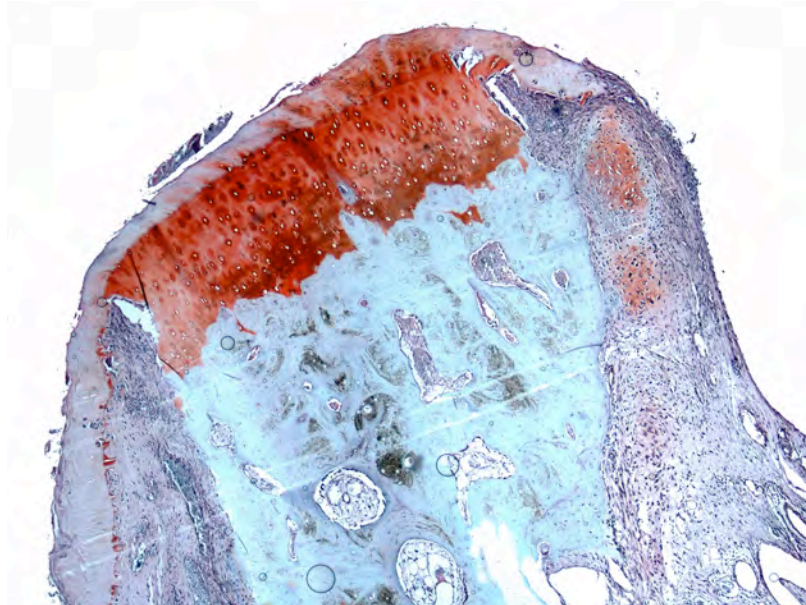


Figura 1.B. (x 40)

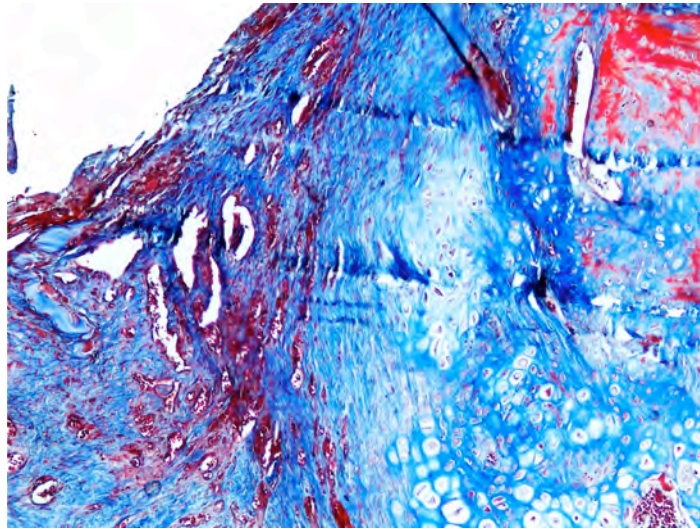
### ***Grupo de microfracturas recubiertas con membrana amniótica congelada***

En el grupo de las microfracturas, en ninguno de los animales se observó el relleno de la zona lesionada con ningún tipo de tejido.

Las úlceras aparecían en forma de cavidades ocupadas, en parte, por tejido fibroso sin ningún tipo de intento de reparación cartilaginosa. Como característica del tejido fibroso de relleno encontramos un número muy elevado de fibrocitos (figuras 30 A y B).



**Figura 30 A.** Muestra histológica del grupo de microfracturas (x 4)

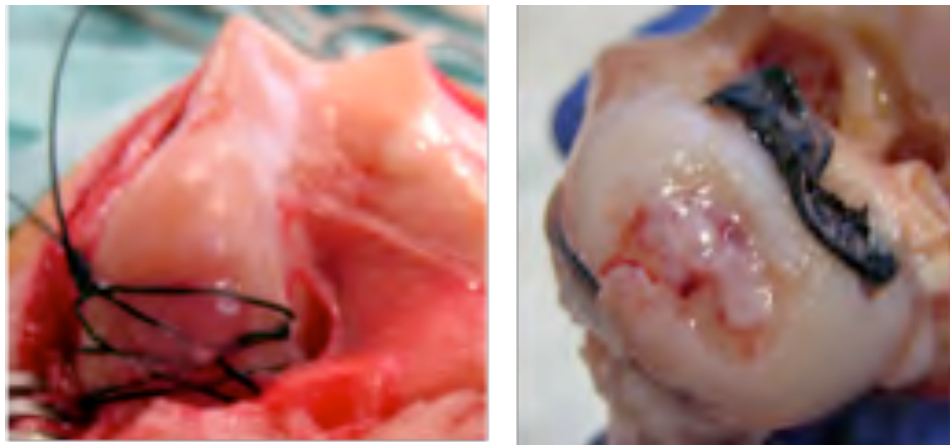


**Figura 30 B.** Muestra histológica del grupo de microfacturas (x 10)

Revisando las muestras obtenidas en este grupo, describimos los hallazgos histológicos más representativos de las mismas.

**Muestra 2.A.**

La pieza presentó un aspecto enrojecido con un tejido fibroso recubriendo la zona de la lesión que debían ser los restos de la membrana.



**Figura 2.A.** macro

Los cortes histológicos demostraron la poca formación de cartílago, el relleno por tejido fibroso de los orificios efectuados con las microfracturas y la aparición de tejido fibroso con vasos y células hemáticas, en algunas zonas, sobre el hueso subcondral. La tinción con safranina solo se observó en algunos puntos sin apreciarse nunca sobre los orificios efectuados en el acto quirúrgico. En algunas zonas, cercanas al borde de la lesión se observaron restos de la membrana, con fibras paralelas a la superficie articular y con muchas células en su interior con aspecto de fibroblastos.

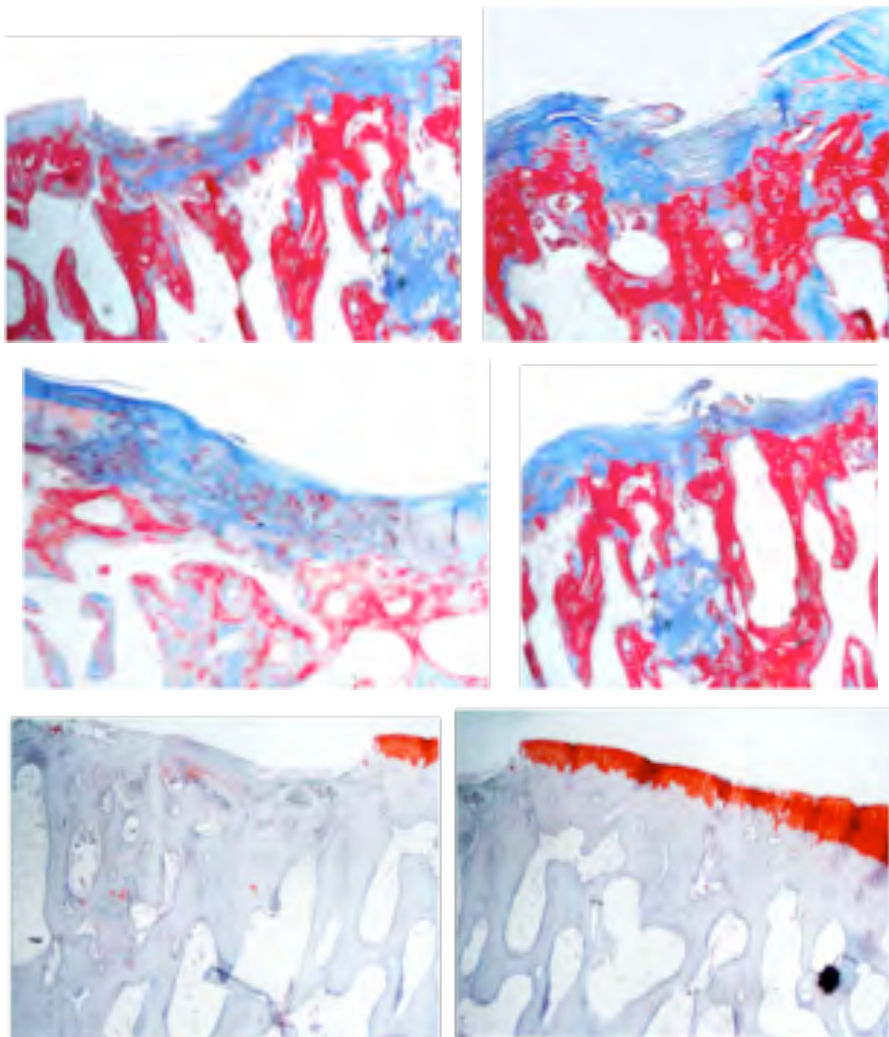


Figura 2.A. (x 2,5)

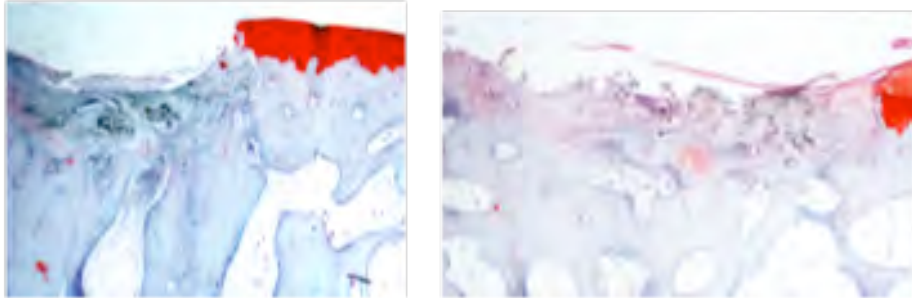
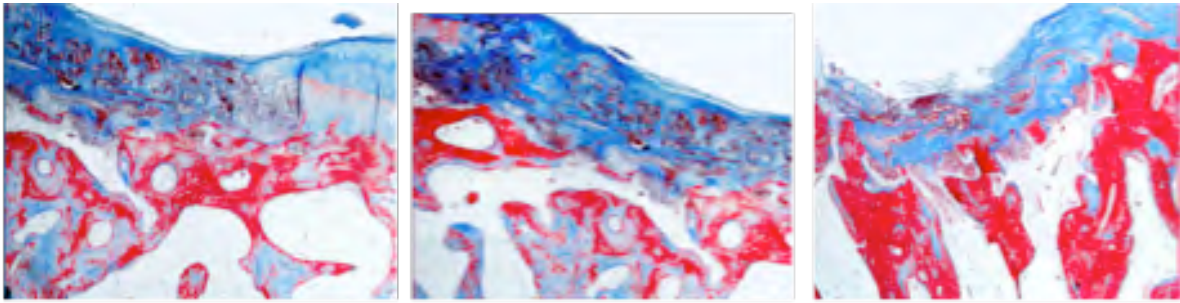
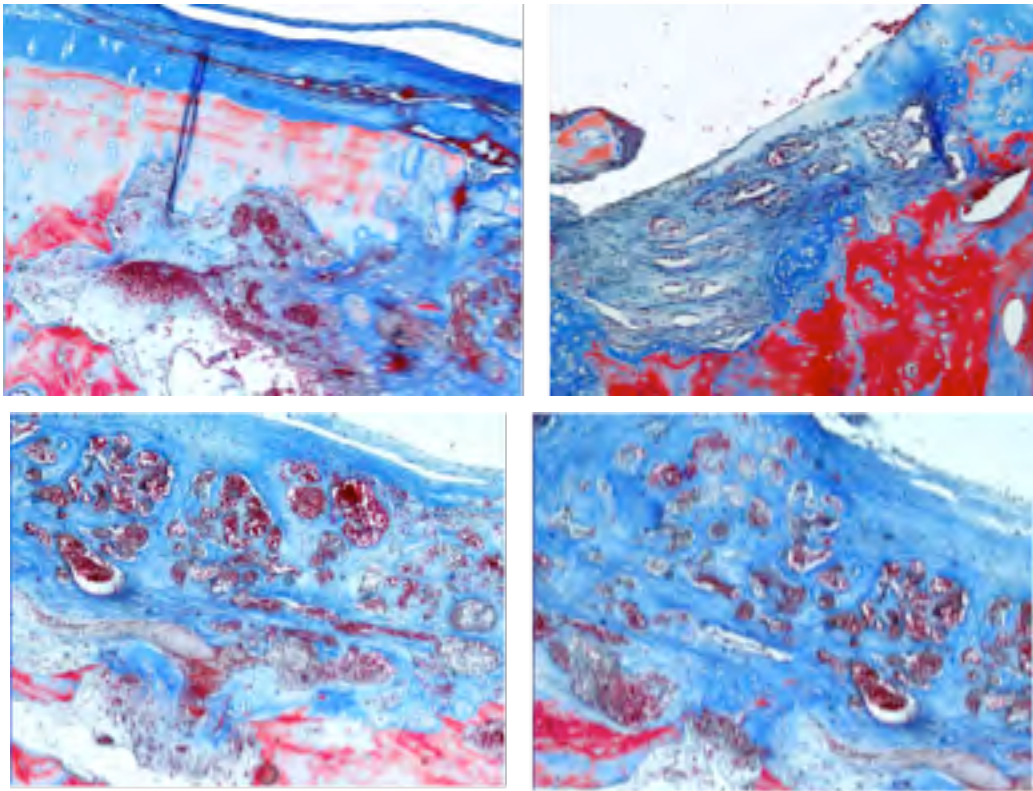


Figura 2.A. (x 4)



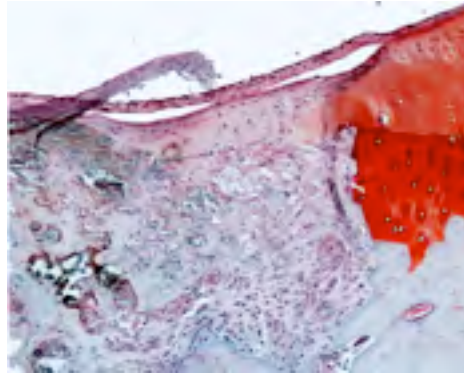
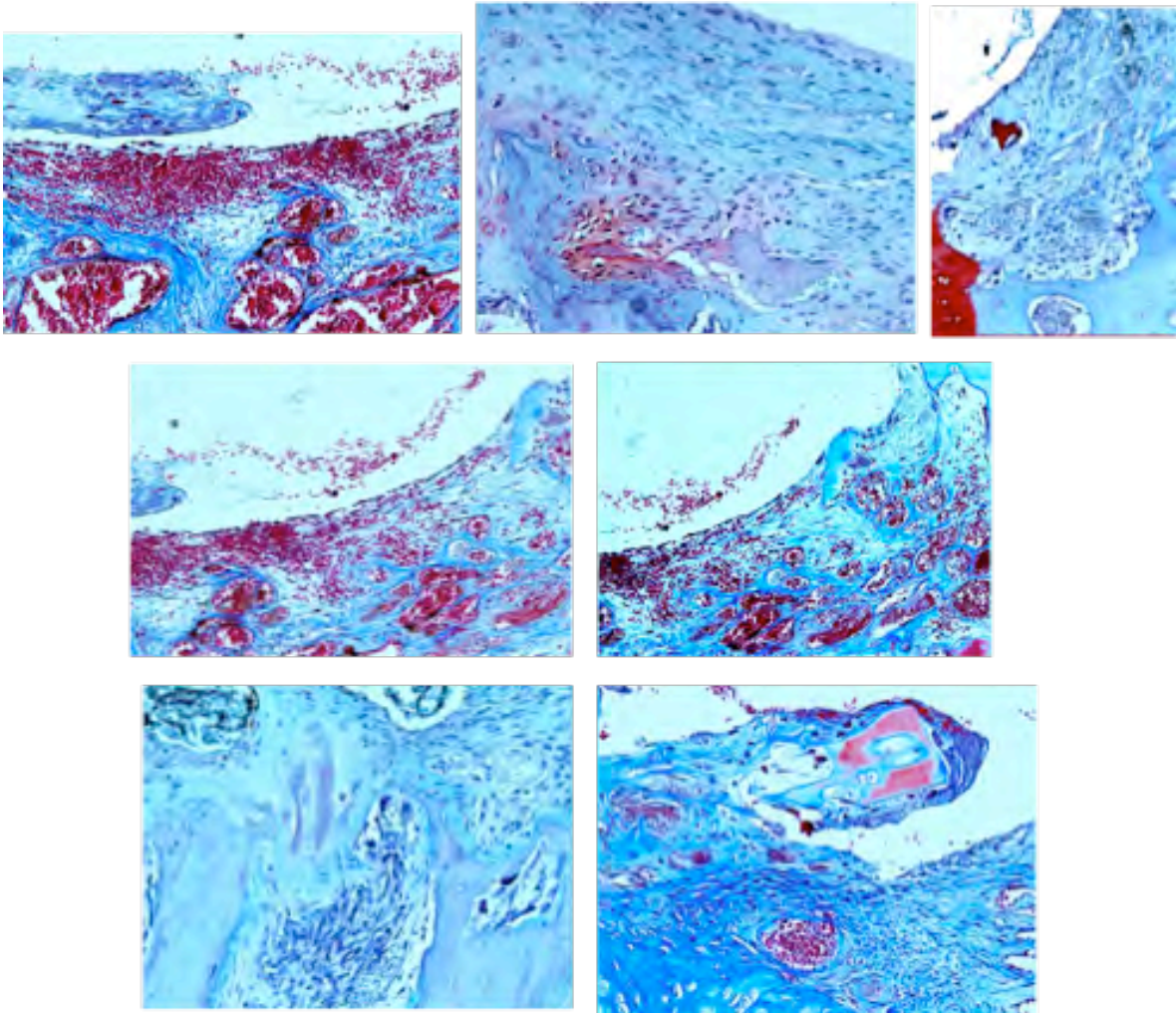


Figura 2.A. (x 10)



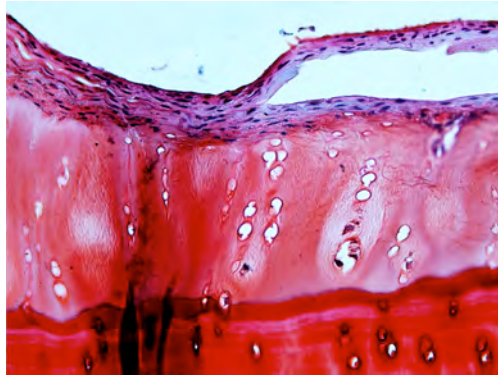


Figura 2.A. (x 20)

### Muestra 2.B.

La muestra 2.B. presentó un aspecto característico en las microfracturas después de la cirugía. Se efectuaron dos orificios con sangrado abundante que fue recubierto con la membrana amniótica congelada. En el momento del sacrificio permanecían los dos orificios con restos de un tejido fibroso que no cubría toda la lesión.

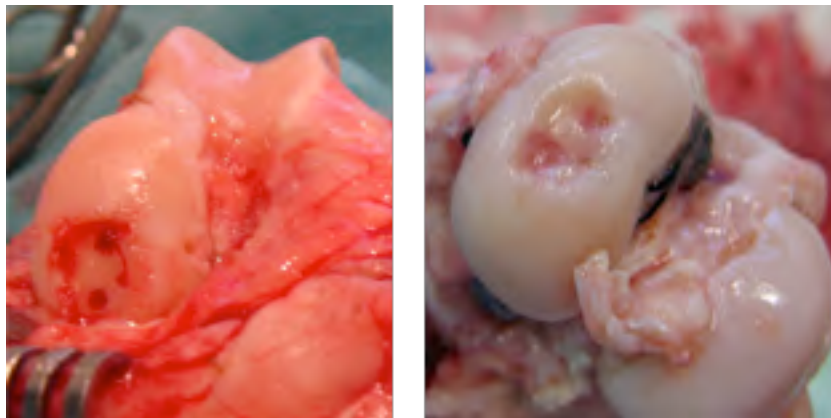


Figura 2.B. macro

La zona de los orificios no presentaron regeneración de cartílago estando rellenos de un tejido fibroso, sin teñir con safranina, y apreciando zonas con vasos y células hemáticas. En las zonas más profundas de los orificios observamos núcleos de osificación endondral pero siempre alejadas del orificio de la microfractura.

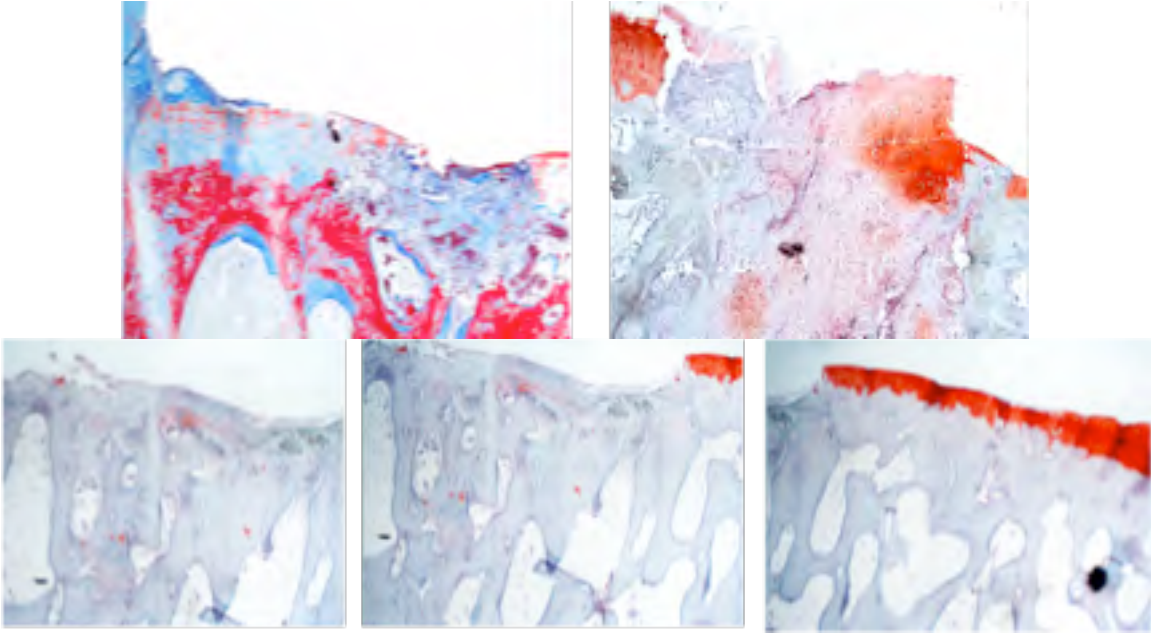


Figura 2.B. (x 2,5)

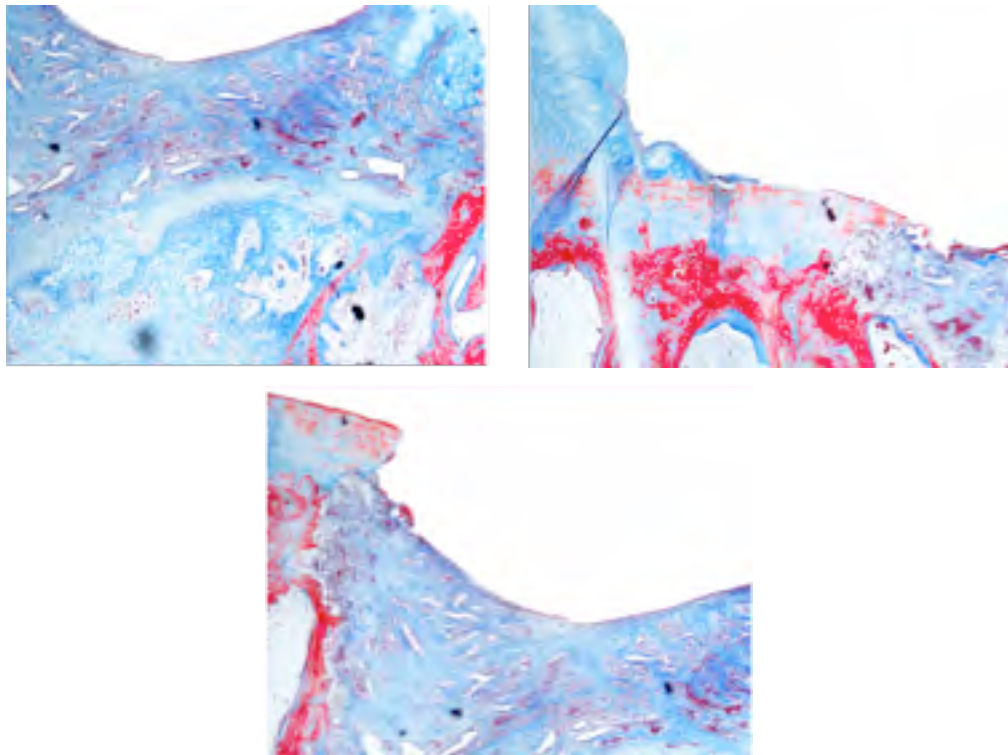


Figura 2.B. (x 4)

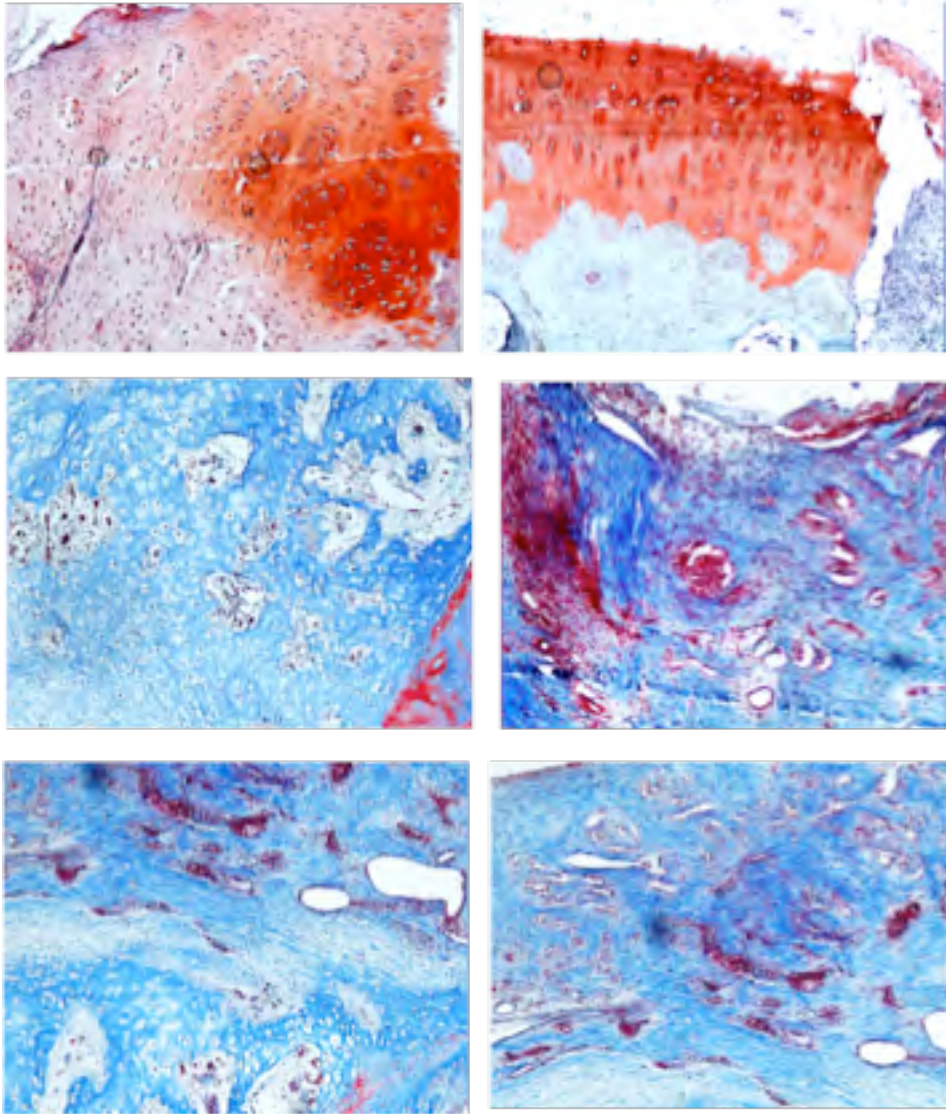
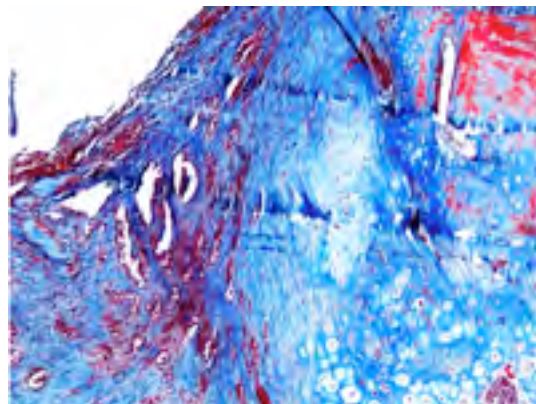


Figura 2.B. (x 10)



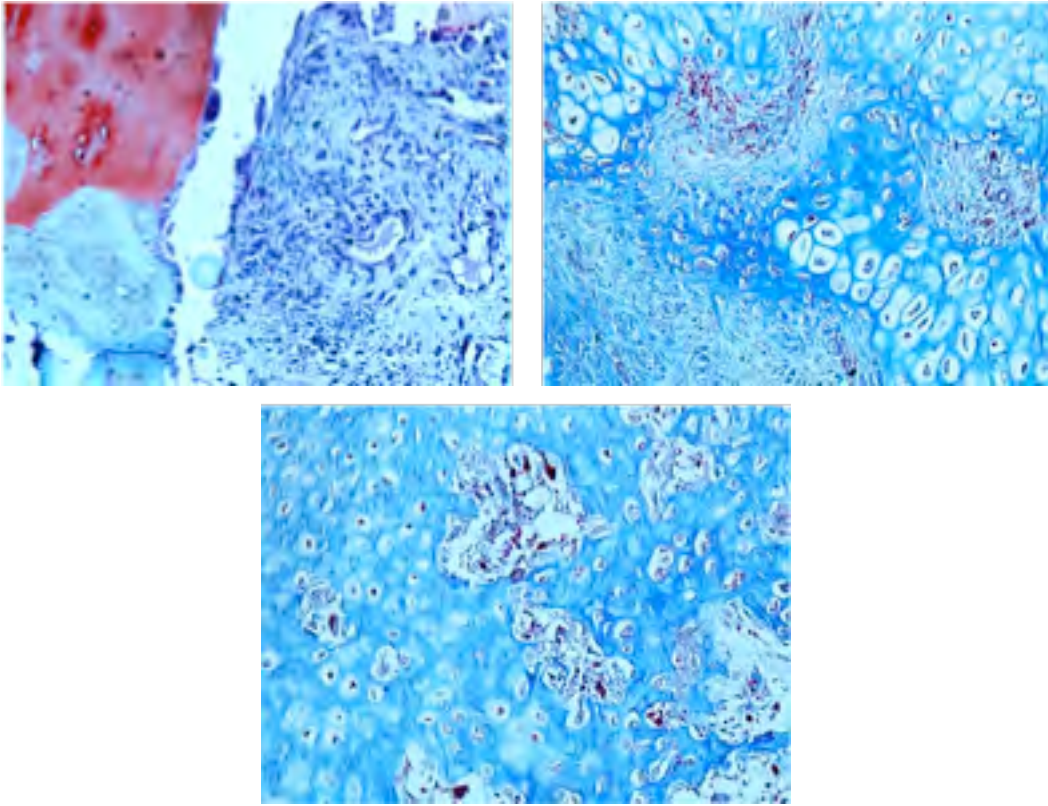


Figura 2.B. (x 20)

### **Muestra 2.C.**

Tampoco la muestra 2.C. permitió visualizar regeneración cartilaginosa en la zona de la lesión. La pieza obtenida después del sacrificio del animal estaba recubierta por una fibrosis probablemente provocada por la propia membrana.

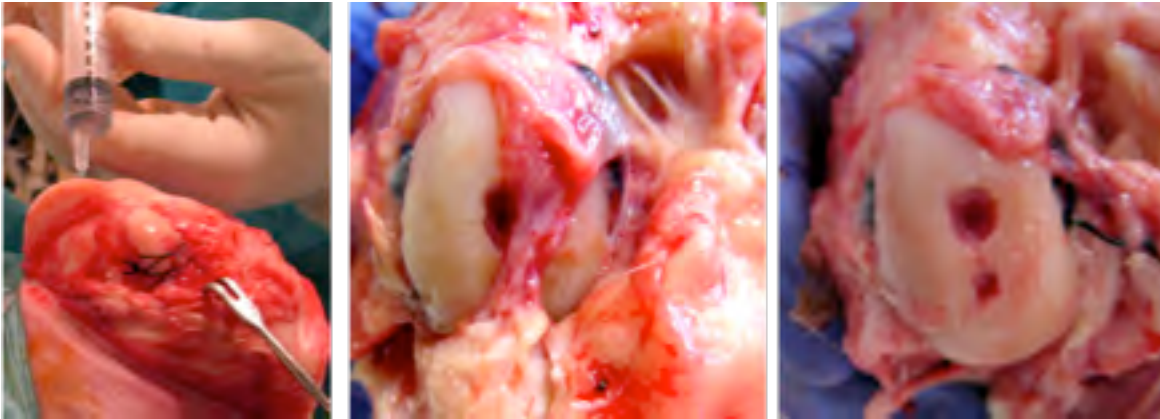


Figura 2.C. macro

Se observó un relleno fibroso abundante con riqueza celular pero sin ver áreas de cartílago.



Figura 2.C. (x 2,5)

La imagen siguiente presenta una trabécula superficial presentando restos de cartílago en su superficie teñidos por la safranina y superficie fibrosa a ambos lados sin formación ni de hueso ni tampoco de cartílago, aunque se apreciaron dos pequeños islotes con una suave tinción de safranina.

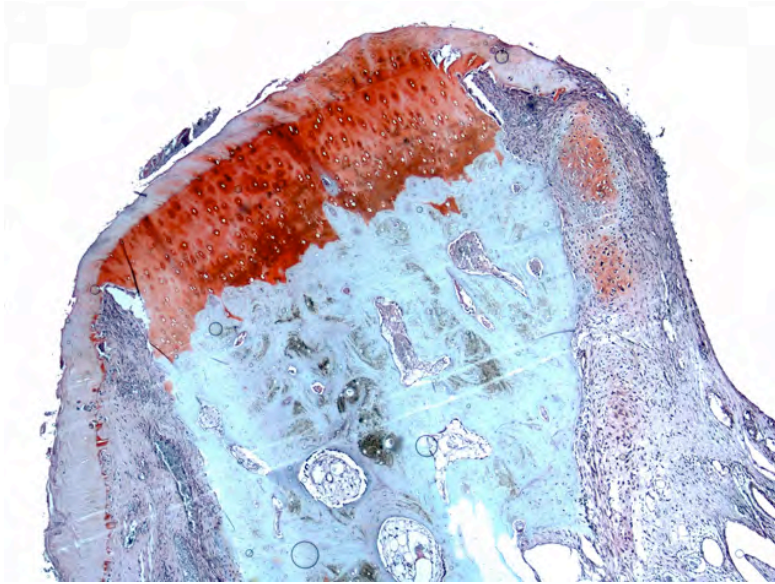


Figura 2.C. (x 4)

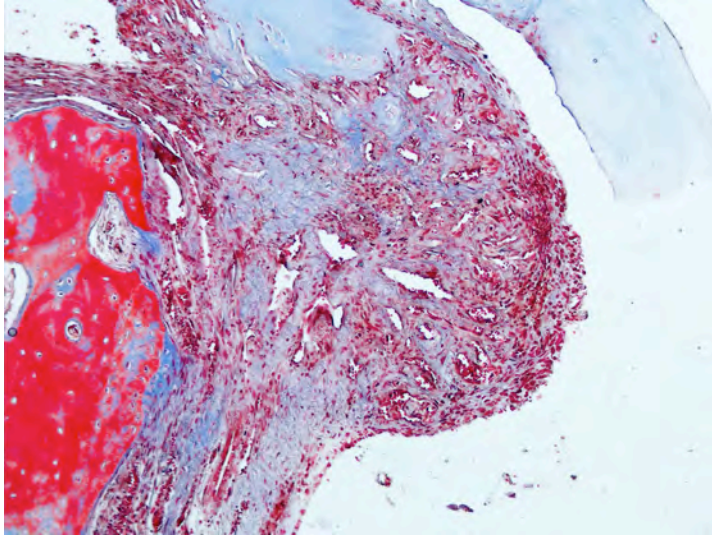
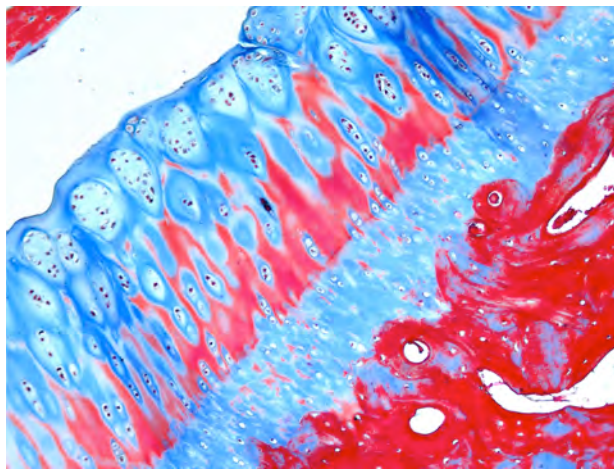


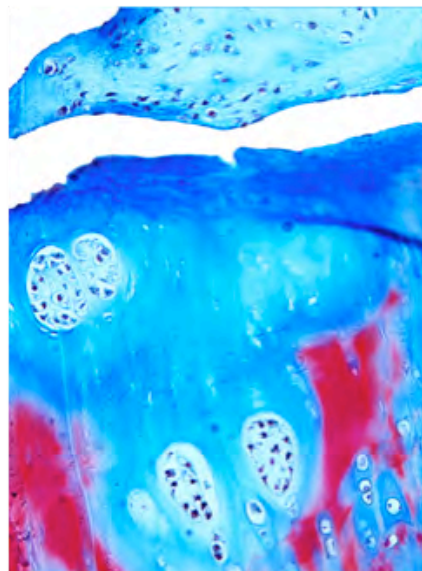
Figura 2.C. (x 10)

### *Grupo de membrana amniótica congelada con cultivo de células mesenquimales*

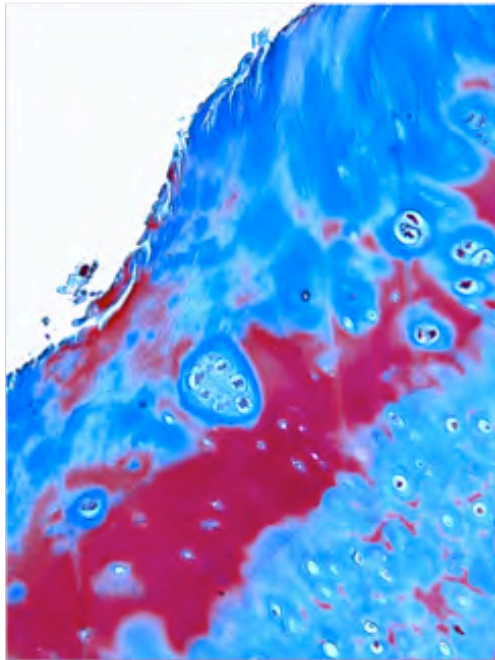
En el grupo de la membrana cultivada con células mesenquimales se observó la formación de grupos celulares isogénicos en la superficie del defecto. Estos grupos celulares, células redondeadas y pequeñas semejantes a condrocitos, estaban encapsulados en la superficie de la lesión y, también, los vimos en la superficie articular (figuras 31 a 33).



**Figura 31.** Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas (x 10)

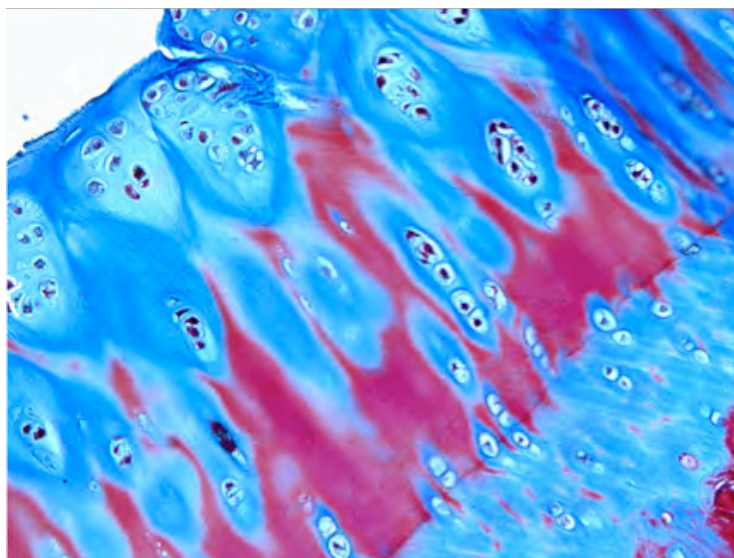


**Figura 32.** Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas (x 20)



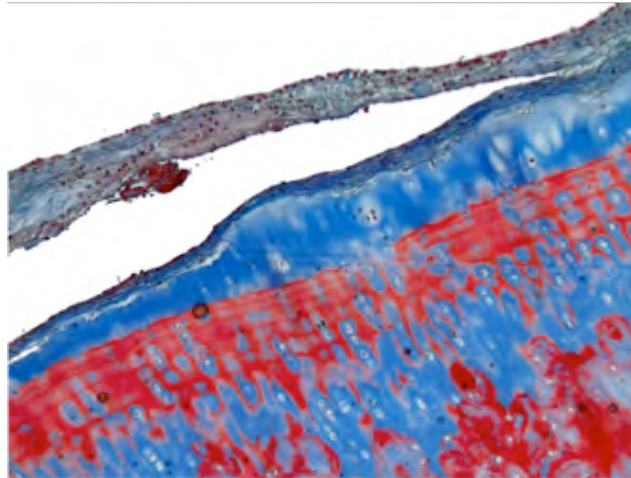
**Figura 33.** Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas (x 20)

En ocasiones se observaron un gran número de ellos (figura 34).

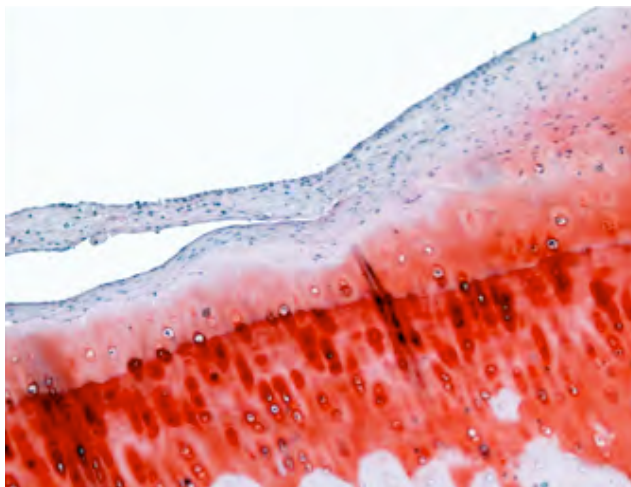


**Figura 34.** Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas (x 20)

Por su parte, la membrana sobre la lesión mostró una estructura no fibrilar con áreas con células fusiformes como fibroblastos y otras zonas se mantuvieron completamente acelulares (figura 35 A y B).



**Figura 35.A.** Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas (x 4)



**Figura 35.B.** Muestra histológica del grupo con células madre mesenquimales cultivadas (x 4)

Revisando las muestras obtenidas en este grupo, describimos los hallazgos histológicos más representativos de las mismas.

### **Muestra 3.A.**

La pieza macroscópica de la muestra 3.A. obtenida después del sacrificio no presentó una regeneración del cartílago y en muchas zonas dio una imagen de superficie articular desnuda sin ningún signo de reparación. Conviene recordar que las células no rellenaron el defecto, ni tampoco la membrana fue sellada. Como en los casos anteriores utilizamos una membrana congelada sobre la que se efectuó un cultivo de MSC. En esta pieza no observamos restos de la membrana.

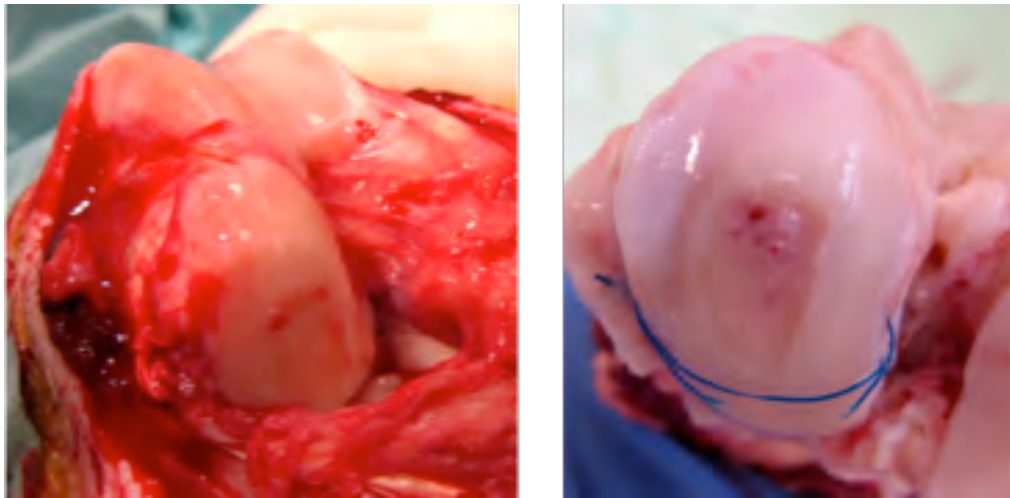


Figura 3.A. macro

Vimos una reacción de los condrocitos de las capas más profundas en toda la lesión realizada que se corroboró con la reacción de condrocitos dispuestos en clusters e incluso en algunos puntos en hileras entre las columnas trabeculares como queriendo reaccionar para reparar la lesión efectuada. Las capas superficiales, aunque en algunos puntos eran fibrosas, eran siempre acelulares.

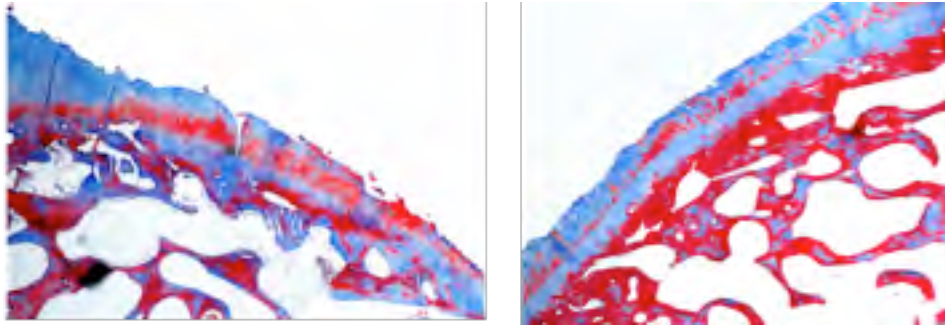


Figura 3.A. (x 2,5)

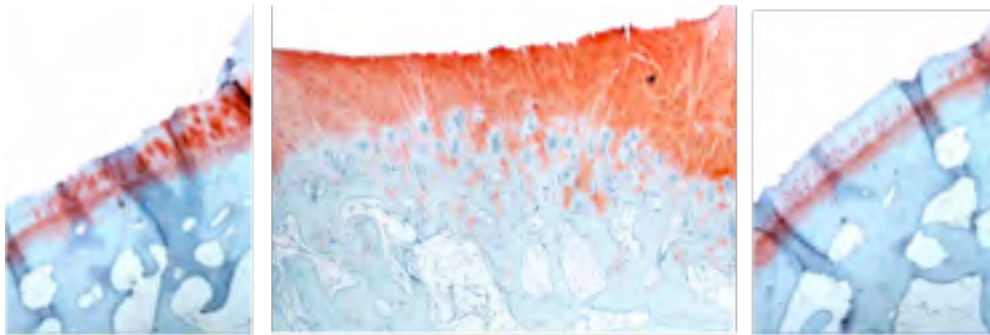


Figura 3.A. (x 2,5)

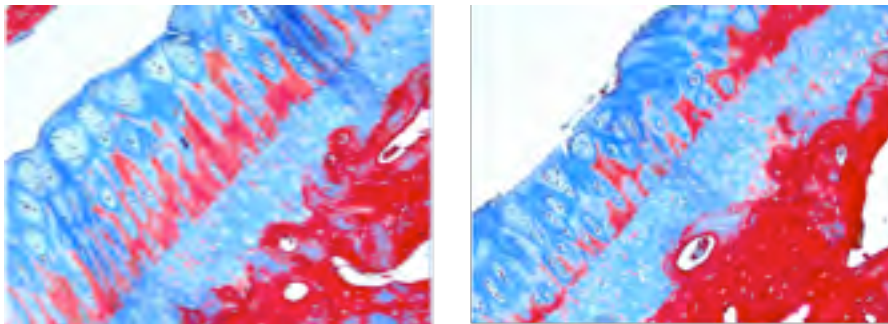


Figura 3.A. (x 10)

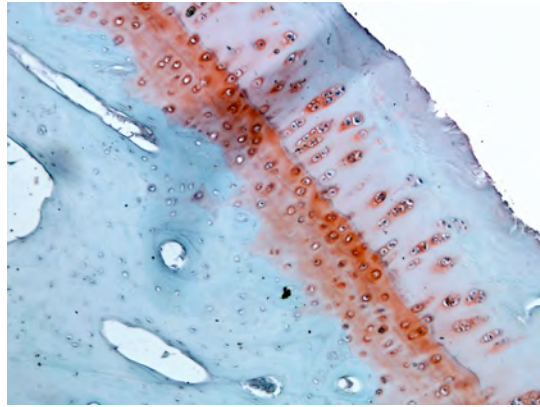


Figura 3.A. (x 10)

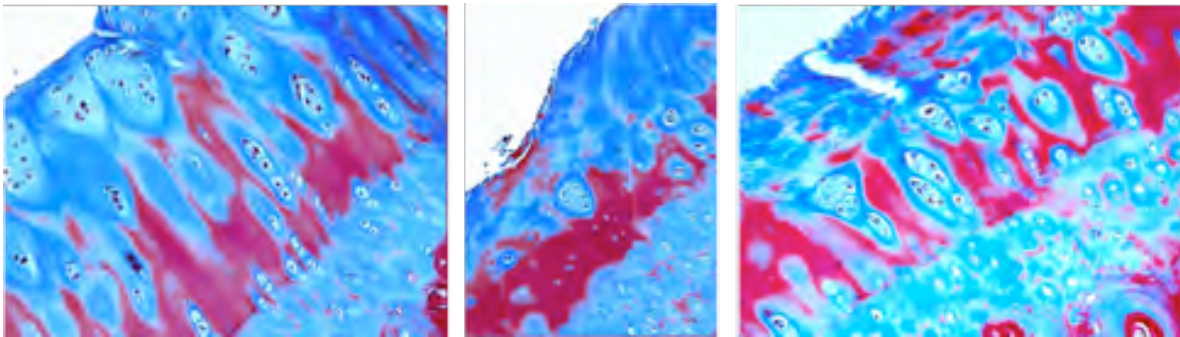


Figura 3.A. (x 20)

### Muestra 3.B.

En la muestra 3.B. tampoco observamos en la pieza macroscópica un relleno de la lesión aunque las suturas estaban intactas.

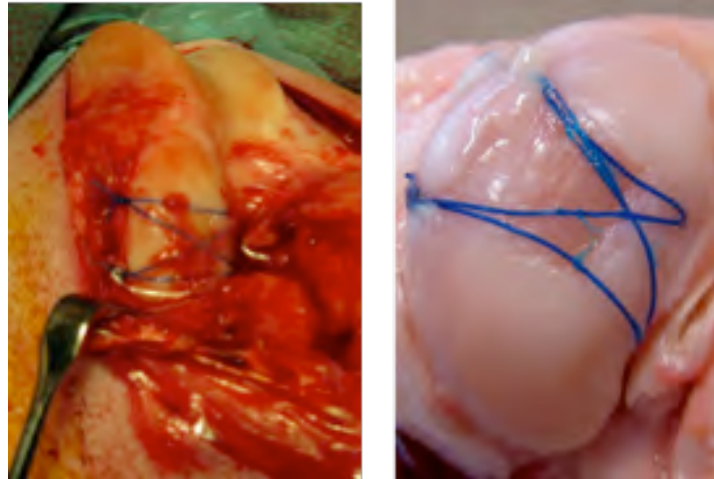


Figura 3.B. macro

Se observaron restos de la membrana no adherida a la superficie articular con células fusiformes como fibroblastos en algunas zonas y dispuestas de forma no estructural. Algunas zonas permanecían acelulares. La membrana no conservaba su estructura fibrilar. Aparecieron grupos isogénicos de condrocitos en el interior de la matriz extracelular

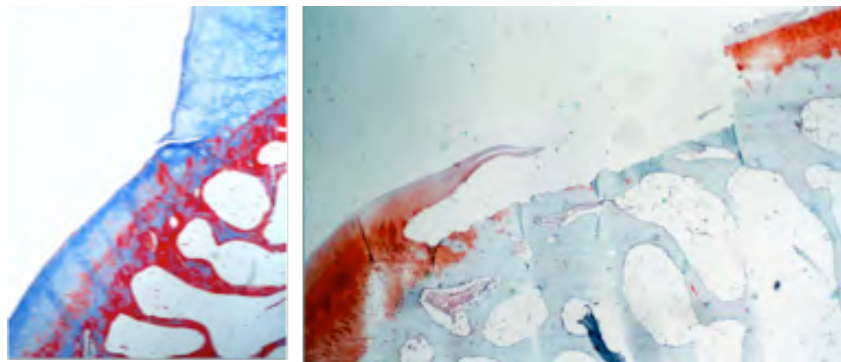


Figura 3.B. (x 2,5)

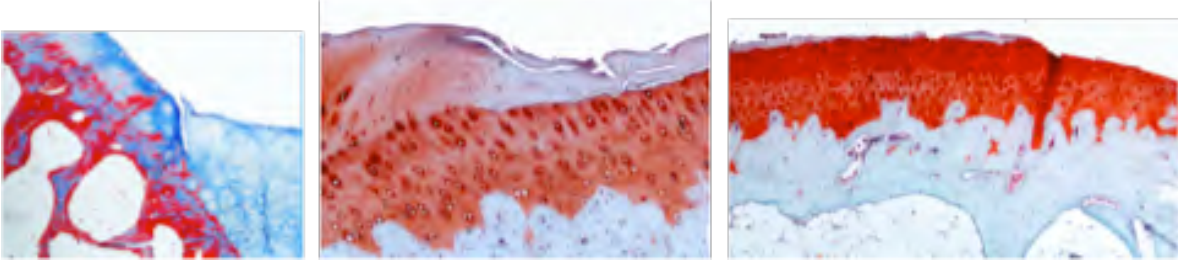


Figura 3.B. (x 4)

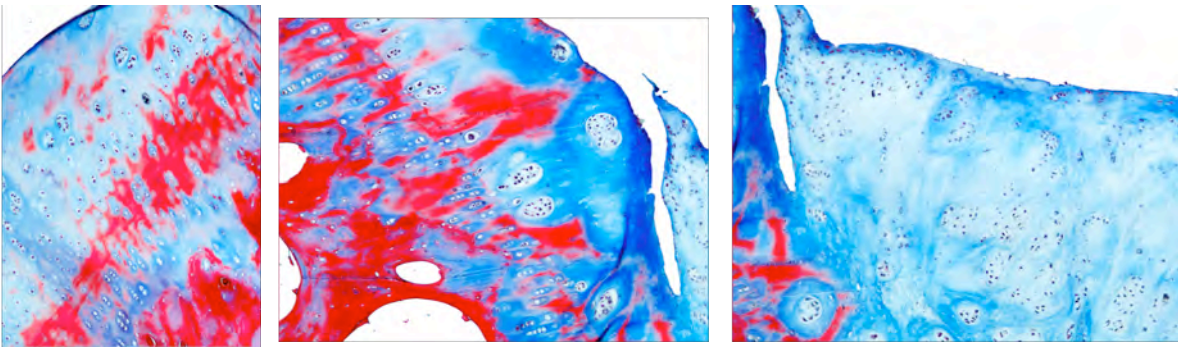


Figura 3.B. (x 10)

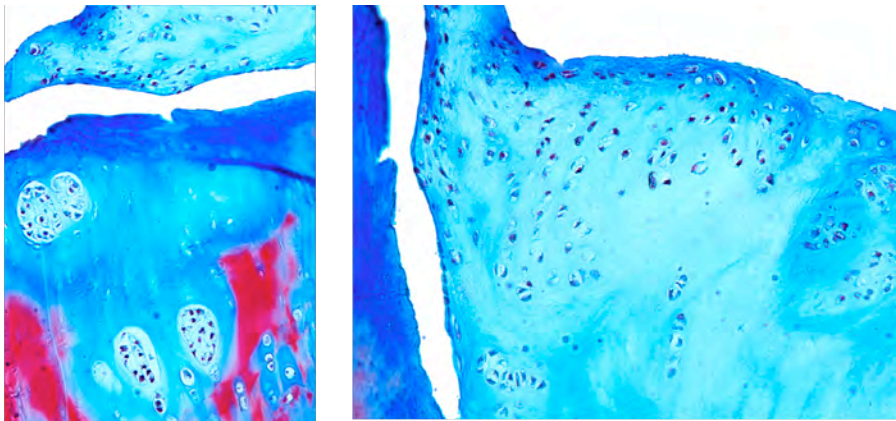


Figura 3.B. (x 20)

### Muestra 3.C.

La muestra 3.C. tenía un aspecto de estar recubierta por la membrana y, también conservaba la sutura.

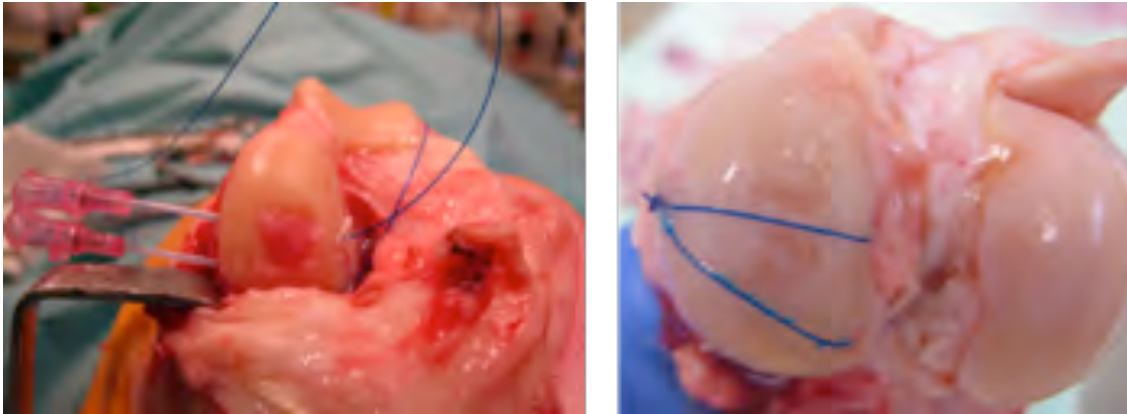


Figura 3.C. macro

En las piezas histológicas no se apreció regeneración de cartílago aunque el cartílago de la zona lesionada presentaba numerosos grupos isogénicos como un intento de reparación. En el borde de la lesión también se apreció la desestructuración del cartílago articular con numerosos grupos isogénicos y una matriz poco teñida. En la superficie de la lesión estaba separada del cartílago y al igual que la superficie del cartílago se observaron fibras paralelas con un importante relleno de células pequeñas y alargadas de estirpe fibroblástica.

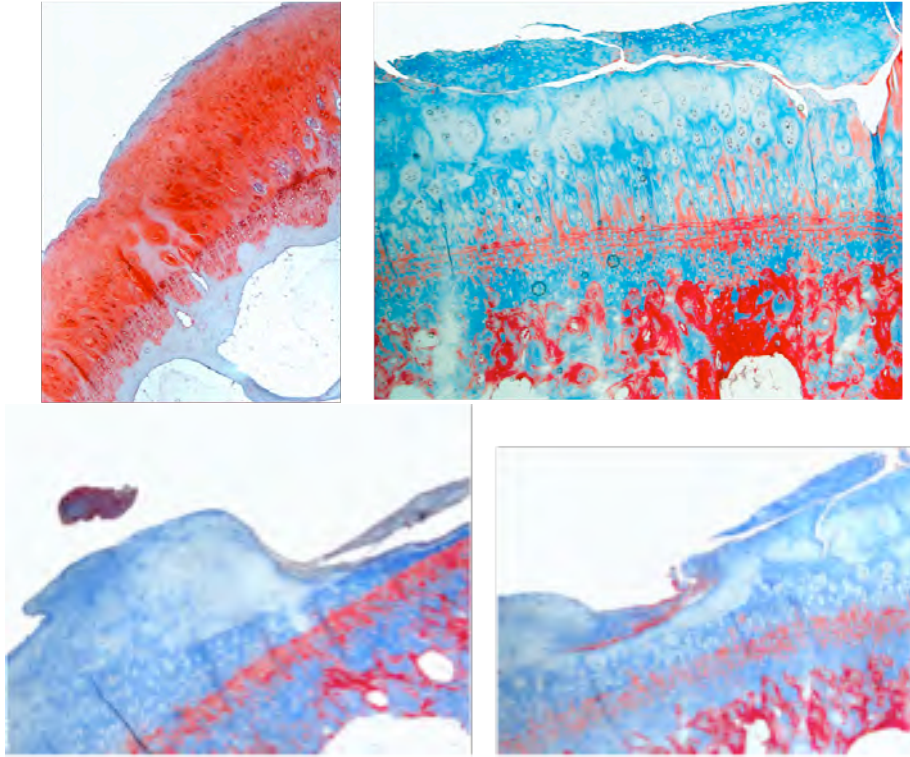
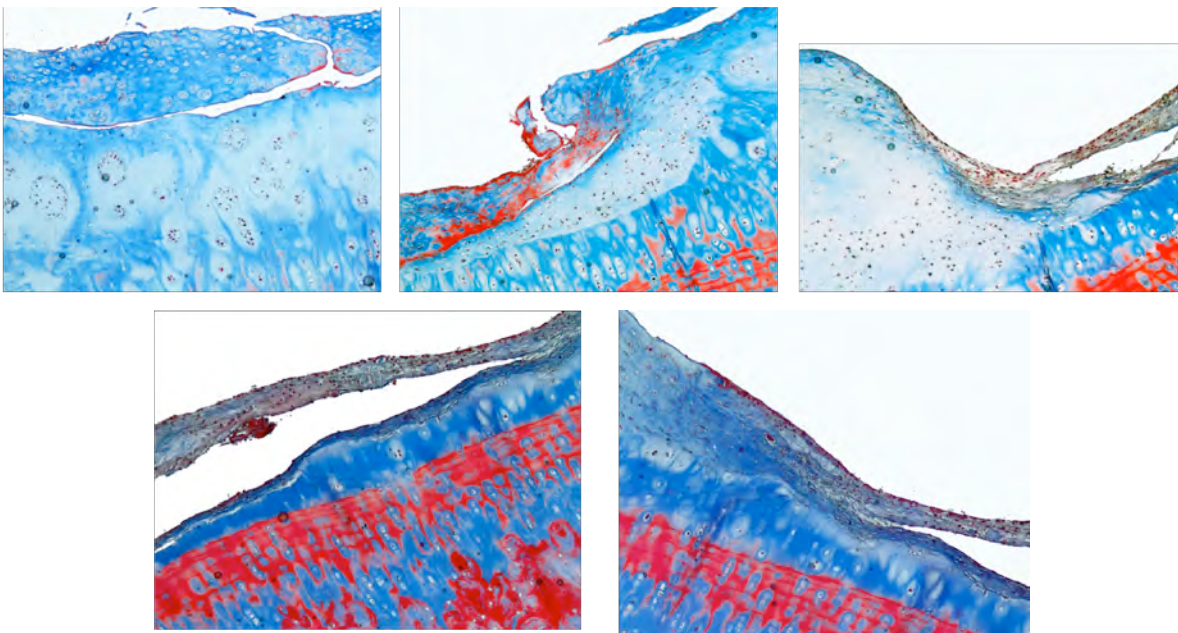


Figura 3.C. (x 4)



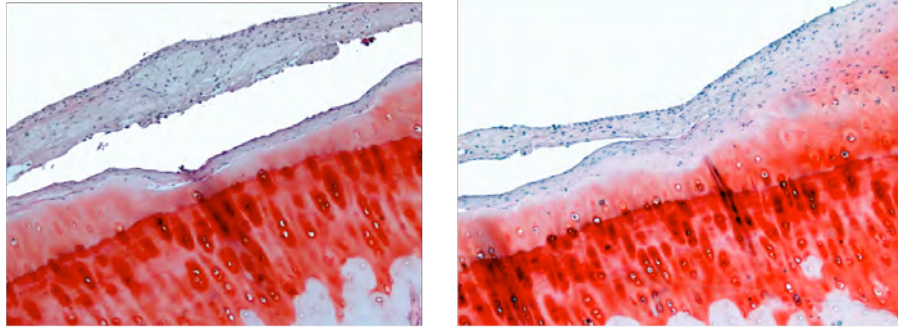


Figura 3.C. (x 10)

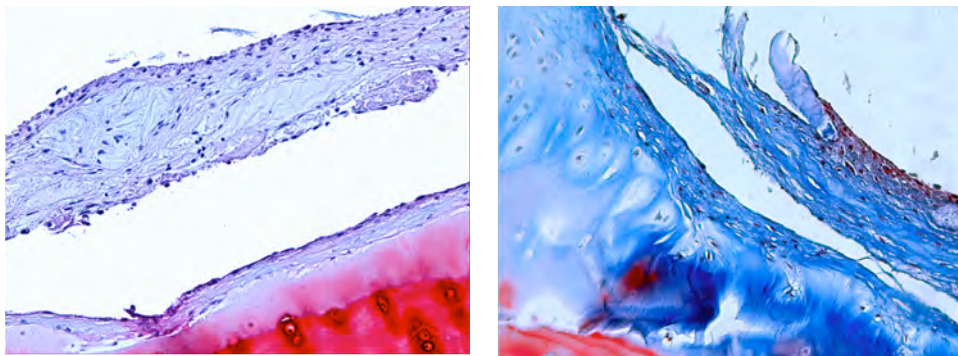


Figura 3.C. (x 20)

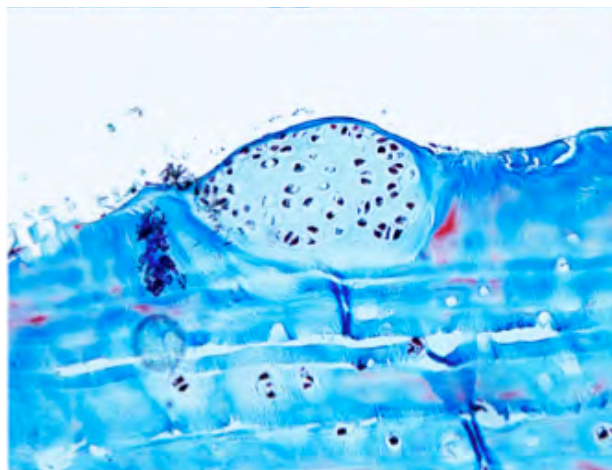
### *Grupo de membrana en fresco*

En el grupo de membrana en fresco, también encontramos la formación de clusters (figura 36).



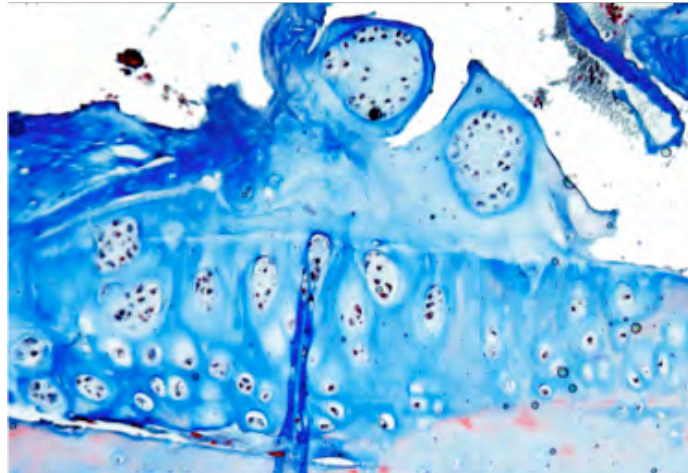
**Figura 36.** Muestra histológica del grupo con membrana en fresco (x 4)

Estas lagunas contenían células en una mayor cuantía que en el grupo de la membrana cultivada con células (figura 37).

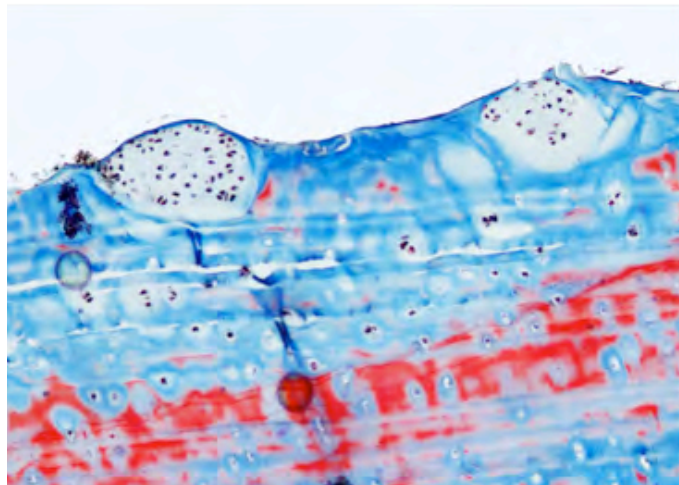


**Figura 37.** Muestra histológica del grupo con membrana en fresco (x 20)

Encontramos los clusters en las zonas más superficiales de la lesión (figura 38) con células pseudoencapsuladas, embebidas en el interior de la matriz extracelular del cartílago (figura 39).

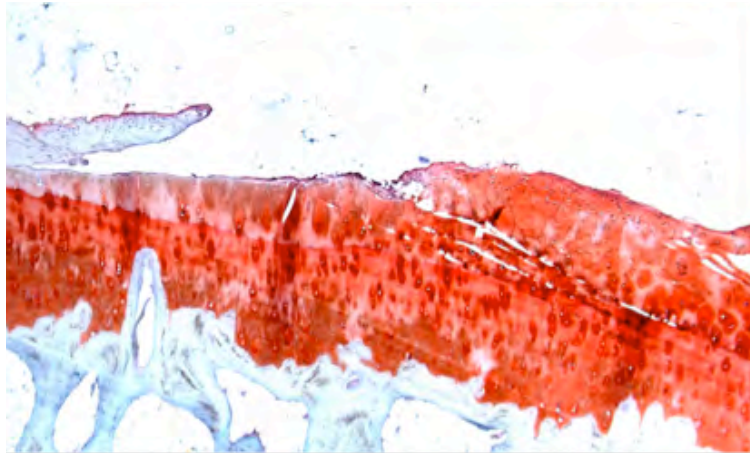


**Figura 38.** Muestra histológica del grupo con membrana en fresco (x 10)



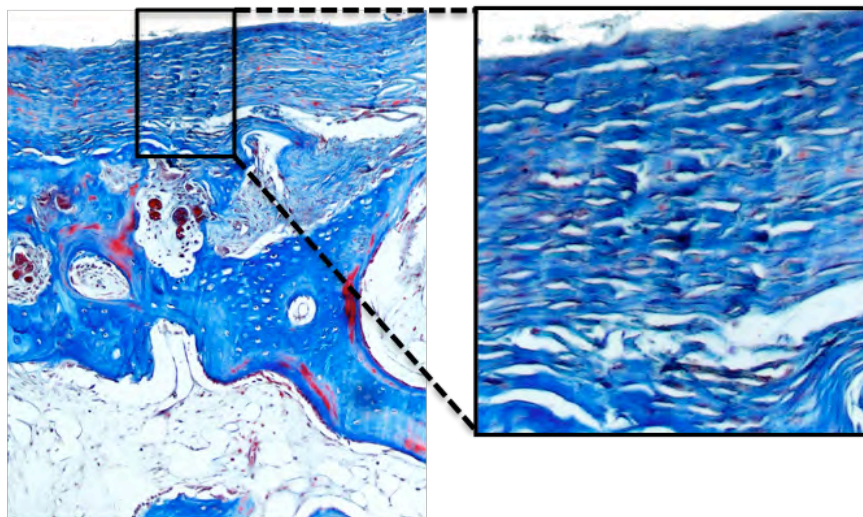
**Figura 39.** Muestra histológica del grupo con membrana en fresco (x 10)

La positividad para la tinción con Safranina, corroboró que se trataba de una respuesta reparativa con un elevado contenido en proteoglicanos (figura 40).



**Figura 40.** Muestra histológica del grupo con membrana en fresco (Safranina x 4)

La membrana sobre la lesión se mantuvo con un aspecto fibroso con células redondeadas y fusiformes en su interior y poco contenido en proteoglicanos (Figura 41).



**Figura 41.** Muestra histológica del grupo con membrana en fresco

Revisando las muestras obtenidas en este grupo, describimos los hallazgos histológicos más representativos de las mismas.

#### **Muestra 4.A.**

En la muestra 4.A. se apreció después del sacrificio, que la zona lesionada se seguía apreciando, si bien su aspecto era brillante y no se observaron lesiones añadidas.

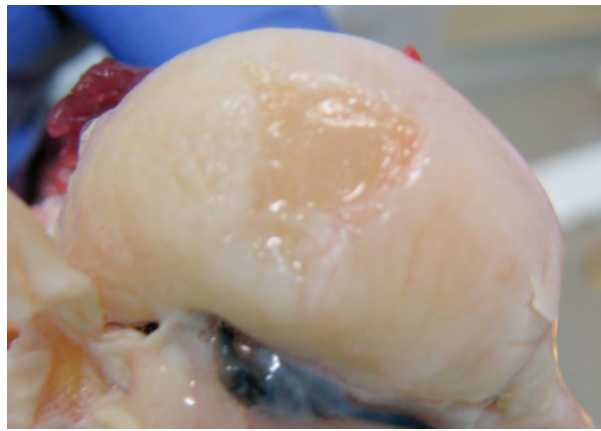


Figura 4.A. macro

En las imágenes a pocos aumentos apreciamos unas zonas deshilachadas y fragmentadas sobre la lesión efectuada.

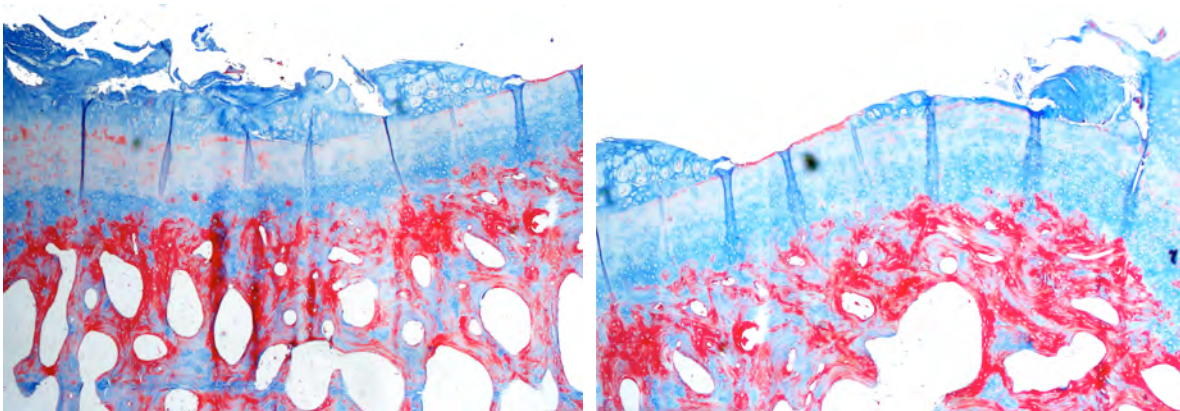


Figura 4.A. (x 2,5)

A mayores aumentos (x4), dejaron ver la formación de grupos isogénicos celulares.

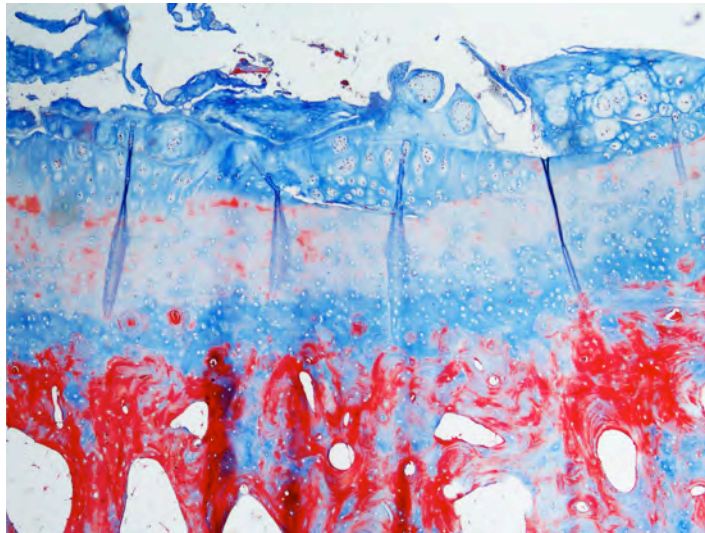


Figura 4.A. (x 4)

En las preparaciones de mayor aumento (x10) se observó, por una parte, la membrana fibrosa que cubre algunas zonas de la lesión condral realizada (A) y por otra la formación de grupos celulares isogénicos en las zonas del cartílago remanente, aquél que no se eliminó durante la intervención quirúrgica (B).

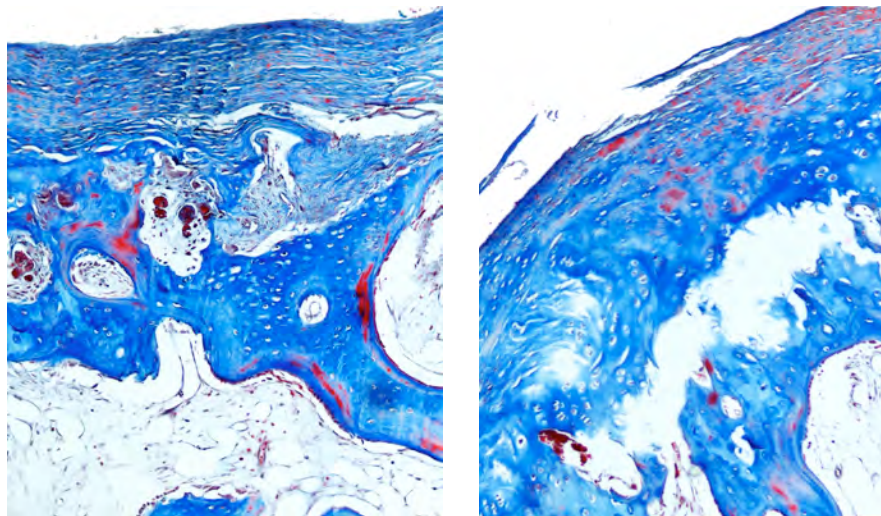


Figura 4.A. (x 10) - A

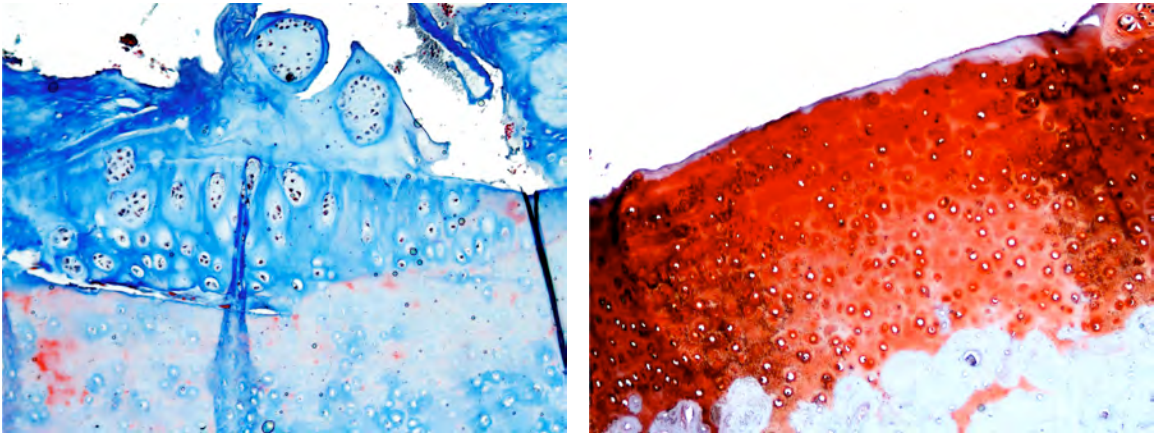


Figura 4.A. (x 10) - B

En las preparaciones con mayor aumento (x20) se apreciaron los grupos celulares encapsulados en el interior de la matriz extracelular del cartílago. En las zonas donde se aprecia la membrana sobre la lesión condral no observamos formación de nuevo cartílago.

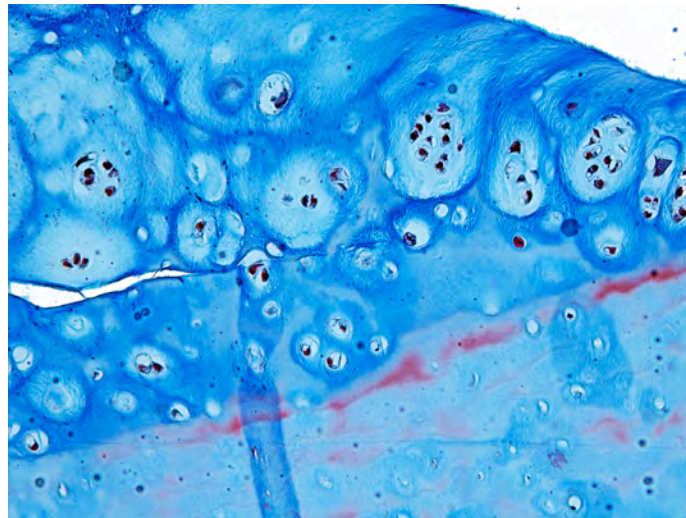


Figura 4.A. (x 20)

#### **Muestra 4.B.**

En la muestra 1879 se repitieron los hechos observados en otras muestra del grupo. En la pieza macroscópica no se observó la formación de cartílago aunque la membrana recubría y rellenaba la lesión realizada en el momento de la cirugía.

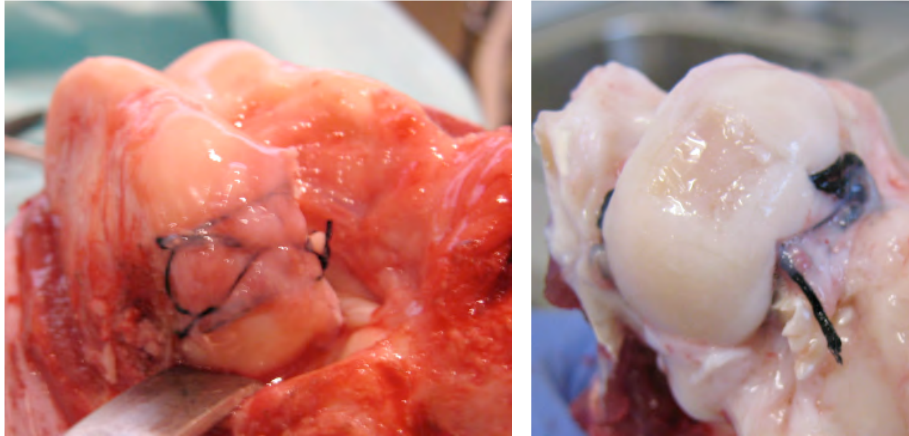


Figura 4.B. macro

En las preparaciones histológicas se observó la formación de grupos celulares encapsulados muy próximos a la superficie articular sin ver regeneración cartilaginosa.

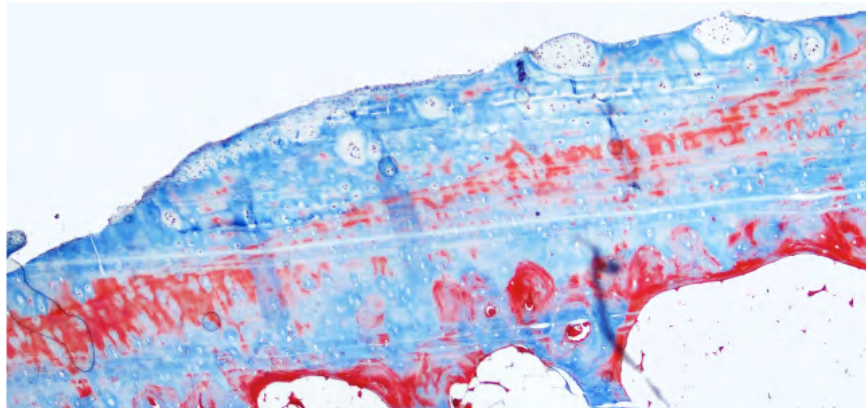


Figura 4.B. (x 4)

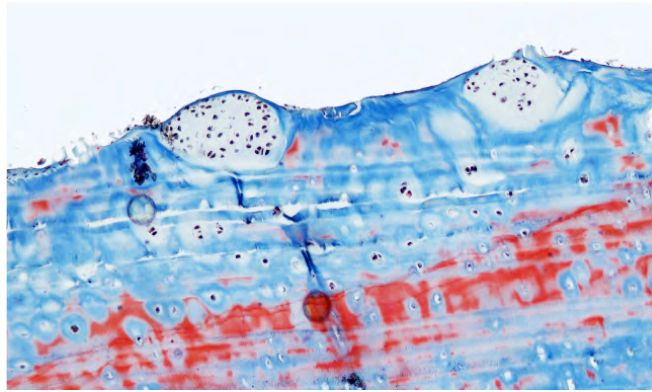


Figura 4.B. (x 10)

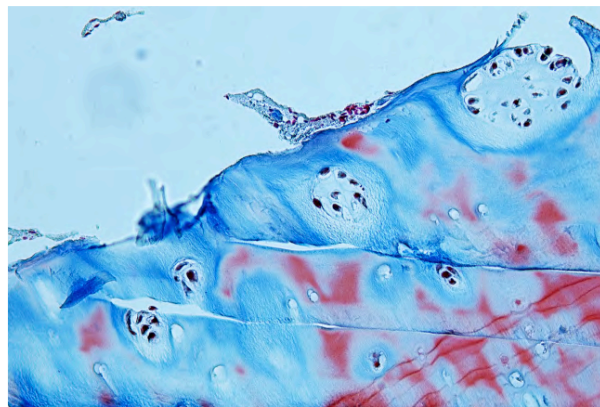
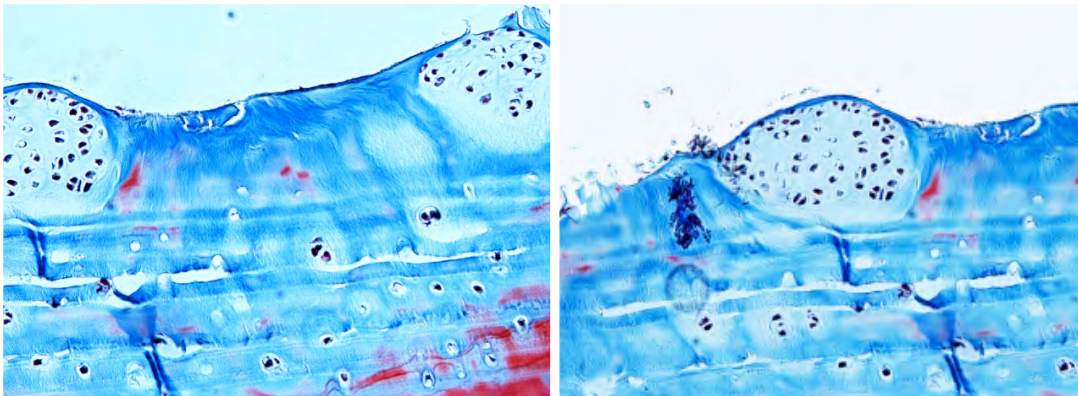


Figura 4.B. (x 20)

En las muestras de safranina presentaron una tinción intensa las zonas del cartílago que quedaban por debajo de la lesión creada o de las capas más profundas con un intento de reparación del cartílago remanente, con importantes clusters de condrocitos intentando reparar la lesión. Los restos de la membrana no muestran señales de metaplasia ni de características condrales, permanece fibrosa, con células redondeadas en su interior y poca tinción con la safranina demostrando su poco contenido en proteoglicanos.

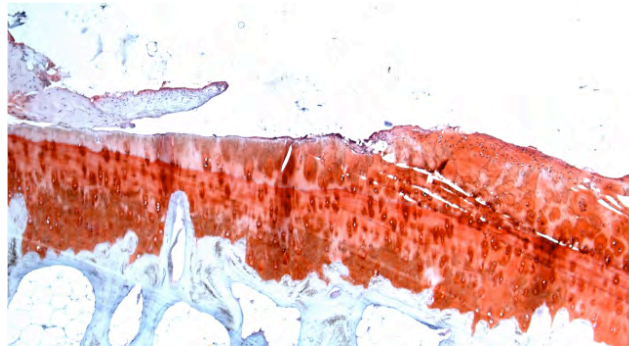
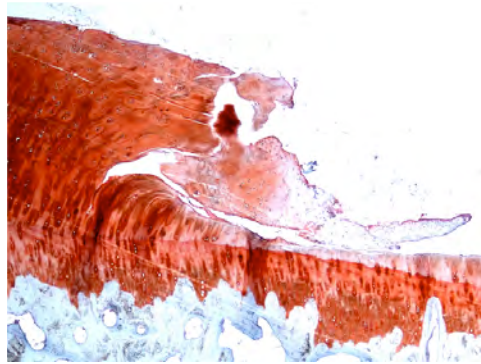


Figura 4.B. (safranina x4)

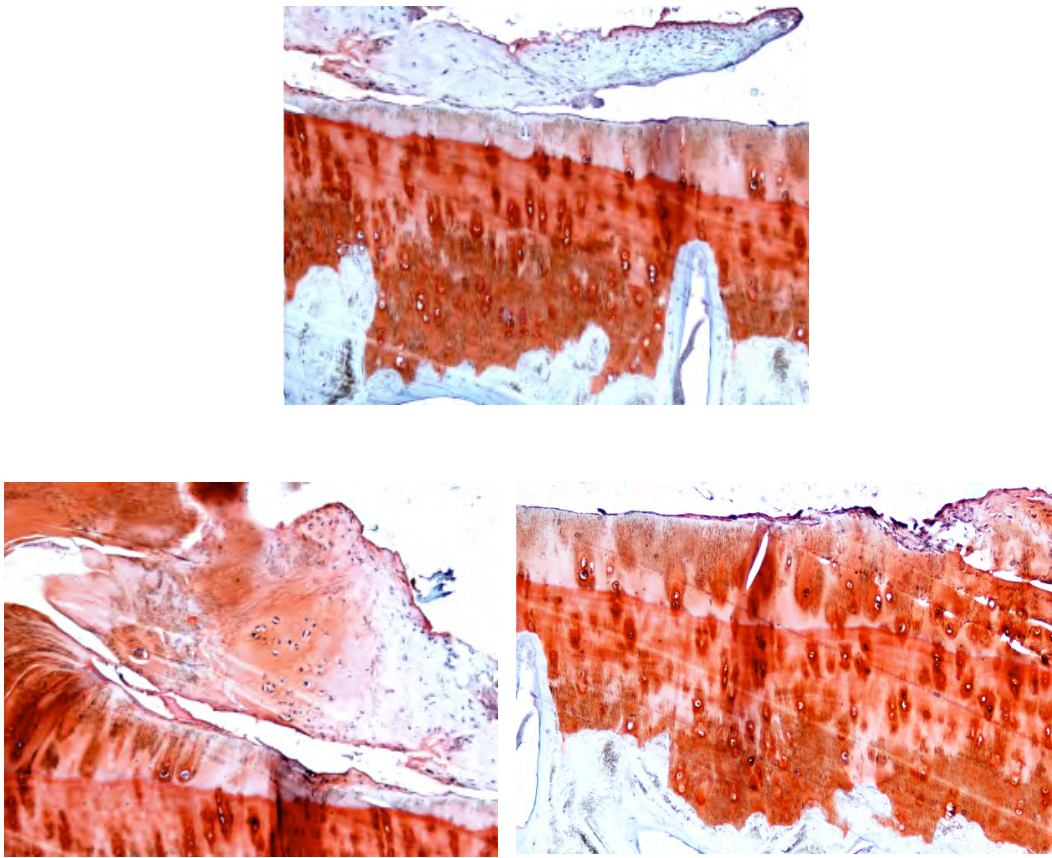


Figura 4.B. (safranina x10)

#### ***Resumen de los hallazgos histológicos.***

En el grupo control no se observó ningún intento de reparación del cartílago intralesional. La membrana se logró integrar de forma exitosa con los bordes de la lesión en algunas de las muestras analizadas. Cuando se aplicaron bien la membrana en fresco, bien la membrana con células se observó una proliferación celular abundante con la formación de grupos isogénicos celulares que no se observaron en los restantes grupos. La tinción con Safranina reflejó un mayor contenido de proteoglicanos intralesional en las muestras procedentes de la aplicación de la membrana amniótica en fresco.

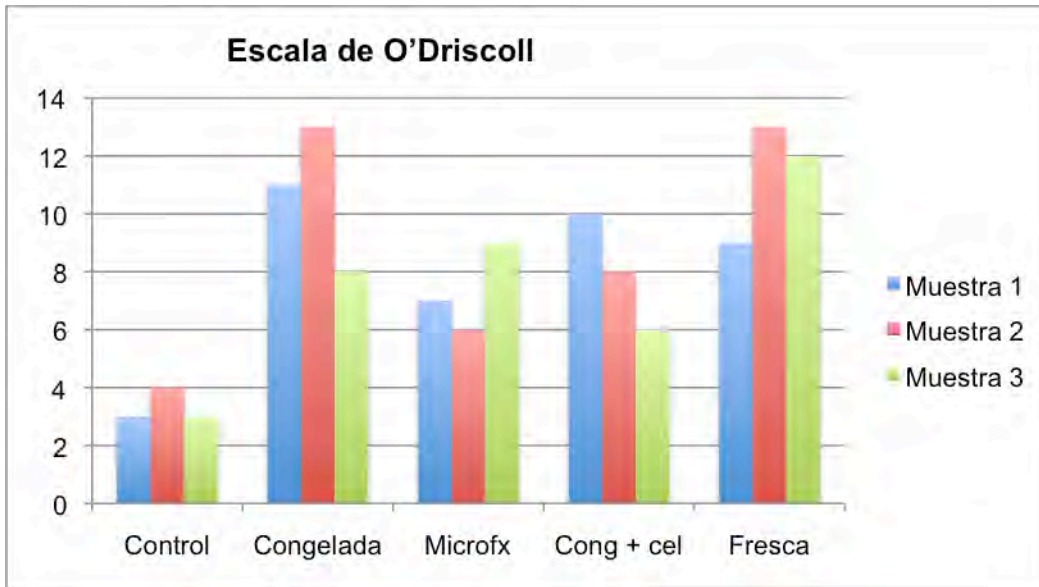
## ESCALA DE O'DRISCOLL

Los resultados obtenidos en las diferentes muestras de los distintos grupos al aplicar la escala de O'Driscoll fueron los siguientes (tabla 2):

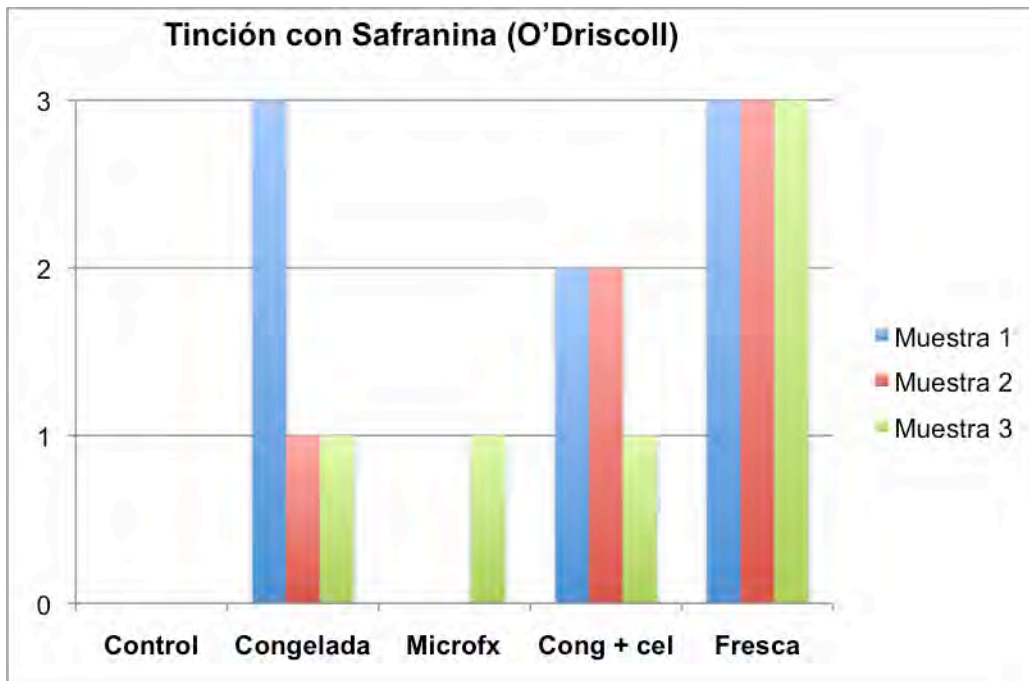
	1.A	1.B	1.C	2.A	2.B	2.C	3.A	3.B	3.C	4.A	4.B	4.C	5.A	5.B	5.C
<b>Morfología celular</b>	0	1	0	0	2	1	0	0	0	2	2	1	0	2	1
<b>Tinción con Safranina</b>	0	0	0	3	1	1	0	0	1	2	2	1	3	3	3
<b>Regularidad de la superficie</b>	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
<b>Integridad estructural</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>Grosor</b>	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<b>Unión con cartílago adyacente</b>	0	0	0	2	2	2	2	1	1	1	0	0	1	1	1
<b>Hipocelularidad</b>	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2
<b>Clusters celulares</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	1	0	0	0
<b>Cambios degenerativos en el cartílago adyacente</b>	0	0	0	1	2	1	3	3	3	2	1	1	3	3	3
<b>TOTAL</b>	3	4	3	11	13	8	7	6	9	10	8	6	9	13	12
<b>MEDIA GRUPO</b>	3,33			10,66			7,33			8			11,33		

**Tabla 2.** Resultados de la escala de O'Driscoll en las distintas muestras.

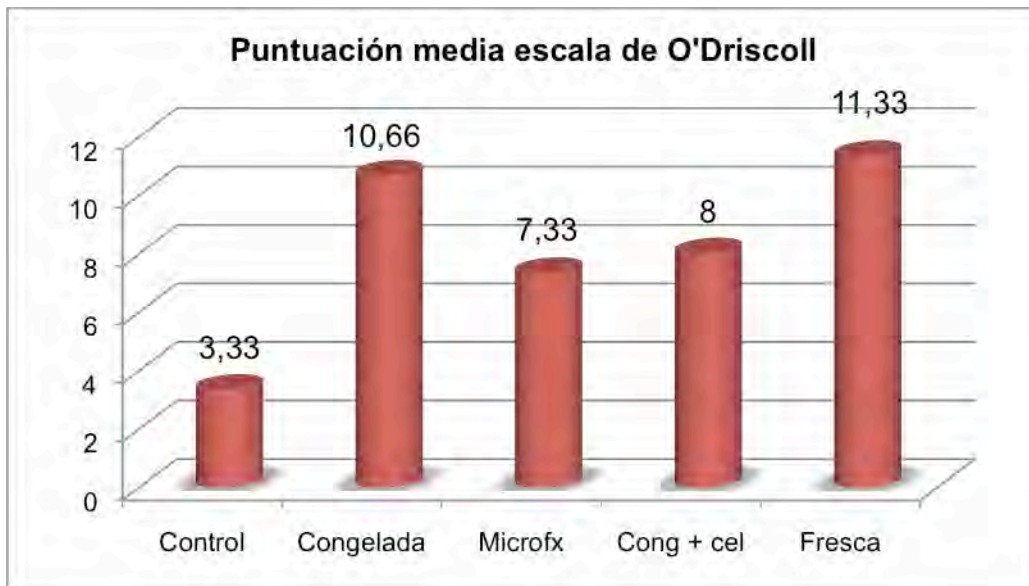
De forma gráfica, quedaría representada de la siguiente manera (tablas 3, 4 y 5):



**Tabla 3.** Representación gráfica de los resultados de la escala de O'Driscoll en las distintas muestras.



**Tabla 4.** Resultados de la escala de O'Driscoll (tinción con safranina) en las distintas muestras.



**Tabla 5.** Puntuación media de los resultados de la escala de O'Driscoll en las distintas muestras.

## **5. DISCUSIÓN**

## OBJETIVO DEL TRATAMIENTO DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO HIALINO

Se han propuesto dos metas a la hora de tratar una lesión cartilaginosa articular. En primer lugar el conseguir paliar el dolor y restablecer la función articular y en segundo lugar, prevenir o al menos retrasar el desarrollo de artrosis. Esto último, desde un punto de vista práctico, sería el retrasar la necesidad de una sustitución protésica de la articulación durante un periodo de tiempo clínicamente significativo sobre todo en pacientes jóvenes. Para poder conseguir esto, se ha establecido como objetivo del tratamiento quirúrgico de una lesión condral, el crear un tejido de reparación con características bioquímicas, estructurales y funcionales equivalentes a las del cartílago hialino natural. La calidad histológica del cartílago formado es considerado como uno de los factores más importantes para considerar exitoso el tratamiento de una lesión (89).

A pesar de que exista cierto consenso a la hora de establecer el objetivo del tratamiento de estas lesiones, no conocemos estudios que relacionen de forma clara la disminución de los síntomas y la producción de cartílago hialino. Estudios histológicos que correlacionen que la calidad del tejido neoformado es proporcional a la disminución de dolor y al restablecimiento de la función articular. Pudiera ocurrir que si realmente analizamos la histología de la lesión de esos pacientes cuyo resultado clínico es considerado bueno, no lo sea igualmente desde el punto de vista de la anatomía microscópica.

Hasta el momento, aunque el trasplante autólogo de condrocitos muestra una mejor histología con una mayor formación de cartílago similar al tipo hialino, ninguna modalidad de tratamiento existente ha demostrado conseguir una reparación histológica

ideal que reproduzca las complejas características del cartílago hialino articular con unos resultados clínicos a largo plazo óptimos (55).

Con el incremento en el número de estudios de regeneración condral basados en la reparación *in vivo* y en la ingeniería tisular en las últimas décadas, el número de sistemas o escalas de valoración histológica ha aumentado de forma paralela, en parte debido a las desventajas de los sistemas anteriores (89). No está claro, ni existe ningún consenso, acerca de cual es el mejor método o la mejor escala de valoración del resultado histológico. Nosotros hemos usado para la valoración de nuestros resultados, una descripción minuciosa de los fenómenos histológicos observados y la escala de O'Driscoll (87, 88) una escala validada y de un amplio uso en la bibliografía. En nuestra opinión, a pesar de su extendida aplicación en el estudio de lesiones condrales, pensamos sin embargo que puede presentar algunas limitaciones en cuanto a su uso en ingeniería tisular donde la valoración debe centrarse no tanto en el grado en la que el defecto cartilaginoso es reparado sino en las características o propiedades del tejido neoformado. Muchos estudios experimentales inicialmente tienen como objetivo el buscar nuevas fuentes celulares, soportes estructurales o factores de crecimiento para posteriormente poder diseñar uno posterior, capaz de conseguir la reparación del defecto. Es en estos estudios, entre los que incluimos el nuestro, para los que no hemos encontrado una escala que permita una valoración de óptima de los resultados.

## DISEÑO DEL ESTUDIO

En base a lo anteriormente expuesto, con el objetivo de analizar histológicamente el tipo de tejido de reparación creado, desarrollamos un estudio experimental basado en grupos. Utilizamos a la oveja como animal experimental debido a la alta similitud anatómica entre su rodilla y la del humano. Tiene como limitación el que es un cuadrúpedo, y eso hace que la biomecánica de la articulación sea diferente. Usamos ovejas esqueléticamente maduras porque pensamos que puede ser más comparable con la población de pacientes que habitualmente requiere tratamiento y porque se ha observado un potencial mucho mayor de reparación espontánea de lesiones cartilaginosas en animales adolescentes (90). Se considera adulta cuando supera la edad de 2-3 años. Se utilizaron un número de 15, distribuidas 3 en cada uno de los 5 grupos formados. Somos conscientes de que la muestra es pequeña, con las limitaciones que ello supone a la hora de interpretar unos resultados, pero creemos suficiente puesto que se trata de un estudio preliminar inicial en un campo en el que todavía no hay desarrollados estudios previos. El objetivo de nuestro trabajo es poder observar y analizar el tipo de reacción tisular producida en las distintas circunstancias en las que se implantó la membrana amniótica y en base a esto, poder desarrollar posteriormente, con la que consideremos metodología óptima de aplicación, un estudio con una mayor muestra que nos pueda generar unas diferencias estadísticamente significativa.

Usamos como zona anatómica, el cóndilo femoral lateral que es una zona de carga articular. Creemos que esto puede ser otra limitación en nuestro estudio puesto que aunque ésta es una zona donde frecuentemente asientan las lesiones cartilaginosas en el hombre, no es posible simular las condiciones postoperatorias

ideales observadas previamente (88) que consisten en mantener la articulación en descarga y con un movimiento pasivo continuado. Al animal se le permitió la carga inmediata de la articulación según la tolerancia a la misma lo que supone una dificultad para el mantenimiento de las suturas, cosa que pudimos observar en el momento de realizar las necropsias donde no siempre se conservaron las mismas. Esto podría haber condicionado un menor contacto entre el tejido aplicado y la lesión producida en aquellos casos en los que se produjo una rotura precoz de las suturas. Por otro lado, la carga continua también supone una dificultad para la integración del tejido neoformado. La mayoría de los autores (1) recomiendan proteger el proceso de reparación las primeras 6 semanas hasta poder conseguir una incorporación biológica del tejido de reparación, pero esto es difícil de conseguir en estudios animales. Una manera de evitarlo podría ser el aplicar la lesión en una zona de descarga como la tróclea, pero esto produce un tejido de reparación que es de calidad inferior a la obtenida cuando la lesión se produce en una de carga como son los cóndilos femorales (91), por lo que podría alterar o infravalorar los resultados obtenidos. No hemos encontrado en la literatura un protocolo de experimentación animal que sea universalmente aceptado para el desarrollo de estudios de regeneración condral.

La técnica usada en nuestro estudio para la fijación de la membrana amniótica, puede ser que aporte otra limitación. Es difícil buscar un método que permita el contacto durante tiempo suficiente de la membrana con la lesión, sin que su aplicación altere al tejido sano circundante o altere el diseño del estudio si alcanzamos al hueso subcondral. La sutura de cualquier membrana o tejido a la zona articular sana adyacente es un procedimiento técnicamente demandante. La membrana amniótica es una estructura fina en cuanto a su grosor y ello puede llevar a limitaciones técnicas en cuanto a su sutura, aunque algunos autores la han aplicado de dicha manera con éxito

(92). Se ha observado además que el proceso de suturar el tejido en el cartílago articular, puede inducir un daño focal en el lugar de las suturas (1). Algunos autores han constatado que estos efectos pueden progresar hacia la producción de unos cambios similares a los osteoartrosicos (93). Sin embargo es el método utilizado para una técnica tan habitual como el ACI (56) aunque en los últimos años se tiende al uso de algún “pegamento” biológico en lugar de una sutura para su fijación como puede ser el uso de fibrina o ácido hialurónico para evitar morbilidad en el tejido sano (94). Una alternativa pudiera haber sido el aposicionar la membrana amniótica a la lesión simplemente, sin necesidad de suturarla o de recubrirla con otro tejido, debido a la buena adhesividad que presenta (67), aunque pensamos que por otro lado hubiera precisado de una mayor protección del estrés mecánico hacia el injerto producido por la carga o el movimiento de la rodilla del animal. No sabemos realmente cual es la mejor disposición para su uso en ingeniería tisular aplicada al cartílago, ni tampoco cuanto de nuestros resultados se deben a la técnica quirúrgica usada. Quizás hubiéramos obtenido mejores resultados si hubiésemos utilizado otra forma de aplicarla al defecto. Creemos que son necesarios más estudios al respecto para poder dilucidar cual es la técnica más apropiada.

A la hora de la elección de los diferentes grupos, en uno de ellos aplicamos la membrana amniótica congelada, que es el procedimiento actualmente más extendido en el campo de la oftalmología. Con dicha aplicación no pudimos observar ninguna respuesta tisular en el fondo de la lesión, pero si se observó en los bordes de la misma la reacción característica del intento de reparación del cartílago con desestructuración de la matriz extracelular y formación de grupos isogénicos de condrocitos. En otro grupo usamos el método actualmente más difundido, utilizado y coste-efectivo, en cuanto a reparación condral se refiere en el campo de la cirugía ortopédica, la microfracturas (61) (95). Posteriormente se tapizó con la membrana amniótica congelada en un intento de

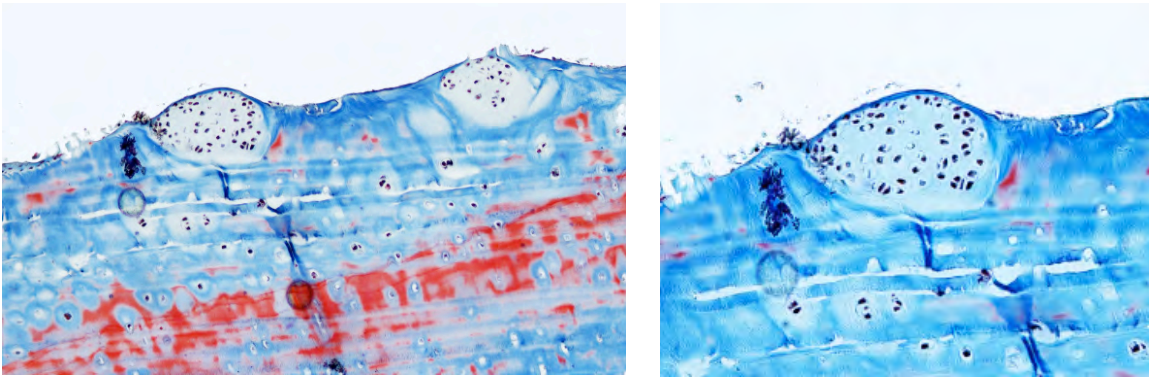
retener y albergar a las células pluripotenciales derivadas de la médula ósea subyacente. En este grupo no pudimos constatar la formación de un fibrocartílago como otros autores han observado (91) al realizar las microfracturas, si bien no realizamos la técnica según ha sido descrita previamente (96) y no eliminamos la capa calcificada en su totalidad para no alcanzar al hueso subcondral y con ello evitar la llegada de células de la MO subyacente. Estos autores recomiendan su retirada completa, ya que consideran que el cartílago residual constituye un barrera para la integración y el recubrimiento del tejido de reparación que se forma. En nuestro estudio observamos en este grupo, que los orificios de las microfracturas no presentaban regeneración de cartílago, se encontraban rellenos por un tejido fibroso, sin teñir con safranina, y se apreciaron zonas con vasos y células hemáticas. También se observaron un mayor número de células de estirpe fibroblástica respecto a lo observado en otras muestras de diferentes grupos tanto en el interior de la lesión como en el espesor de la MA. El motivo de esta modificación técnica fue el no variar las características del tipo de lesión de cartílago originada respecto a la producida en los otros grupos y además el no pasar de una lesión de espesor parcial a una de espesor completo con lo que ello implica. Desconocemos cuál hubiese sido el efecto producido con la eliminación de la capa calcificada en su totalidad sobre los restantes grupos del estudio, pudiendo obtener quizás, al igual que ocurre con las microfracturas, mejores resultados con el uso de la MA sobre lesiones que carecen de la capa calcificada. En cuarto lugar utilizamos la MA congelada previo cultivo con CMM procedentes de MO. Con ello pretendíamos utilizar fundamentalmente a la MA como transportador y a su vez nos permitía comparar los resultados de la aplicación de esta fuente de células pluripotenciales con las procedentes de la MA al usarla en fresco (grupo 5).

## MEMBRANA AMNIÓTICA COMO FUENTE CELULAR

Tanto las células madre mesenquimales amnióticas derivadas del epitelio como las derivadas del estroma, han demostrado *in vitro* la capacidad de diferenciación hacia estirpes celulares de las tres líneas germinales, entre ellas hacia condrocitos (73). *In vitro*, Wei y cols. (97) consiguieron una diferenciación condrogénica de las células amnióticas mesenquimales estromales mediante la suplementación con BMP-2. Posteriormente, *in vivo*, aplicaron estas mismas células indiferenciadas, transportadas sobre una matriz de colágeno tipo I en gel, en defectos condrales de ratas, y observaron a los 2 meses que sufrieron los cambios morfológicos celulares característicos junto con el depósito de colágeno tipo II, indicando su diferenciación a condrocitos. También observaron que las células amnióticas expresan genes relacionados con la diferenciación, estimulación y metabolismos de los condrocitos como son SOX-9, SOX-5, SOX-6, BMP-2, BMP-4 y los receptores de BMP. Estos estudios muestran que las células madres procedentes de la membrana amniótica tienen la capacidad de diferenciarse hacia condrocitos tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo el posible uso para el tratamiento de las lesiones condrales.

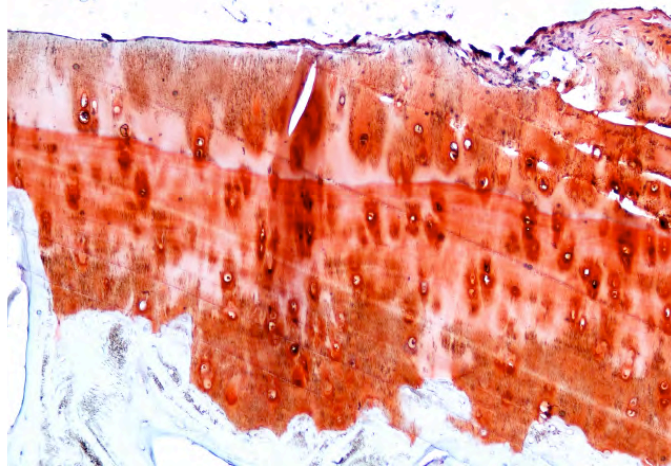
En nuestro trabajo, observamos que cuando se trasplantó la membrana amniótica en fresco, la cual contiene células viables en su interior, se produjo la formación de unos clusters celulares en el interior de la lesión que identificamos como una respuesta reparativa. Es cierto que la formación de clusters de condrocitos es un rasgo típico del cartílago artrósico y es un signo de incremento de la actividad mitótica que para algunos autores (87, 88) y en determinadas escalas, entre las que se encuentra la que nosotros hemos aplicado en nuestro estudio, es valorado de forma negativa. Otros autores sin embargo (98), con los que nos sentimos más identificados, interpretan esta agrupación

celular como un tejido de reparación recién organizado y no como un fenómeno degenerativo. Creemos que ésta puede ser una de las razones por la cual no hemos observado grandes diferencias entre grupos en la valoración de los resultados con la escala de O'Driscoll. Analizando el tejido intralesional, apreciamos la proliferación de un grupo isogénico de células (figura 42) en el interior del defecto cartilaginoso.



**Figura 42.** Muestra histológica donde se observa la aparición de clusters celulares en el interior de la lesión cartilaginosa en el grupo de la membrana amniótica en fresco.

Estas células muestran una morfología redondeada con características de condrocitos y se encontraban en el interior de la matriz extracelular cartilaginosa, rodeadas de una gran cantidad de proteoglicanos como mostró la intensa tinción con safranina (figura 43) lo que hace suponer una gran actividad formadora de cartílago.



**Figura 43.** Intensa tinción de las muestras histológicas en el grupo de la membrana amniótica en fresco.

El contenido en proteoglicanos del tejido neoforado es considerado como uno de los hallazgos más importantes a la hora de catalogar un tejido como cartilaginoso (89) y así es valorado en muchas escalas (99-101). Desglosando los resultados de la escala de O'Driscoll observamos que en lo referente a la tinción con Safranina, el grupo de la membrana fresca obtuvo la puntuación mayor. Esta respuesta celular no fue observada cuando se trasplantó la membrana sin células en su interior (membrana congelada solamente). Esto sugiere que pudiera producirse una respuesta proliferativa con diferenciación hacia condrocitos por parte de las células trasplantadas. La proliferación fue menor en el grupo en el cual se usó la membrana previamente cultivada con células madres mesenquimales procedentes de la médula ósea que cuando se usaron las células de la membrana amniótica (uso en fresco). Los grupos celulares fueron más pequeños y con menos cantidad de células en su interior. Ello puede traducir una menor capacidad de proliferación y diferenciación celular, sugiriendo que las células madre de la membrana amniótica tienen una mayor capacidad proliferativa y de diferenciación hacia condrocitos. No obstante serían necesarios más estudios *"in vitro"* para poder

afirmar esto.

La respuesta tisular regenerativa observada en la lesión mediante la formación de grupos proliferativos celulares no fue suficiente para poder reparar la lesión. Creemos que es necesario mejorar las condiciones y la técnica del trasplante para poder obtener mejores resultados. Normalmente cuando se usan las CMM como fuente celular en ingeniería genética se requiere una gran expansión celular *in vitro* previa, induciendo el crecimiento de las mismas de forma artificial. Pensamos que la expansión previa de las células madre de la MA estimulando la proliferación celular *in vitro* podría aportar un mayor número de células, multiplicado la capacidad de acción y ser suficientes para conseguir la regeneración del tejido. En el grupo en el cual se aplicó la MA previamente cultivada con CMM se observó un mayor número de grupos celulares, lo cual pudiera haber sido debido al trasplante de una mayor densidad de células.

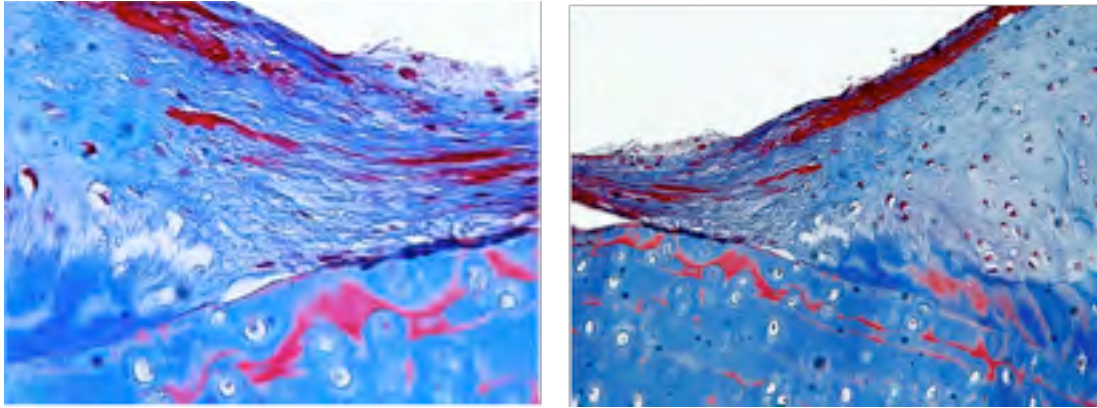
## **MEMBRANA AMNIÓTICA COMO MATRIZ TRIDIMENSIONAL**

Como ya hemos comentado previamente en nuestro trabajo, es necesario mejorar los protocolos de condrogénesis *in vitro* para poder conseguir la formación de un cartílago articular estable en ausencia de hipertrofia. Existen estudios (102, 103) que demuestran que el estrés mecánico influye fuertemente en el mantenimiento del cartílago hialino y que la compresión mecánica cíclica estimula la expresión de marcadores condrogénicos en células progenitoras mesenquimales diferenciadas *in vitro*, resultando en un incremento en la formación de matriz cartilaginosa. Esto hace que hay que considerar este factor mecánico a la hora de desarrollar estudios basados en CMM para intentar conseguir la formación de una cartílago estable. Sin embargo nos

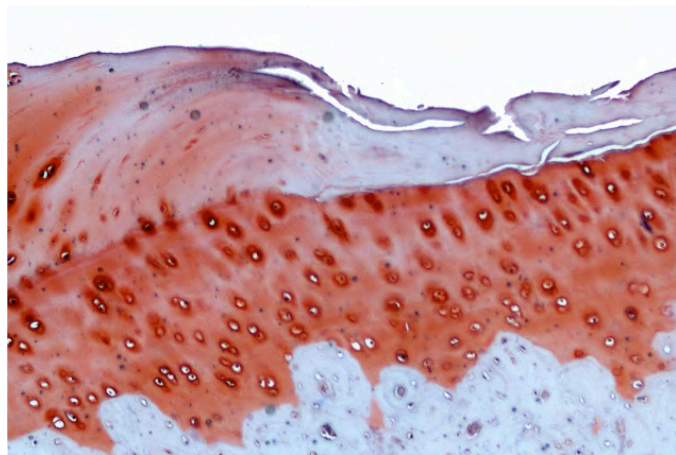
parece difícil el poder aplicarlo de modo experimental en animales por las limitaciones que conlleva el uso de los mismos. Por otro lado también se ha observado una mejoría de la condrogénesis *in vitro*, mediante la suplementación con otros factores como factores inhibitorios de la hipertrofia (104). Esto puede ser favorecido mediante el uso de *andamiajes como soporte de las células y de determinadas sustancias*. La matriz ideal debe ser biocompatible, reabsorbible (tener una reabsorción gradual controlada, con un crecimiento celular y tisular simultáneo), mecánicamente estable para servir temporalmente como soporte de las células implantadas, tener suficiente porosidad e interconectividad para permitir la migración celular así como el paso de nutrientes y productos de degradación y ser condroinductor y condroconductor. Existen dos tipos fundamentales de andamiajes: sintéticos y naturales. Como matrices sintéticas se han empleado en ingeniería tisular para el cartílago el ácido poliglicólico (PGA), poliláctico (PLA) y sus copolímeros poliláctico-glicólico (PLGA). Tienen la ventaja respecto a los naturales de que pueden ser modificables, al menos teóricamente, sus propiedades biomecánicas y su velocidad de degradación así como su capacidad de liberación de factores de crecimiento. En contra tienen: la falta de porosidad de algunos que puede limitar el crecimiento celular interior, el aflojamiento y la toxicidad celular de sus residuos que puede producir una modificación en el pH causando inflamación y muerte celular (55). Los naturales son fundamentalmente ricos en proteínas (membranas de colágeno o geles como la fibrina o el plasma rico en plaquetas) o ricos en carbohidratos (ác. hialurónico, alginato, agarosa o chitosan). Los naturales más usados son los basados en colágeno y en hialurónico ya que son constituyentes naturales del cartílago y producen un medio más adecuado para el desarrollo, la adhesión y proliferación celular. El colágeno es la proteína básica de los tejidos conectivos del esqueleto y dispone de ligandos que permiten la adhesión celular, la migración y la diferenciación (105). Sus grupos funcionales a lo largo de su esqueleto facilitan la interacción con factores de

crecimiento locales. La fibrina es un polímero natural homólogo que forma parte de la cicatrización natural de las heridas. Está envuelta en el proceso de la coagulación de la sangre y se forma por la polimerización del fibrinógeno, en presencia de trombina. Debido a esto, se ha propuesto como matriz para reparar el cartílago (106). Se puede copolimerizar con hialurónico para producir una matriz tridimensional (107). La fibrina es un biomaterial muy biocompatible (108). Se ha utilizado en gel o pegamentos. Además, se ha visto que experimentalmente los condrocitos en una matriz de fibrina sobreexpresan IGF-1, produciendo una mayor cantidad de tejido con mayor cantidad de matriz extracelular y producción de colágeno II. El ácido hialurónico es el mayor componente de la matriz extracelular del cartílago. Se cree que media y regula la adhesión celular del condrocito con los efectos positivos que ello conlleva sobre la expresión y diferenciación celular (109). Varios estudios han mostrado que los condrocitos son capaces de rediferenciarse en ácido hialurónico y de retener su fenotipo incluso cuando son cultivados en monocapa durante periodos largos de tiempo (55). Se ha visto que el ácido hialurónico es capaz de estimular la condrogénesis de las MSC (110). El alginato es un polisacárido aniónico derivado de las algas marinas. En presencia de cationes de calcio, las cadenas de alginato se mantienen por sus uniones iónicas. Cuando las células se depositan en una solución de cloruro de calcio, en presencia de alginato, forman esferas, capaces de vehicularlas. El quitosano es un biopolímero de glucosamina y N-acetilglucosamina. Sus productos de degradación incluyen condroitín sulfato, dermatán sulfato, ácido hialurónico, queratán sulfato y colágeno tipo II glicosilado; no son productos tóxicos y están implicados en la síntesis del cartílago articular. También se ha probado como matriz otros tejidos naturales entre los que se encuentran la membrana amniótica. Ésta es rica en ácido hialurónico, proteoglicanos y colágeno los cuales son encontrados en el tejido cartilaginoso nativo (67, 111) y son importantes en el control y el mantenimiento del metabolismo normal del

condrocito (72). La existencia de estos componentes, como ya se ha mencionado previamente, unido a la existencia en su interior de determinadas moléculas de adhesión y señalización celular hacen constituir un microambiente que además de simular al del cartílago hialino, puede favorecer la diferenciación condrogénica. Todas estas características no son compartidas con otros polímeros sintéticos o naturales, destacando las ventajas clínicas de su uso al compararlo con otros productos biocompatibles. De esta manera la membrana amniótica como scaffold, cumpliría de forma simultánea dos funciones. Por un lado serviría como transportador celular y por otro favorecería la diferenciación condrogénica. Tan y cols. (109) recientemente, en un estudio preliminar in vitro, observan que la membrana amniótica utilizada como transportadora celular, puede favorecer la diferenciación condrogénica de CMM, estimulando la síntesis de glucosaminglicanos. In vivo, existen estudios experimentales animales que han vehiculizado en membrana amniótica condrocitos procedentes de conejo y humanos para el tratamiento de lesiones osteocondrales (92) y en un modelo de artrosis (72) con buenos resultados. En la membrana los condrocitos no se diferencian hacia fibroblastos o hacia otros tipos celulares, sino que mantienen las características fenotípicas de los condrocitos humanos (72). En nuestro estudio hemos observado que en muchos casos la membrana se integró perfectamente con los bordes del tejido adyacente (figura 44 y 45).



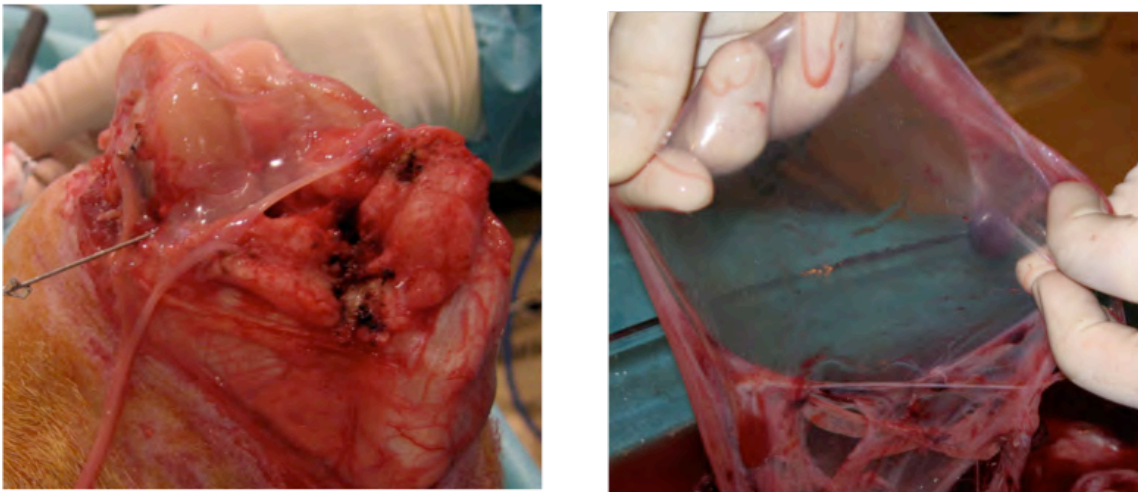
**Figura 44.** Corte histológico donde se observa la integración de la membrana amniótica con los bordes de la lesión.



**Figura 45.** Corte histológico teñido con safranina donde se observa la integración de la membrana amniótica con los bordes de la lesión.

Creemos que fue capaz de transportar a las células que contenía en su interior, favorecer su diferenciación hacia condrocitos y estimular al tejido cartilaginoso sano de la periferia de la lesión. No obstante somos conscientes de que serían necesarios nuevos estudios para poder afirmar esto con certeza.

La membrana amniótica es un tejido de fácil manejo y como ya se comentó con anterioridad posee unas propiedades biomecánicas que la hacen muy favorable para ser utilizada en el campo de la ingeniería tisular. Se adapta muy bien a todo tipo de lesiones, tiene una viscoelasticidad importante, lo que le da a su vez la propiedad de ser distensible pero a su vez resistente (figura 46).



**Figura 46.** Adhesividad y viscoelasticidad de la membrana amniótica.

Comparando nuestra membrana con otros tejidos utilizados por otros autores como transportador celular, a excepción de en un caso, no hemos observado una hipertrofia de la membrana amniótica como se ha observado cuando se ha usado el periostio (108). Este caso estaba asociado a aplicación de las microfracturas donde siempre hemos observado que se genera un ambiente fibroblástico mayoritario, a diferencia de lo ocurrido en los restantes grupos.

Se ha observado que los condrocitos son capaces de crecer en ambas caras de la membrana amniótica, tanto en el lado estromal como epitelial. Sin embargo parece que la cara estromal es más apropiada que la epitelial para el crecimiento de

condrocitos humanos (72, 92) y ésta ha sido aplicada directamente sobre la lesión. Algunos autores han trasplantado con éxito en oftalmología la membrana de la misma manera que la hemos aplicado, dispuesta en multi-capa, para rellenar defectos más profundos (112, 113). Entre las ventajas del uso de la membrana amniótica se encuentra el tener propiedades antiinflamatorias. Las creaciones derivadas de la ingeniería tisular al ser aplicadas clínicamente, frecuentemente provocan una reacción inflamatoria conocida como una reacción a cuerpo extraño sobre el implante (67). Estos materiales implantados pueden ser degradables o no degradables. Mientras que la inflamación puede ser buena en algunos casos haciendo que cure una lesión, en otros puede producir el fallo del injerto. Las reacciones a cuerpo extraño estimulan a macrófagos y a células gigantes que producen citoquinas que atraen a fibroblastos, produciendo fibrosis. Además un andamiaje de membrana amniótica puede modular la curación de una herida estimulando la reconstrucción tisular más que estimulando la formación de un tejido fibroso.

## **MEMBRANA AMNIÓTICA Y FACTORES DE CRECIMIENTO**

Posiblemente, los factores de crecimiento pueden mejorar la respuesta de las células en su anclaje, proliferación y diferenciación. Se ha observado que la membrana amniótica puede producir abundantes factores de crecimiento (111). Contiene componentes importantes en la estimulación celular. Las células derivadas de la placenta pueden secretar una serie de factores como citoquinas las cuales tienen efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios y factores de crecimiento relacionados con la proliferación y diferenciación celular. Los niveles de mRNA de estos factores, son

mayores cuando el epitelio amniótico está presente, lo que sugiere un origen epitelial de los mismos (114). Algunos estudios han sugerido que la MA desprovista de epitelio (tratada previamente con tripsina para retirar las células epiteliales) puede facilitar la penetración celular en la estructura porosa de la membrana (92). Sin embargo otros estudios han mostrado peores resultados con aparición de necrosis celular al usar la tripsina sobre la membrana (72). Nosotros pensamos que es importante el conservar el epitelio amniótico ya que estaríamos retirando parte de la posible actividad de la membrana amniótica, debido a que éste aporta células pluripotenciales y factores biológicos activos. Además, el procesamiento de la membrana puede tener consecuencias negativas sobre la viabilidad celular interior y la estructura de la misma.

Varios estudios han destacado la importancia de las señales procedentes del microambiente celular articular para inducir la formación de cartílago y mantener este fenotipo (59). A pesar del éxito demostrado de estas proteínas in vitro, su aplicación clínica por el momento "in vivo" no ha sido igual de exitosa (55). Esto puede ser debido a una variedad de factores. Por un lado, se ha observado que la condrogénesis in vitro ocurre en una fase secuencial (115). En cada una de las mismas se van a producir unos fenómenos celulares diferentes (proliferación, diferenciación y síntesis de MEC). Los factores de crecimiento / regulación van a ser diferentes y específicos en cada fase y la respuesta celular a un mismo factor puede ser diferente en función de en la fase en la que se encuentre dicha célula. Es por ello por lo que la regulación de la condrogénesis involucra no solo a una amplia variedad de factores sino también a una exposición secuencial controlada a dichos factores. Por otro lado sabemos que la vida media de estos factores es corta (55). Esto obligaría a que para poder aplicarlos clínicamente, sería necesario el uso de un sistema de secreción de estos factores a dosis terapéuticas durante un periodo prolongado de tiempo para evitar la necesidad de tener

que aplicar de forma repetida la administración local para conseguir mantener niveles efectivos. La terapia génica podría tener en este sentido un papel en el futuro abordaje clínico para la reparación de cartílago. Mediante la presencia de genes o DNA complementario (cDNA) que codifiquen para la producción de factores de crecimiento condrogénicos en las células implantadas (condrocitos o células madre mesenquimales), estas células pueden producir los factores de crecimiento deseados sin necesidad de la suplementación exógena evitando el problema de la corta vida media y de la dosis subterapéutica. Para transportar el cDNA se usa un vector. La transfección se puede hacer de forma directa o indirecta. La directa consiste en inyectar el vector directamente en la articulación para transfectar a las células nativas. In vivo esto ha resultado difícil de reproducir. Puede resultar en niveles bajos de expresión de factores de crecimiento así como la expresión no deseada de los mismos en tejidos adyacentes debido a la no especificidad de los genes. La transfección indirecta consiste en utilizar células modificadas genéticamente con los genes y aplicarlas directamente en la lesión. Parece ser un procedimiento más seguro y más controlado. Los vectores virales que han sido usados en estudios preclínicos incluyen adenovirus, virus adenoasociados y lentivirus. Todavía está por definir la elección, la combinación y la dosis de distintos factores de crecimientos para su aplicación clínica en regeneración de cartílago in vivo. Hasta que estos factores estén clínicamente disponibles y puedan ser liberados de forma no peligrosa, la pregunta continuará sin respuesta (55).

Es de sobra conocido el papel esencial que lleva a cabo el microambiente celular en el crecimiento y diferenciación (116). Supone la existencia de unas señales entre células que se producen de forma coordinada. Sin embargo, ¿es capaz este microambiente de estimular suficientemente la proliferación y diferenciación celular sin necesidad de potenciarlo artificialmente en el tejido cartilaginoso? ¿Puede la densa

matriz extracelular existente en el cartílago permitir el flujo de señales y de factores de crecimiento? En este sentido es posible aumentar la diferenciación condrogénica in vitro previamente a su aplicación clínica, bien mediante la inducción química con factores de crecimiento (TGF- y BMPs sobretodo) (109) o bien mediante el cultivo conjuntamente de la células madre con condrocitos primarios maduros (116). Hasta ahora parece ser que toda la atención se ha centrado en ver el efecto producido por el tejido trasplantado en la lesión, modulado por la interacción celular entre dicho tejido y el tejido huésped. Nosotros creemos que puede ser importante el investigar acerca del efecto producido por el tejido huésped en la lesión debido a la secreción de señales o factores biológicamente activos por parte del tejido trasplantado. Es decir, si las células aplicadas tienen un papel directo en la reparación del cartílago o si por el contrario su forma de actuar es indirecta, a través de la secreción de citoquinas, factores de crecimiento, inhibidores u otras moléculas que puedan actuar en el tejido sobre el que ha sido aplicado o el circundante (médula ósea subyacente, membrana sinovial...) y ser éste la primera fuente de reparación cartilaginosa. De este modo el cartílago sano de alrededor de la lesión podría tener un papel activo en la regeneración del cartílago. En este sentido hemos visto en nuestro estudio que cuando se trasplantó la membrana amniótica junto con las CMM previamente cultivadas, la respuesta reparativa se encontraba localizada en la zona más profunda de la lesión, como si estuviese siendo generada por los condrocitos nativos. Caplan (117) considera que aunque la capacidad de diferenciación de una célula madre en diferentes estirpes celulares, entre ellas la cartilaginosa, es un hecho importante, potencialmente útil en ingeniería tisular y que hasta ahora ha centrado todos nuestros esfuerzos de investigación, la inmunomodulación producida por la capacidad de secreción de factores bioactivos abre un nuevo campo de uso clínico hasta ahora no descubierto y puede quizás tener un efecto mayor e inmediato en la biología y química articular. Hoy por hoy resulta incierto

si las células implantadas contribuyen directamente en la reparación funcional del cartílago articular o si éstas ejercen su papel de forma indirecta. La secreción de citoquinas, factores de crecimiento, factores inhibidores u otros factores bioactivos pueden actuar sobre el tejido del huésped y hacer a éste el responsable primario de la reparación de la lesión.

## **INFLUENCIA DE LOS DISTINTOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA EN SU POTENCIAL USO EN INGENIERÍA TISULAR**

Como ya se mencionó con anterioridad, existen varios métodos para conservar la MA (67). Con el uso de algunos de ellos se produce una pérdida de la viabilidad celular. La cuantificación de la misma es variable si uno revisa la literatura. En general, tanto estudios clínicos como pre-clínicos muestran que los métodos principalmente usados para la conservación a corto plazo tienen una menor muerte celular y pérdida de la actividad mitocondrial. En nuestro estudio, cuando la membrana amniótica fue usada en fresco, pudimos observar una mayor densidad celular que cuando ésta fue usada previamente congelada. La respuesta tisular reparativa fue también mayor. Ello confirma que cuando la MA es usada sin procesar, no solo funciona de forma primaria como matriz, vehiculizando células, sino que lo hace también como fuente celular, aportándolas (83). Independientemente de la composición del medio de conservación usado o de la temperatura alcanzada, los métodos de criopreservación muestran una intensa pérdida de la viabilidad celular en la MA una vez descongelada (118). Sin embargo, en todos los casos en los cuales aplicamos la MA previamente congelada, se

pudo observar una respuesta reparativa en el tejido perilesional que no se fue observada en el grupo control cuando se dejó a la lesión sin recibir ningún tratamiento. Esto implica que la MA es capaz de conservar algunas células o algunos factores biológicos, capaces de generar esta reacción tisular, incluso cuando ésta es congelada. No obstante la respuesta del cartílago fue menor que cuando la membrana fue usada sin preservar o previamente cultivada con células, mostrando un mayor aporte de las mismas. Algunos autores han mencionado que la membrana usada en fresco, al conservar una mayor densidad celular, tiene una mayor inmunogenicidad (68, 83, 119), publicado la existencia de una respuesta inflamatoria de bajo grado cuando existen células epiteliales presentes, sugiriendo que la membrana amniótica puede ser algo inmunogénica. Nosotros no observamos ninguna reacción inflamatoria en ninguna de nuestras muestras que pudiera traducir un rechazo. Creemos que en este sentido, el amnios es un tejido con un privilegio inmunológico con muy poca o ausente inmunogenicidad y con unas propiedades inmunomoduladoras que le hacen apropiado para el alotrasplante sin rechazo. Tampoco nosotros observamos en nuestro estudio ningún caso de infección de la herida quirúrgica o de la articulación, incluso cuando se usó la membrana sin ningún método de esterilización. Algunos autores (120), aconsejan el uso de un tratamiento previo a su implantación y de unos medios de conservación que nos aseguren la pureza microbiológica. Los organismos más frecuentemente aislados han sido flora común de la piel no patógenos: difteroides, S. epidermidis y P. Acnes entre otros. Otros autores (70), sin embargo, no han constatado ningún caso de infección clínica, mediante la aplicación en fresco en oftalmología, incluso sin el uso de antibióticos o conservantes. En general se recomienda para el uso en fresco el ser obtenidas bajo estrictas condiciones asépticas de placentas obtenidas de cesáreas programadas para evitar la contaminación por la flora común existente en el canal del parto o tras la ruptura prematura de membrana (67, 73), el ser lavadas bajo

las mismas condiciones con 1000 ó 2000 cc de solución de Hartman, la conservación sumergida en dicha solución a +4° C y el uso en menos de 24 horas. Es muy probable que las propiedades antibacterianas y antiinflamatorias intrínsecas observadas previamente en la MA (69) tengan que ver con la ausencia del desarrollo de infecciones clínicas.

Por otro lado, los métodos de conservación a largo plazo de la membrana, obtienen la mayor seguridad en relación a la posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas del donante al huésped. La membrana amniótica es un material biológico y por ello va a tener los mismos problemas que otros biomateriales usados. Para poder evitarlo, deben aplicarse las mismas precauciones y los mismos criterios de seguridad usados en los trasplantes de órganos. Los donantes potenciales deben de ser chequeados para valorar cualquier factor de riesgo que les puedan hacer no candidatos para la donación (67). De ser llevada a cabo una revisión de los antecedentes médicos más relevantes que aseguren que están libres de riesgo, así como una valoración clínica que incluya estudios serológicos que descarten cualquier evidencia de infección por VIH, VHB, VHC y sífilis sobretodo. Aún así, existe la ligera posibilidad de que el donante se encuentre en el periodo ventana de la infección. Esto obliga a realizar una segunda prueba serológica 6 meses más tarde, circunstancia que no nos es de utilidad en el caso de ser usada la membrana en fresco, puesto que el injerto debe ser utilizado en el plazo de 24 horas desde la extracción del mismo. Esta desventaja podría eliminarse con la sistematización de las determinaciones serológicas por PCR, pero no permite ampliar el plazo de utilización del tejido (73). Algunos autores (70) destacan la importancia de la selección del donante y eligen solo a aquellos los cuales han seguido protocolos estrictos de serología durante el embarazo y en los cuales los factores de riesgo para poder haber adquirido la enfermedad infecciosa en el

momento previo al parto (periodo ventana) sean prácticamente nulos. Aún así reconocen que existe la posibilidad de la transmisión de enfermedades, y esto debiera ser transmitido al paciente. Para poder evitarlo sin perder el efecto producido por las células, podría ser utilizada la membrana amniótica congelada pero cultivada sobre el lado estromal, con las mismas células madres previamente extraídas de otra membrana (121). Así evitaríamos los posibles efectos negativos derivados de su uso en fresco, manteniendo las propiedades de sus células. Por una lado parecería interesante el cultivarlas bajo un estímulo proliferativo, como puede ser el EFG, que permitiera expandirlas y poder conseguir así una respuesta reparativa de mayor intensidad a la observada en nuestro estudio. Miki y cols. (74) observaron que cuando se expanden estas células en cultivo, se consiguen mantener indiferenciadas a diferencia de lo observado con otras células pluripotenciales, por lo que son capaces de conservar de forma indefinida la capacidad de diferenciación hacia los diferentes tejidos. Otro aspecto a valorar es el de si sería beneficioso el estimular la diferenciación condrogénica in vitro, previo al trasplante, cultivando estas células junto con condrocitos maduros (122) y/o añadiendo algunos factores de crecimiento como el TGF- $\beta$  o una PMO. Pero esto obligaría, como ya hemos mencionado previamente, a controlar también la dediferenciación condrocítica o la aparición de condrocitos hipertróficos, con el detrimento en la función de los mismos que esto supondría. Otra alternativa podría ser la implantación in vivo de células indiferenciadas con la esperanza de una diferenciación in situ a través del ambiente condrogénico nativo y su consecuente mejor integración.

## FUTURO EN EL TRATAMIENTO DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

Creemos que la aplicación de la ingeniería tisular es probablemente el futuro del tratamiento de lesiones consideradas hoy por hoy irreparables, entre las que se encuentran las del cartílago articular. Somos conocedores de que aunque han sido publicado muchos resultados exitosos (59) con el trasplante de células madres mesenquimales en defectos cartilaginosos de espesor completo, así como en defectos osteocondrales, existen preguntas como ¿cuál es el tejido origen conveniente de las células madres mesenquimales?, ¿cuáles son las condiciones ideales para la reparación del cartílago? o ¿cómo actúan o interaccionan las células donantes en el tejido huésped? que están todavía sin responder, lo que limita su aplicación clínica para las lesiones del cartílago. A pesar de algunos obstáculos mencionados en este estudio, el futuro del uso de la membrana amniótica en la ingeniería tisular es muy esperanzador. Sin embargo son necesarias más investigaciones y estudios acerca del trasplante de células madre mesenquimales para la regeneración del cartílago y otros que puedan determinar todo el potencial de la membrana amniótica para poder conseguir una aplicación clínica de la misma para el tratamiento de las lesiones condrales. Somos conscientes también de que el procedimiento buscado debe de ser sencillo, coste-efectivo, poder ser realizado en un solo proceso y de forma artroscópica, con una mínima morbilidad de la zona donante y complicaciones perioperatorias.

## LIMITACIONES

Nuestro estudio presenta varias limitaciones. Presenta un tamaño muestral pequeño que obliga a basar los resultados en una estimación visual con una interpretación subjetiva más que en un análisis estadístico de los mismos. Se trata de un estudio preliminar inicial donde nuestro objetivo es poder, en base a lo aquí observado, generar un estudio posterior, con una muestra más grande y con unos grupos más selectivos, con la finalidad de poder sacar diferencias estadísticamente significativas.

Consideramos que la técnica utilizada para la fijación de la membrana no ha demostrado ser la ideal, ya que en algunas muestras se observó que en el momento de la necropsia, la membrana había perdido el contacto con la lesión. Queda abierto a estudio el poder determinar cual sería la mejor forma de fijarla en la lesión (sutura, pegamento biológico tipo fibrina, mini-anclajes con suturas reabsorbibles...).

Finalmente, tampoco podemos asegurar de manera categórica que las células que hemos visto proliferando en la lesión sean células derivadas de las CMM de la MA.

## **6. CONCLUSIÓN**

En base a lo observado podemos concluir que la aplicación de la membrana amniótica no es capaz de regenerar el cartílago hialino articular en lesiones de espesor parcial producidas experimentalmente en el cóndilo femoral interno de la rodilla en la oveja esqueléticamente madura.

Se observa que la aplicación de células procedente de la membrana amniótica en la lesión genera una proliferación celular y la formación de unos clusters, que interpretamos como tejido de reparación, que es mayor a la observada con las otras técnicas usadas en el estudio. Creemos que el contenido elevado en proteoglicanos observado en este grupo, como muestra la tinción intensa con Safranina, refuerza nuestra idea. No obstante serían necesarios más estudios para poder dilucidar la importancia de este hallazgo.

La membrana amniótica posee unas características de manejo muy favorables para ser utilizada en ingeniería tisular, es un tejido perfectamente biocompatible, que no produce rechazo cuando se aplica como alotrasplante y que es capaz de integrarse al cartílago sano perilesional.

Pensamos que la escala de O'Driscoll no es la más apropiada para los estudios de ingeniería tisular ya que no valora con suficiente importancia las características del tejido neoformado.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Simon TM, Jackson DW. Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthrosc.* 2006 Sep;14(3):146-54.
2. Sgaglione NA, Miniaci A, Gillogly SD, Carter TR. Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee. *Arthroscopy.* 2002 Feb;18(2 Suppl 1):9-32.
3. Sokoloff L. *The Joints and synovial fluid.* New York: Academic Press; 1980.
4. Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1998 Oct;28(4):192-202.
5. Poole CA, Wotton SF, Duance VC. Localization of type IX collagen in chondrons isolated from porcine articular cartilage and rat chondrosarcoma. *Histochem J.* 1988 Oct;20(10):567-74.
6. Poole CA, Ayad S, Gilbert RT. Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Sci.* 1992 Dec;103 ( Pt 4):1101-10.
7. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:106-10.
8. Bolton MC, Dudhia J, Bayliss MT. Age-related changes in the synthesis of link protein and aggrecan in human articular cartilage: implications for aggregate stability. *Biochem J.* 1999 Jan 1;337 ( Pt 1):77-82.
9. Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA. Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. *J Orthop Res.* 1997 Jul;15(4):491-8.
10. Nixon AJ, Lillich JT, Burton-Wurster N, Lust G, Mohammed HO. Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultured with insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta. *J Orthop Res.* 1998 Sep;16(5):531-41.
11. Schafer SJ, Luyten FP, Yanagishita M, Reddi AH. Proteoglycan metabolism is age related and modulated by isoforms of platelet-derived growth factor in bovine articular cartilage explant cultures. *Arch Biochem Biophys.* 1993 May;302(2):431-8.
12. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Oct(391 Suppl):S26-33.

13. Hallett M, Andrish J. Effects of exercise on articular cartilage. *Sports Med Arthroscopic Rev.* 1994;2(1):29-37.
14. Vega JA, García-Suárez O. Regulación de la biología del cartilago articular normal y patológico por los factores de crecimiento. *Rev Ortop Traumatol.* 2000;44(3):316-23.
15. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 1989 Feb;10(1):68-91.
16. Seyedin SM, Rosen DM. Matrix proteins of the skeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1990 Oct;2(5):914-9.
17. Takigawa M, Okawa T, Pan H, Aoki C, Takahashi K, Zue J, et al. Insulin-like growth factors I and II are autocrine factors in stimulating proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective receptors on a clonal human chondrosarcoma-derived chondrocyte cell line, HCS-2/8. *Endocrinology.* 1997 Oct;138(10):4390-400.
18. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. The potential of signal transduction inhibitors for the treatment of arthritis: Is it all just JNK? *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(2):181-3.
19. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21491-4.
20. Cawston T. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today.* 1998 Mar;4(3):130-7.
21. Woessner JF, Jr., Gunja-Smith Z. Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl.* 1991 Feb;27:99-101.
22. Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum.* 1997 Nov;40(11):2065-74.
23. Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis.* 1997 Sep;56(9):542-9.
24. Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, Porti D, Pergolizzi RG, Grande DA. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Oct(379 Suppl):S171-8.
25. Shelbourne KD, Jari S, Gray T. Outcome of untreated traumatic articular cartilage

- defects of the knee: a natural history study. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:8-16.
26. Zamber RW, Teitz CC, McGuire DA, Frost JD, Hermanson BK. Articular cartilage lesions of the knee. *Arthroscopy.* 1989;5(4):258-68.
  27. Indelicato PA, Bittar ES. A perspective of lesions associated with ACL insufficiency of the knee. A review of 100 cases. *Clin Orthop Relat Res.* 1985 Sep(198):77-80.
  28. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 1997 Aug;13(4):456-60.
  29. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 2002 Sep;18(7):730-4.
  30. LaPrade RF, Burnett QM, 2nd, Veenstra MA, Hodgman CG. The prevalence of abnormal magnetic resonance imaging findings in asymptomatic knees. With correlation of magnetic resonance imaging to arthroscopic findings in symptomatic knees. *Am J Sports Med.* 1994 Nov-Dec;22(6):739-45.
  31. Kaplan LD, Schurhoff MR, Selesnick H, Thorpe M, Uribe JW. Magnetic resonance imaging of the knee in asymptomatic professional basketball players. *Arthroscopy.* 2005 May;21(5):557-61.
  32. Major NM, Helms CA. MR imaging of the knee: findings in asymptomatic collegiate basketball players. *AJR Am J Roentgenol.* 2002 Sep;179(3):641-4.
  33. Noyes FR, Bassett RW, Grood ES, Butler DL. Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries. *J Bone Joint Surg Am.* 1980 Jul;62(5):687-95, 757.
  34. Aroen A, Loken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, et al. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med.* 2004 Jan-Feb;32(1):211-5.
  35. Friemert B, Oberlander Y, Danz B, Haberle HJ, Bahren W, Gerngross H, et al. MRI vs. arthroscopy in the diagnosis of cartilage lesions in the knee. Can MRI take place of arthroscopy?. *Zentralbl Chir.* 2002 Oct;127(10):822-7.
  36. Palosaari K, Ojala R, Blanco-Sequeiros R, Tervonen O. Fat suppression gradient-echo magnetic resonance imaging of experimental articular cartilage lesions: comparison between phase-contrast method at 0.23T and chemical shift selective method at 1.5T. *J Magn Reson Imaging.* 2003 Aug;18(2):225-31.
  37. Centers for Disease Control and Prevention. Arthritis prevalence and activity

- limitations-United States, 1990. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1994;84:524-35.
38. Jackson DW, Simon TM, Aberman HM. Symptomatic articular cartilage degeneration: the impact in the new millennium. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Oct(391 Suppl):S14-25.
  39. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* 2000 Oct 17;133(8):635-46.
  40. Reinholz GG, Lu L, Saris DB, Yaszemski MJ, O'Driscoll SW. Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials.* 2004 Apr;25(9):1511-21.
  41. Hurtig MB, Fretz PB, Doige CE, Schnurr DL. Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair. *Can J Vet Res.* 1988 Jan;52(1):137-46.
  42. Lohmander LS. Tissue engineering of cartilage: do we need it, can we do it, is it good and can we prove it? *Novartis Found Symp.* 2003;249:2-10; discussion -6, 170-4, 239-41.
  43. Cole BJ, Pascual-Garrido C, Grumet RC. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2009 Jul;91(7):1778-90.
  44. de Windt TS, Bekkers JE, Creemers LB, Dhert WJ, Saris DB. Patient profiling in cartilage regeneration: prognostic factors determining success of treatment for cartilage defects. *Am J Sports Med.* 2009 Nov;37 Suppl 1:58S-62S.
  45. Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, Erggelet C, Schmal H, Suedkamp NP, et al. Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med.* 2008 Nov;36(11):2091-9.
  46. Zaslav K, Cole B, Brewster R, DeBerardino T, Farr J, Fowler P, et al. A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am J Sports Med.* 2009 Jan;37(1):42-55.
  47. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2004 Mar;86-A(3):455-64.
  48. Gudas R, Kalesinskas RJ, Kimtys V, Stankevicius E, Toliulis V, Bernotavicius G, et al. A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy.* 2005 Sep;21(9):1066-75.

49. Childers JC, Jr., Ellwood SC. Partial chondrectomy and subchondral bone drilling for chondromalacia. *Clin Orthop Relat Res.* 1979 Oct(144):114-20.
50. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy.* 2003 May-Jun;19(5):477-84.
51. Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Almqvist KF, Verdonk R, Bellemans J, et al. Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee: characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture. *Am J Sports Med.* 2009 Nov;37 Suppl 1:10S-9S.
52. Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Haspl M, Bohnsack M, Fortems Y, et al. Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am J Sports Med.* 2008 Feb;36(2):235-46.
53. Williams RJ, 3rd, Harnly HW. Microfracture: indications, technique, and results. *Instr Course Lect.* 2007;56:419-28.
54. Kreuz PC, Muller S, Ossendorf C, Kaps C, Erggelet C. Treatment of focal degenerative cartilage defects with polymer-based autologous chondrocyte grafts: four-year clinical results. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(2):R33.
55. Haleem A, Chu C. Advances in Tissue Engineering Techniques for Articular Cartilage Repair. *Operative Techniques in Orthopaedics.* 2010;20(2):76-89.
56. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Oct 6;331(14):889-95.
57. Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 3:109-15.
58. Froger-Gaillard B, Charrier AM, Thenet S, Ronot X, Adolphe M. Growth-promoting effects of acidic and basic fibroblast growth factor on rabbit articular chondrocytes aging in culture. *Exp Cell Res.* 1989 Aug;183(2):388-98.
59. Pelttari K, Steck E, Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury.* 2008 Apr;39 Suppl 1:S58-65.
60. Stevens MM, Marini RP, Martin I, Langer R, Prasad Shastri V. FGF-2 enhances TGF-beta1-induced periosteal chondrogenesis. *J Orthop Res.* 2004 Sep;22(5):1114-9.

61. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009 Nov;17(11):1289-97.
62. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976 Sep;4(5):267-74.
63. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res.* 1980 Sep(151):294-307.
64. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998 Jan 10;238(1):265-72.
65. Steck E, Bertram H, Abel R, Chen B, Winter A, Richter W. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2005 Mar;23(3):403-11.
66. Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, et al. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol.* 2007 Jun;211(3):682-91.
67. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2008;15:88-99.
68. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci.* 2007 Nov;105(3):215-28.
69. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta.* 1991 May-Jun;12(3):285-8.
70. Mejia LF, Acosta C, Santamaria JP. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea.* 2000 May;19(3):288-91.
71. Adds PJ, Hunt C, Hartley S. Bacterial contamination of amniotic membrane. *Br J Ophthalmol.* 2001 Feb;85(2):228-30.
72. Diaz-Prado S, Rendal-Vazquez ME, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, Rodriguez-Cabarcos M, Fuentes-Boquete I, et al. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue*

- Bank. 2010 May;11(2):183-95.
73. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhring HJ, Evangelista M, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008 Feb;26(2):300-11.
  74. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005 Nov-Dec;23(10):1549-59.
  75. Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*. 2005 Jun-Jul;23(6):719-26.
  76. Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P. The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med*. 2006 Jul;1(4):497-509.
  77. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod*. 2007 Sep;77(3):577-88.
  78. Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*. 2009 Jan;30(1):2-10.
  79. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 Mar;194(3):664-73.
  80. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jul-Aug;1(4):296-305.
  81. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol*. 2007;7:11.
  82. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol*. 1998 Apr;116(4):431-41.
  83. Kruse FE, Jousen AM, Rohrschneider K, You L, Sinn B, Baumann J, et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000 Jan;238(1):68-75.
  84. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic

- membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 Jun;42(7):1539-46.
85. Tseng SC, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol.* 1997 Dec;124(6):765-74.
  86. Hurtig M, Hoemann C, Fortier L, Markel M, Gryn timer M. Recommendations for use of animal models in cartilage repair: report from the ICRS animal models working group. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(Suppl 2):60-1.
  87. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 1986 Sep;68(7):1017-35.
  88. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg Am.* 1988 Apr;70(4):595-606.
  89. Rutgers M, van Pelt MJ, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010 Jan;18(1):12-23.
  90. Wei X, Gao J, Messner K. Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint. *J Biomed Mater Res.* 1997 Jan;34(1):63-72.
  91. Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Dec;87(12):2671-86.
  92. Jin CZ, Park SR, Choi BH, Lee KY, Kang CK, Min BH. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng.* 2007 Apr;13(4):693-702.
  93. Hunziker EB, Stahli A. Surgical suturing of articular cartilage induces osteoarthritis-like changes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008 Sep;16(9):1067-73.
  94. Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation--technique and long-term follow-up. *Injury.* 2008 Apr;39 Suppl 1:S40-9.
  95. Wakitani S. [Present status and perspective of articular cartilage regeneration]. *Yakugaku Zasshi.* 2007 May;127(5):857-63.
  96. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. The microfracture technic in

- the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopade*. 1999 Jan;28(1):26-32.
97. Wei JP, Nawata M, Wakitani S, Kametani K, Ota M, Toda A, et al. Human amniotic mesenchymal cells differentiate into chondrocytes. *Cloning Stem Cells*. 2009 Mar;11(1):19-26.
  98. Mainil-Varlet P, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saager C, Jakob RP. Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9 Suppl A:S6-15.
  99. O'Driscoll SW, Marx RG, Beaton DE, Miura Y, Gallay SH, Fitzsimmons JS. Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system. *Tissue Eng*. 2001 Jun;7(3):313-20.
  100. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*. 1971 Apr;53(3):523-37.
  101. Mainil-Varlet P, Van Damme B, Nestic D, Knutsen G, Kandel R, Roberts S. A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. *Am J Sports Med*. 2010 May;38(5):880-90.
  102. Angele P, Schumann D, Angele M, Kinner B, Englert C, Hente R, et al. Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology*. 2004;41(3-4):335-46.
  103. Mauck RL, Byers BA, Yuan X, Tuan RS. Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading. *Biomech Model Mechanobiol*. 2007 Jan;6(1-2):113-25.
  104. Zhang X, Ziran N, Goater JJ, Schwarz EM, Puzas JE, Rosier RN, et al. Primary murine limb bud mesenchymal cells in long-term culture complete chondrocyte differentiation: TGF-beta delays hypertrophy and PGE2 inhibits terminal differentiation. *Bone*. 2004 May;34(5):809-17.
  105. Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol*. 1981 Mar;88(3):473-85.
  106. Paletta GA, Arnoczky SP, Warren RF. The repair of osteochondral defects using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *Am J Sports Med*. 1992 Nov-Dec;20(6):725-31.
  107. Nehrer S, Chiari C, Domayer S, Barkay H, Yayon A. Results of chondrocyte

- implantation with a fibrin-hyaluronan matrix: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Aug;466(8):1849-55.
108. Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009 Jun;17(6):561-77.
  109. Tan SL, Sulaiman S, Pinguan-Murphy B, Selvaratnam L, Tai CC, Kamarul T. Human amnion as a novel cell delivery vehicle for chondrogenic mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank.* 2011 Feb;12(1):59-70.
  110. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res.* 2008 Aug;333(2):207-15.
  111. Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006 Aug;12(8):2117-29.
  112. Prabhasawat P, Tesavibul N, Komolsuradej W. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br J Ophthalmol.* 2001 Dec;85(12):1455-63.
  113. Kruse FE, Rohrschneider K, Volcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology.* 1999 Aug;106(8):1504-10; discussion 11.
  114. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000 Mar;20(3):173-7.
  115. O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS. The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Oct(391 Suppl):S190-207.
  116. Vats A, Bielby RC, Tolley N, Dickinson SC, Boccaccini AR, Hollander AP, et al. Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells: the effect of the micro-environment. *Tissue Eng.* 2006 Jun;12(6):1687-97.
  117. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: the past, the present, the future. *Cartilage.* 2010;1(1):6-9.
  118. Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank.* 2007;8(1):1-8.

119. Hori J, Wang M, Kamiya K, Takahashi H, Sakuragawa N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea*. 2006 Dec;25(10 Suppl 1):S53-8.
120. Khokhar S, Sharma N, Kumar H, Soni A. Infection after use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea*. 2001 Oct;20(7):773-4.
121. Marongiu F, Gramignoli R, Sun Q, Tahan V, Miki T, Dorko K, et al. Isolation of amniotic mesenchymal stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010 Mar;Chapter 1:Unit 1E 5.
122. Cooke ME, Allon AA, Cheng T, Kuo AC, Kim HT, Vail TP, et al. Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Oct;19(10):1210-8.