

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Cirurgia



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**REPARACIÓ DE LESIONS CONDRALS MITJANÇANT SUPORTS
MACROPOROSOS BIODEGRADABLES TRIDIMENSIONALS DE
POLICAPROLACTONA. ESTUDI EXPERIMENTAL EN UN MODEL ANIMAL.**

TESI DOCTORAL:

Santos Martínez Díaz

Barcelona 2014

DIRECCIÓ DE LA TESI:

Prof. Enric Cáceres i Palou

Prof. Joan Carles Monllau i Garcia



La tesi doctoral amb títol:

**REPARACIÓ DE LESIONS CONDRALS MITJANÇANT SUPORTS
MACROPOROSOS BIODEGRADABLES TRIDIMENSIONALS DE
POLICAPROLACTONA. ESTUDI EXPERIMENTAL EN UN MODEL ANIMAL.**

i presentada pel doctorand;

Santos Martínez Díaz

Ha estat realitzada sota el model de compendi d'articles complint la normativa de la Universitat Autònoma de Barcelona per a aquest tipus de tesis doctorals.

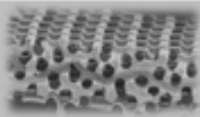
Referència bibliogràfica dels articles inclosos:

Martínez-Díaz S, Garcia-Giralt N, Lebourg M, Gómez-Tejedor JA, Vila G, Caceres E, Benito P, Pradas MM, Nogues X, Gómez-Ribelles JL, Monllau JC. In vivo evaluation of three-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits. Am J Sports Med. 2010 Mar;38(3):509-19.

Lebourg M, **Martínez-Díaz S**, García-Giralt N, Torres-Claramunt R, Gómez-Ribelles JL, Vila-Canet G, Monllau JC. Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic acid-polycaprolactone scaffolds: A study in vivo. J Biomater Appl. 2014 May;28(9):1304-15.

A Ana i Daniela

Als meus pares i germana



AGRAÏMENTS

Agraïments:

Al Professor Enric Cáceres i Palou per la seva capacitat de transmetre els coneixements sobre la nostre especialitat i per la confiança que ha dipositat en mi tots aquests anys.

Al Professor Joan Carles Monllau i Garcia per la seva passió en la recerca sobre el cartílag articular i haver-me donat l'oportunitat de treballar amb ell. Gràcies pel teu suport.

A tots els meus companys del Parc de Salut mar; Hospitals del Mar i l'Esperança. Lluís, Fernando, Albert, gràcies per estar al meu costat.

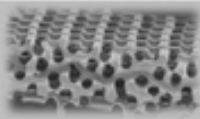
A Natalia Garcia-Giralt i Raúl Torres per la seva inestimable col·laboració en la elaboració d'aquesta Tesi.

A la Unitat de Recerca en Fisiologia Òssia i Articular (URFOA) de l'Institut Hospital del Mar d'Investigació Mèdica (IMIM).

Als "col·laboradors" en les tasques d'experimentació animal. Gemma, papà; gràcies.

Als companys de la Universitat Politècnica de València amb els que he tingut l'oportunitat de treballar tots aquests anys, especialment al Professor José Luís Gómez Ribelles, a Myriam Lebourg i a José Antonio Gómez Tejedor.

Al Dr. Joan Cebamanos i al Dr. Carlos Martin per iniciar aquesta línia de recerca en la reparació del cartílag articular que ha sigut fonamental en l'elaboració d'aquesta Tesi.



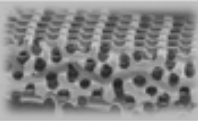
AGRAÏMENTS

Al "Ministerio de Educación y Ciencia" per la contribució en el finançament dels 2 treballs que formen part d'aquesta Tesi amb els projectes d'Investigació Científica i Desenvolupament Tecnològic "MAT2004-04980-C02-02 (CYCIT 2004-2007)" i "MAT2007-66759-C03-02 (CYCIT 2007-2010)".

A la meva família.

Als meus oncles Isa i Enrique.

Als meus amics Raúl, Tomás i Alberto.

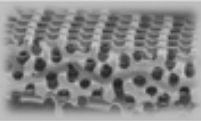


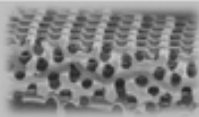
*“If we consult the standard Chirurgical Writers from Hippocrates down to the present Age, we shall find, that an ulcerated Cartilage is universally allowed to be a very troublesome Disease; that it admits of a Cure with more Difficulty than carious Bone; and that, when destroyed, it is not recovered’ (**una vegada destruit mai no es recupera**)*

William Hunter (1743)

“On the structure and diseases of articulating cartilages”

Trans R Soc Lond 42B: 514–21

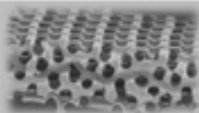




SUMARI

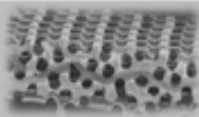
Sumari

1. LLISTA D'ABREVIACIONS.....	1
2. RESUM I MOTIVACIÓ.....	3
3. INTRODUCCIÓ.....	7
3.1. DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DE LES ARTICULACIONS.....	7
3.2. EL CARTÍLAG ARTICULAR.....	8
3.3. COMPOSICIÓ DEL CARTÍLAG ARTICULAR.....	9
3.3.1. CONDRÒCITS.....	9
3.3.2. LA MÀTRIU CARTILAGINOSA.....	10
3.3.3. AIGUA.....	11
3.3.4. COL·LAGEN.....	11
3.3.5. PROTEOGLICANS.....	11
3.3.6. ÀCID HIALURÒNIC.....	12
3.3.7. FUNCIONS DELS COMPONENTS DE LA MÀTRIU EXTRACEL·LULAR.....	12
3.4. ESTRUCTURA DEL CARTÍLAG ARTICULAR.....	13
3.5. FISIOPATOLOGIA DEL CARTÍLAG ARTICULAR.....	16
3.5.1. NUTRICIÓ.....	16
3.5.2. COMPORTAMENT MECÀNIC.....	17
3.5.3. RESPOSTA VISCOELÀSTICA DEL CARTÍLAG ARTICULAR.....	18
3.5.4. PERMEABILITAT.....	19
3.5.5. RELACIÓ ENTRE MORFOLOGIA I SOLICITACIONS.....	19



SUMARI

3.6. RESPOSTA DEL CARTÍLAG ARTICULAR DAVANT ALTERACIONS I LESIONS MECÀNIQUES.....	20
3.6.1. IMMOBILITZACIÓ – COMPRESSIÓ.....	20
3.6.2. IMPACTES REPETITS.....	21
3.6.3. LESIONS PER PENETRACIÓ.....	23
3.6.3.1. PENETRACIÓ SUPERFICIAL (CONDRAL).....	24
a) ESCARIFICACIÓ	
b) AFAITAT	
c) DEFECTES SUPERFICIALS	
3.6.3.2. PENETRACIÓ PROFUNDA (OSTEOCONDRA).....	25
3.7. MECANISME DE REPARACIÓ.....	26
3.7.1. NATURALES DEL TEIXIT DE REPARACIÓ.....	26
3.7.6. ACTUACIÓ DE LA MATRIU ÒSSIA.....	27
3.8. TRACTAMENT HISTÒRIC DE LES LESIONS DEL CARTÍLAG ARTICULAR.....	28
3.9. ENGINYERIA TISSULAR.....	31
3.10. SUPORTS MACROPOROSOS TRIDIMENSIONALS PER A L'ENGINYERIA TISSULAR DEL CARTÍLAG.....	33
3.11. PRINCIPALS CARACTERÍSTIQUES DE LA POLICAPROLACTONA.....	34
3.12. FONAMENTS PER A LA REALITZACIÓ DELS NOSTRES TREBALLS DE RECERCA.....	35
4. HIPÒTESI DE TREBALL.....	39
- Hipòtesi de treball 1.....	40
- Hipòtesi de treball 2.....	40



SUMARI

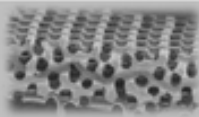
5. MATERIAL I MÈTODES..... 41

Treball nº 1

5.1. PREPARACIÓ DE LES Matrius de suport.....	41
5.2. ANIMAL D'EXPERIMENTACIÓ.....	42
5.3. OBTENCIÓ DELS CONDRÒCITS DE CONILL.....	44
5.4. CULTIU CEL·LULAR EN Matrius de policaprolactona.....	45
5.5. PREPARACIÓ DELS PÈL·LETS DE CONDRÒCITS.....	46
5.6. ANESTÈSIA DELS ANIMALS.....	46
5.7. IMPLANTACIÓ DE LES MOSTRES AL CONILL.....	47
5.8. CONDICIONS D'ESTABULACIÓ.....	48
5.9. PROTOCOL DE SUPERVISIÓ.....	48
5.10. EUTANÀSIA.....	48
5.11. OBTENCIÓ DE MOSTRES.....	49
5.12. GRUPS EXPERIMENTALS I PROCEDIMENT.....	50
5.13. ESTUDI HISTOLÒGIC.....	51
5.14. ESTUDI IMMUNOHISTOLÒGIC.....	51
5.15. TESTS D'INDENTACIÓ.....	52

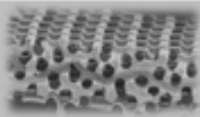
Treball N° 2

5.1. PREPARACIÓ DE LES Matrius de suport.....	53
5.2. GRUPS EXPERIMENTALS I PROCEDIMENT.....	53
5.3. PROTOCOL QUIRÚRGIC I D'ESTABULACIÓ.....	54
5.4. ANÀLISI MACROSCÒPIC.....	54
5.5. ESTUDI HISTOLÒGIC.....	55
5.6. ESTUDI IMMUNOHISTOLÒGIC.....	55



SUMARI

6. RESULTATS.....	57
<u>Treball nº 1</u>.....	58
6.1. ESTUDI DE LES MOSTRES IMPLANTADES.....	58
6.2. TEST D'INDENTACIÓ.....	63
<u>Treball nº 2</u>.....	65
6.1. ESTUDI DE LES MOSTRES IMPLANTADES.....	65
6.2. OBSERVACIÓ MACROSCÒPICA.....	66
6.3. ANÀLISI HISTOLÒGIC.....	68
6.4. ANÀLISI IMMUNOHISTOLÒGIC.....	71
7. DISCUSSIÓ.....	75
<u>Treball nº 1</u>.....	75
<u>Treball nº 2</u>.....	79
8. CONCLUSIONS.....	83
8.1. CONCLUSIONS DEL TREBALL Nº 1.....	84
8.2. CONCLUSIONS DEL TREBALL Nº 2.....	86
8.3. NEXE D'UNNIÓ DELS DOS TREBALLS.....	87



9. CÒPIA DELS TREBALLS

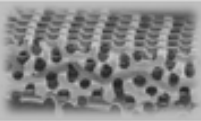
9.1. TREBALL N° 1:

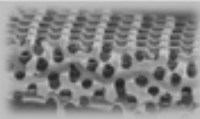
In vivo evaluation of three-dimensional polycaprolactone scaffolds
for cartilage repair in rabbits..... 89

9.2. TREBALL N° 2:

Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic
acid-polycaprolactone scaffolds: A study in vivo.....101

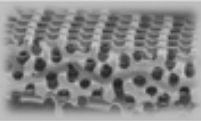
10. BIBLIOGRAFIA..... 115

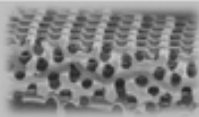




1. LLISTA D'ABREVIACIONS

ACI	Transplantament de condrocits autòlegs
DMEM	Medi de Dulbecco's modificat d'Eagle
FBS	Sèrum fetal boví
ICRS	<i>International Cartilage Repair Society Score</i>
MACI	Transplantament de condrocits autòlegs sobre una matriu sintètica
OAS	<i>Oswestry Arthroscopy Score</i>
PCL	Policaprolactona
PCL-AH	Policaprolactona amb àcid hialurònic





2. RESUM I MOTIVACIÓ

El cartílag hialí articular té una capacitat molt limitada de reparació. Les lesions traumàtiques, l'osteocondritis dissecant i les patologies degeneratives com ara l'artrosi o l'artritis reumatoide entre d'altres, poden provocar lesions condrials severes que causen dolor, rigidesa, disminució de moviment i finalment destrucció de l'articulació. Per a intentar reparar aquest cartílag articular lesionat s'han desenvolupat diferents estratègies terapèutiques:

- tècniques d'estimulació medul·lar o de l'os esponjós (perforacions subcondrials, condroplàstia per abrasió, microfractures)
- mosaicplàsties
- transplantament de periosti o pericondri com a recobriment del cartílag lesionat
- reparació amb cultius de condrocits

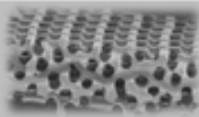
Totes aquestes tècniques tenen 2 importants limitacions:

- condicionades a la localització i grandària del defecte
- relacionades amb el teixit de reparació que es forma

En la majoria dels casos el defecte es repara amb un teixit fibrocartilaginós, amb unes característiques histològiques i biomecàniques diferents a les del cartílag hialí sa (1-3).

Les microfractures no estan indicades en els defectes superficials. En lesions condrials de gruix complet es poden aconseguir reparacions parcials amb un teixit fibrocartilaginós. Aquest teixit és format pel reclutament de cèl·lules pluripotencials mesenquimals de l'os subcondrial subjacent (1-3).

La mosaicplàstia està limitada per la grandària de la lesió i la zona donant escollida. De la zona donant s'obtenen els empelts autòlegs osteocondrials que posteriorment s'implantaran a la zona receptora on es localitza la lesió. S'han aconseguit bons resultats funcionals i histològics, tot i les limitacions que hem comentat. No s'han obtingut bons resultats amb empelts osteocondrials al·logènics (1-3).



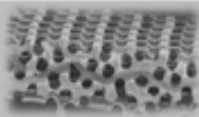
RESUM I MOTIVACIÓ

Fa uns 20 anys es van publicar els primers resultats clínics del transplantament de condrocits autòlegs recoberts amb una capa de periosti (ACI) en humans (4). Actualment els condrocits cultivats també es poden sembrar en una matriu sintètica que serà la que recobrirà el defecte (MACI) (5). Tot i que aquesta tècnica s'ha aplicat amb èxit durant pràcticament 2 dècades, té dos grans inconvenients: cal una gran incisió per a realitzar l'artrotomia que ens permetrà accedir al defecte del cartílag i cal sotmetre al pacient a dos actes quirúrgics. El primer per a l'obtenció de condrocits que s'hauran de cultivar i replicar per al seu posterior transplantament en una segona cirurgia. Alguns estudis han demostrat que els resultats clínics i histològics obtinguts després de 5 anys de la reparació amb ACI són iguals que els resultats obtinguts amb les microfractures (1-3, 5-8).

Darrerament l'enginyeria tissular basada en l'aplicació de condrocits amb el suport d'una bastida o matriu (*scaffold* en anglès), han mostrat resultats esperançadors en la reparació de les lesions condrials. Les matrius de suport poden tenir un paper molt important per a la reparació de lesions condrials mantenint la integritat mecànica del defecte, fent de vehicle de cèl·lules sembrades prèviament i/o servint de suport per a l'adhesió de les cèl·lules pluripotencials (*stem cells*) provinents de l'os subcondrial. S'han testat matrius de suport de diferents materials biodegradables com ara el poliglicòlic, el quitosà, l'àcid polilàctic, la policaprolactona (PCL) i els seus copolímers. Tots aquests materials han demostrat afavorir l'adhesió, la proliferació cel·lular i la producció de la matriu extracel·lular amb cèl·lules com ara: condrocits, osteoblasts i cèl·lules mare pluripotencials (9-12).

Seguint les línies de recerca en la reparació del cartílag articular en models animals que s'havien dut a terme en el Servei de Cirurgia Ortopèdica i Traumatologia de l'Hospital del Mar amb les Tesis Doctorals del Dr. Cebamanos (13) i el Dr. Martín (14, 15), i afegint tècniques d'enginyeria tissular, vam començar a dissenyar els treballs que conformen aquesta tesi.

El grup de recerca en cartílag del Servei de Cirurgia Ortopèdica i Traumatologia de l'Hospital del Mar (Universitat Autònoma de Barcelona) treballa, des de fa uns 15 anys, integrat en la Unitat de Recerca en Fisiologia Òssia i Articular (URFOA) de l'Institut Hospital del Mar d'Investigació Mèdica (IMIM) ubicat al Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) en l'entorn del Parc de Salut Mar. Durant tots aquests anys, en col·laboració amb la Universitat Politècnica de València (UPV), s'han desenvolupat i estudiat *in vitro* una sèrie de suports polimèrics macroporosos, adequats per a ser envaïts per cèl·lules (condrocits autòlegs,



RESUM I MOTIVACIÓ

al·logènics o cèl·lules pluripotencials (*stem cells*) de l'os subcondral) per a la regeneració de defectes del cartílag articular.

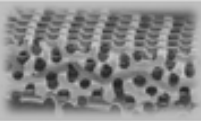
En aquesta línia es van desenvolupar matrius de suport tridimensionals biodegradables de PCL que permeten *in vitro* la invasió i creixement de condrocits cultivats (16-18). El següent pas ha estat valorar la seva capacitat de regeneració *in vivo* de lesions condrials experimentals. Per a aquest motiu es van dissenyar 2 treballs de recerca amb l'objectiu d'avaluar la capacitat de reparació de lesions condrials *in vivo* creades a la tròclea femoral del conill, utilitzant matrius de suport de PCL sembrades o no, amb condrocits al·logènics de conill i comparar-les amb altres tècniques clàssiques.

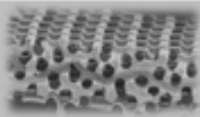
L'objectiu d'aquests treballs ha estat demostrar la utilitat d'aquests suports tridimensionals per a la reparació de lesions condrials en un model animal. L'objectiu final és desenvolupar un nou model de reparació cartilaginosa mitjançant l'enginyeria tissular aplicable a l'esser humà. Així doncs, aquests treballs han estat concebuts per poder avaluar i validar tot el model.

Els esmentats treballs, que han estat ja publicats en revistes internacionals, són doncs la base d'aquesta tesi en el format de compendi de publicacions recomanat per la Universitat Autònoma de Barcelona.

En els prolegòmens d'aquesta tesi es pretén fer una actualització del coneixement de la fisiologia i patologia del cartílag articular hialí i dels diferents tractaments que s'han emprat històricament per tractar la seva lesió. S'emfatitza en les alternatives terapèutiques més actuals, fonamentades en l'enginyeria de teixits i, molt especialment, en les relacionades amb les matrius de suport de PCL que hem utilitzat en els nostres treballs.

Finalment s'exposaran els resultats i conclusions obtinguts, dels 2 articles que conformen aquesta tesi per compendi de publicacions.





3. INTRODUCCIÓ

3.1. DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DE LES ARTICULACIONS

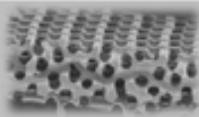
A l'esquelet cartilaginós humà, constituït per una estructura continua, apareix al voltant de la sisena setmana una condensació cel·lular denominada interzona homogènia la qual correspondrà a la futura articulació (19). Aquestes cèl·lules segreguen una substància intercel·lular (sulfat de condroitina) que les separa, apareixent tres zones: dos paral·leles, oposades i d'alt poder condrogènic, cadascuna de les quals actua com a una zona de creixement per aposició del cartílag adjacent i es continua en la perifèria de l'articulació amb el pericondri; i una zona intermèdia menys densa.

Per a la total diferenciació d'una veritable articulació és necessària l'aparició d'altres elements com la càpsula articular i la membrana sinovial. La càpsula articular deriva de la zona de interfase entre la capa mitja i profunda del mesoderm que, a la vegada, dóna origen al pericondri i al periosti permeten d'aquesta manera establir una continuïtat amb els teixits tous i ossos adjacents. La sinovial articular és constituïda per les cèl·lules mesènquimals de la porció més perifèrica de la zona intermèdia que es troba envaïda per vasos i macròfags. Pel contrari la porció central roman habitualment avascular i juga un paper important en la formació de l'articulació (19).

A l'articulació del genoll, els meniscos i els lligaments encreuats apareixen ulteriorment com a condensacions de la capa intermèdia del mesoderm (20).

La formació de la cavitat articular o procés de cavitació, té el seu origen en la porció central de la interzona i s'expandeix ràpidament a la resta de porcions. Aquestes pateixen un procés de liquèfacció per acció enzimàtica i de necrosi cel·lular (21).

D'altra banda, el moviment resulta essencial per al desenvolupament i manteniment de les articulacions. Si bé el paper del moviment ha estat font de controvèrsia, diferents autors han aconseguit provocar fusions cartilaginoses o formació de teixit fibrós mitjançant la paràlisi del



membre (22, 23); pel contrari, altres han aconseguit l'aparició precoç d'una articulació mitjançant procediments d'estimulació del moviment (24).

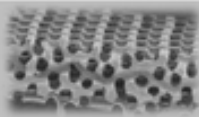
3.2. EL CARTÍLAG ARTICULAR

El cartílag és una varietat del teixit conjuntiu que està present en nombroses localitzacions del cos. Es classifica en 3 variants segons la seva composició histològica: cartílag elàstic, fibrocartílag i cartílag hialí. A la fase embrionària existeix una quarta varietat, el cartílag epitelioides, que deriva del mesènquima i que madurarà cap a les altres variants en funció de la seva localització i funció (25).

El cartílag articular és una variant especial de cartílag hialí, és un teixit sense vasos ni nervis que recobreix l'os a l'interior de l'articulació sinovial. Es tracta de la variant més abundant de cartílag. Macroscòpicament té un aspecte blanc anacarat. Està compost per cèl·lules (condròcits), col·locades en cel·les individuals, i substància intercel·lular o matriu extracel·lular, que engloba aquestes cèl·lules (26).

Els condròcits ocupen un escàs volum, variable segons els autors (26, 27), que representa menys del 10 % del volum total, i té per funció mantenir el control del metabolisme del cartílag mitjançant processos d'anabolisme (conservació de la homeòstasi i integritat del medi intern) i catabolisme (neteja de l'entorn de detritus). Són els encarregats de la producció i manteniment de la substància intercel·lular o matriu extracel·lular. Els condròcits tendeixen a formar petits grups i la seva matriu extracel·lular és rica en col·lagen tipus II.

La matriu extracel·lular està constituïda per una estructura de col·lagen (denominada matriu fibril·lar) encarregada de la textura i rigidesa, que envolta a la substància fonamental (denominada interfibril·lar), rica en aigua i proteoglicans. Aquesta darrera ocupa per tant l'espai lliure que deixen les cèl·lules i les fibres, i la seva funció és la de conferir elasticitat al cartílag articular (28).



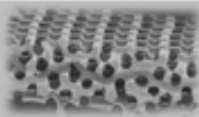
3.3. COMPOSICIÓ DEL CARTÍLAG ARTICULAR

3.3.1. CONDRÒCITS

Al igual que la majoria de les cèl·lules mesenquimals, el condrocit es rodeja de la seva matriu extracel·lular i no contacta amb les cèl·lules veïnes. La síntesi de la matriu es realitza en el reticle endoplasmàtic rugós i l'aparell de Golgi (28).

La funció dels condrocits està influenciada pels canvis que es produeixen en la matriu, de manera que les alteracions en la concentració de proteoglicans i altres constituents, determinen la seva actuació. S'ha especulat que el mecanisme desencadenant pot ser la transmissió mecànica dels canvis de pressió en la membrana cel·lular i això podria explicar la necessitat d'aplicació de càrregues com a element regulador de la qualitat del cartílag reparat. Un altre factor és l'edat i s'observa que amb la maduració disminueix la síntesi de matriu i també la cel·lularitat, per la qual cosa existeix una menor capacitat de reparació (29).

Estudis experimentals *in vitro* indiquen que els condrocits procedents de cultius d'articulacions artròsiques mostren una morfologia diferent als dels que s'originen de teixit sa i presenten també alteracions en l'expressió de determinats gens (30, 31). És important establir el paper que duu a terme l'ambient on es desenvolupen els condrocits per a comprendre la modulació de la biosíntesi i el manteniment del cartílag. Si bé els canvis en el tipus de col·lagen i en la seva proporció respecte als proteoglicans poden no ser la causa última de l'artrosi o de l'artritis, la identificació de les condicions ambientals responsables d'aquests canvis si que poden aportar important informació per trobar sistemes capaços d'estabilitzar l'alteració articular i, com a conseqüència, poder prevenir tant els canvis degeneratius com els inflamatoris.

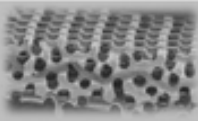


3.3.2. LA MATRIU CARTÍLAGINOSA

Com la major part dels teixits del cos humà, el cartílag hialí està altament hidratat: el seu contingut en aigua oscil·la entre el 75 i el 80 % depenen de nombrosos factors. L'aigua però no té en el cartílag una funció merament estructural o de suport de les relacions i reaccions metabòliques de les cèl·lules, sinó que va més enllà. Intervé activament i és causa directa de la gran capacitat d'aquest teixit per a complir la seva funció biològica: absorbir impactes i impedir el desgast que es produiria per la fricció directa de les superfícies òssies.

La gran capacitat del cartílag per amortir impactes i suportar la fricció continua és el resultat de les propietats mecàniques de la matriu extracel·lular segregada i mantinguda contínuament pels condrocits. Aquesta matriu extracel·lular està composta per macromolècules, que formen una unitat funcional que adquireix coherència mitjançant la unió, química o purament mecànica, d'un gran nombre d'aquestes. Entre aquestes macromolècules, la més abundant i característica del cartílag hialí és sense dubte el col·lagen tipus II. Altre component fonamental per la seva abundància és un gran proteoglicà amb funció agregant denominat agregà (32-33).

A part d'aquestes dues substàncies, el cartílag hialí inclou en la seva composició col·làgens d'altres tipus, diverses classes de proteoglicans sulfatats i proteïnes d'unió, a més d'àcid hialurònic i altres components menys abundants, encara que no per això menys importants, com són els biglicans, decorina, fibromodulina, fibronectina, perlecà o lípids. L'entramat tridimensional d'aquestes macromolècules resulta complex; justament en aquesta complexitat radica la perfecció d'aquesta matriu per amortir impactes i suportar la fricció (33).



INTRODUCCIÓ

3.3.3. AIGUA

L'aigua constitueix aproximadament entre un 60 i un 80 % del pes del cartílag. La major quantitat es troba en l'espai extracel·lular i forma part del gel que dona suport al col·lagen i als proteoglicans. També es troba, encara que en escassa quantitat, dintre de la cèl·lula on participa en la difusió de nutrients (2).

3.3.4. COL·LAGEN

Representa aproximadament un 20 % del pes total del cartílag articular i li confereix la seva estructura i rigidesa. Tal com succeeix a d'altres teixits, en el cartílag articular hi ha diversos tipus de col·lagen, sent el fonamental el tipus II amb un percentatge del 95 %. El 5 % restant està format pels tipus IX, X i XI, i en menor quantitat pels tipus I, III, V, VI i VII. Les molècules de col·lagen estan constituïdes per tres cadenes de polipèptids, l'estructura primària de les quals és simple i repetitiva per a formar una hèlix tancada (1, 2, 9, 10).

3.3.5. PROTEOGLICANS

Són complexes que existeixen com a monòmers o com agregats units a l'àcid hialurònic. Els glucosaminoglicans, que constitueixen el 95 % dels proteoglicans són el condroitín i el queratín sulfat.

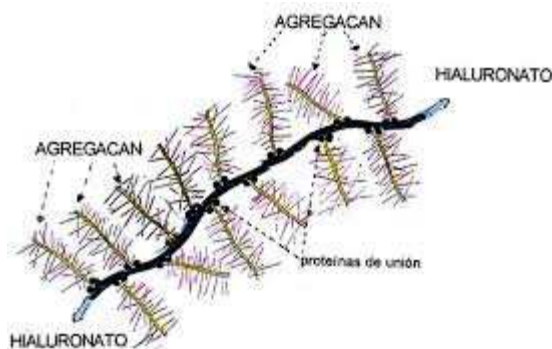
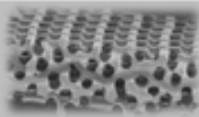


Figura 1. Estructura tridimensional d'un proteoglicà.



INTRODUCCIÓ

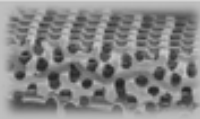
Les cadenes de glucosaminoglicans estan dotades d'un gran nombre de càrregues negatives el que els hi confereix característiques físiques importants, tant pel seu comportament hidrofílic i la capacitat de repel·lir-se entre elles, com per a la interrelació amb les fibres de col·lagen tipus II. Aquesta relació està íntimament lligada a la difusió de l'aigua a través de la matriu extracel·lular, el seu equilibri determinarà les propietats físiques del cartílag i la seva funció mecànica (1, 2).

3.3.6. ÀCID HIALURÒNIC

És un polisacàrid lineal format per milers d'unions d'àcid glucorònic i de N-acetilglucosamina que li confereixen les seves característiques viscoses i elàstiques. Una vegada els proteoglicans són segregats pels condrocits aquestes molècules serien lliures de migrar a través de la matriu i difondre fins l'espai articular, la seva capacitat d'agregar-se específicament amb les cadenes d'àcid hialurònic les immobilitza dintre de la matriu. Per aquesta raó l'àcid hialurònic té un destacat paper en l'organització de la matriu cartilaginosa i per tant en les seves característiques biomecàniques. Els condrocits disposen de receptors de membrana CD44 per a l'àcid hialurònic que sembla que intervenen en processos anabòlics i catabòlics del cartílag articular (34).

3.3.7. FUNCIONS DELS COMPONENTS DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR

Existeixen una gran quantitat de molècules presents en el cartílag hialí, algunes de les quals encara està començant a comprendre's. És sabut que els components de la matriu extracel·lular no funcionen exclusivament com a un suport estructural inert, sinó que tenen també gran importància en el control del comportament cel·lular. En el cas del cartílag articular, el col·lagen tipus II, que és el seu principal constituent manté una influència molt acusada en la diferenciació dels condrocits, de manera que una matriu sana contribueix de forma definitiva al manteniment d'un fenotip cel·lular normal (1, 2, 9, 10).



INTRODUCCIÓ

El fenotip dels condrocits pot veure's alterat tot depenen de les condicions d'aquesta matriu i aquestes alteracions, representen un paper definitiu en la patogènia de determinades malalties articulars (1, 2, 9, 10).

3.4. ESTRUCTURA DEL CARTÍLAG ARTICULAR

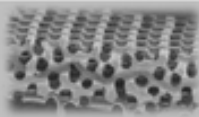
Amb l'ajut del microscopi òptic i l'electrònic de transmissió s'han establert de manera clàssica quatre capes o estrats en l'estructura del cartílag articular madur.

1. Capa superficial o tangencial

Ocupa al voltant d'un 3 % del cartílag hialí. Adjacent a la cavitat i formada per condrocits aplanats o ovals, paral·lels a la superfície amb escassa activitat, i fines fibres tangencials de col·lagen associades a proteoglicans que van a suportar l'estrès de cisallament durant el moviment articular. Aquesta zona més superficial s'ha denominat clàssicament *lamina splendens*. Proporciona al cartílag articular una superfície de molt baixa fricció.

2. Capa intermèdia o transicional

Forma aproximadament un 5 % del gruix del cartílag hialí. Per tant és de major volum que la capa superficial. Constituïda per condrocits més arrodonits, disposats irregularment i fibres de col·lagen que adopten majoritàriament una disposició obliqua a la superfície.



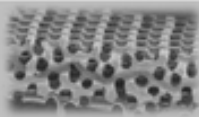
INTRODUCCIÓ

3. Capa profunda o radial

És la capa de major gruix formant pràcticament el 90 % del cartílag hialí. Constituïda per condrocits arrodonits disposats en columnes i fibres mes gruixudes, paral·leles entre si i perpendiculars o obliqües a la superfície òssia, amb una funció de distribució de les forces de compressió. El contingut en aigua és menor que en les anteriors i major el percentatge de proteoglicans. Es divideix en 2 parts atenen a la organització dels condrocits: la superior (on els condrocits apareixen aïllats) i la inferior (on els condrocits formen grups de 3 ó 4 cèl·lules amb estructura columnar, els denominats "condrons"). En aquesta capa les fibres de col·lagen de la matriu es troben organitzades de forma perpendicular a la superfície interposant-se com a septes entre les columnes de condrocits. L'orientació vertical d'aquesta xarxa comença a l'interval cartílag-os i continua a través de la zona de cartílag calcificat i la zona radial. Aquestes fibril·les comencen a corbar-se ja en la zona de transició, assumint una orientació tangencial respecte a la superfície del cartílag articular.

4. Capa calcificada

Constitueix el 2-3% del gruix del cartílag articular. En aquesta capa, a la matriu trobem dipòsits d'hidroxiapatita i els condrocits adopten una disposició en columnes verticals cap a la superfície articular. És adjacent a l'os subcondral i es veu separada de la capa profunda o radial per una línia basòfila denominada clàssicament front de calcificació o *tidemark* (35). Aquest front de calcificació té la tendència a progressar dins la capa més superficial del cartílag hialí veient-se frenat per a l'activitat inhibidora dels condrocits adjacents. Aquesta capa també té la funció de fixar el cartílag a l'os subcondral.



INTRODUCCIÓ

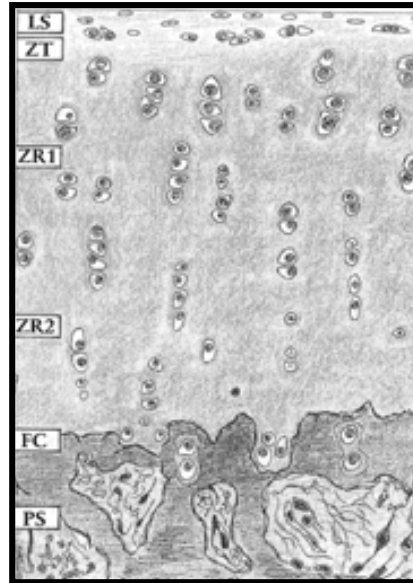
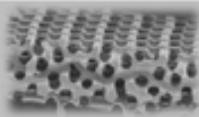


Figura 2. Imatge esquemàtica de l'estructura cel·lular del cartílag hialí madur. **LS:** *lamina splendens*; **ZT:** zona tangencial; **ZR1:** zona radial superior; **ZR2:** zona radial inferior; **FC:** front de calcificació; i **PS:** placa subcondral.

Disposició de les fibres de col·lagen.

La disposició de les fibres de col·lagen, formada fonamentalment com s'ha comentat per col·lagen de tipus II, fou descrita inicialment per Hunter al 1743 (36) com a un sistema radial de fibres perpendiculars a la superfície. Benninghoff al 1925 (37), amb l'ajut del microscopi de llum polaritzada, va descriure les famoses arcades de direcció radial recobertes per una capa tangencial superficial. MacConaill al 1951 (38) introdueix una modificació i descriu un sistema de fibres obliqües i entrelaçades recobertes per la controvertida *lamina splendens*. Posteriorment, amb l'aportació de la microscòpia electrònica (transmissió-escombratge), s'han corroborat les descripcions clàssiques i, més recentment al 1990, Clark (39) mitjançant mètodes de criofractura ha observat que la capa tangencial es continua amb les fibres de la capa radial, observació semblant al model prèviament descrit per Benninghoff.



INTRODUCCIÓ

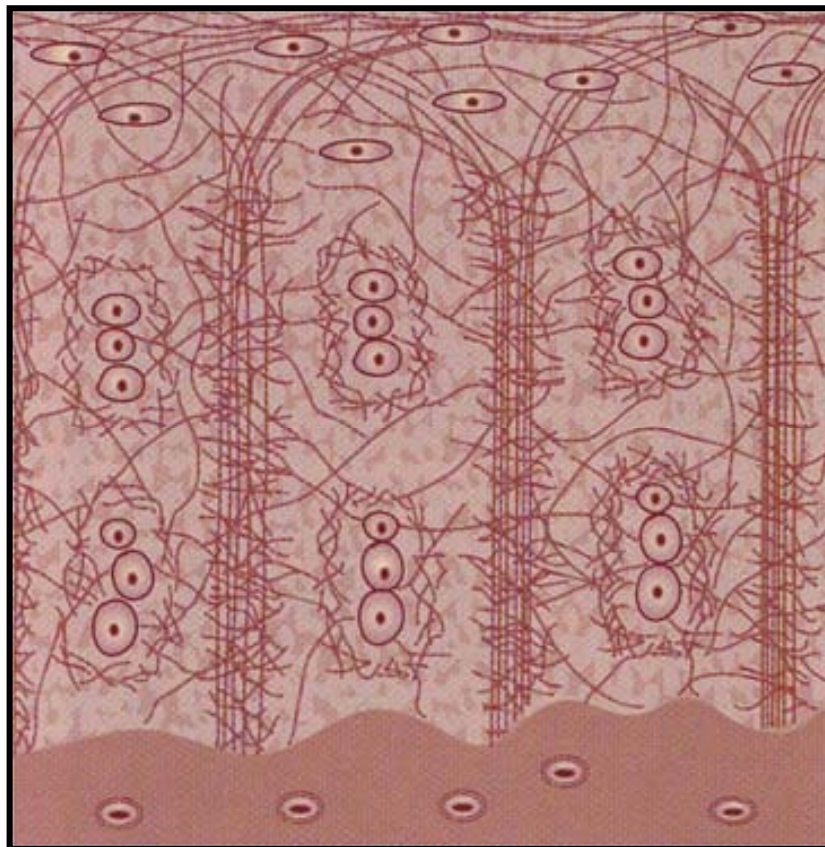


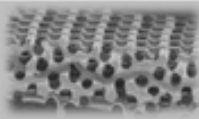
Figura 3. Esquema del cartílag hialí on s'aprecia la disposició de les cèl·lules i fibres de col·lagen.

3.5. FISIOPATOLOGIA DEL CARTÍLAG ARTICULAR

3.5.1. NUTRICIÓ

En el moment actual, malgrat les nombroses investigacions realitzades, la nutrició del cartílag articular segueix sent objecte de discussió. Tant la via sinovial, com la vascular òssia sembla que actuen en el metabolisme del cartílag articular.

Diversos factors poden contribuir a explicar aquestes diferències d'opinió i tal vegada fer compatibles ambdues teories.



INTRODUCCIÓ

A favor de la teoria de la nutrició sinovial s'han de considerar fenòmens com: a) l'efecte de bombeig, provocat pel moviment i la càrrega articular alternativa amb fases de repòs; b) la gran superfície de cartílag articular en contacte amb la membrana sinovial; c) la supervivència del cartílag dels cossos lliures d'origen cartilaginós articulars (per exemple en el fragments osteocondrals lliures que es desprenen a l'articulació); i d) la impossibilitat de pas de diferents substàncies a través de l'os subcondral, quan s'ha assolit la maduració esquelètica, per l'acció de barrera de la capa de calcificació (40, 41).

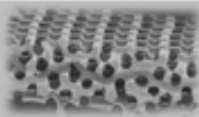
A favor de la teoria de nutrició sanguínia a partir de l'os subcondral trobem alguns fets clínics: a) quan es realitzen sinoviectomies el cartílag segueix viu; b) la persistència de canals vasculars en grans mamífers després de la maduració i que, per tant, nodreixen capes més profundes del cartílag; i c) l'aparició de canvis artròsics quan es desvascularitza l'os subcondral (42, 43).

Per tant, és possible que ambdues teories siguin vàlides i complementàries, considerant en primer lloc la via sinovial com a principal medi d'aportació de nutrients al cartílag hialí i acceptant l'existència de la via vascular amb una funció secundària. Donada l'absència de vasos dintre del cartílag articular, el transport de nutrients a través del mateix fins arribar al condrocit pot realitzar-se per tres mecanismes: 1) difusió, 2) convecció i 3) una combinació d'ambdues. El mecanisme de convecció està produït pel flux de líquids intersticials, quan el cartílag es deforma en sotmetre'l a càrrega o quan es realitza una mobilització (1-3, 41).

3.5.2. COMPORTAMENT MECÀNIC

El comportament d'un material o teixit sotmès a l'acció d'una força, reflecteix les seves propietats biomecàniques. Aquest pot trobar-se fix o en moviment. L'aplicació d'una força en una determinada unitat de superfície constitueix el denominat estrès.

L'aplicació d'una força pot tenir lloc en compressió, en tensió (distracció), fricció i cisallament (tangencial). La resposta s'expressarà per un coeficient o mòdul d'elongació i de



INTRODUCCIÓ

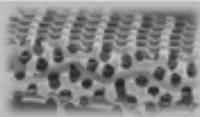
cisallament. Quan s'afegeix el factor temps a l'aplicar la força podem trobar una resposta que depèn o no d'ell. Si no existeix relació obtindrem bé una deformació reversible (elasticitat) o pel contrari una deformació irreversible (plasticitat). En canvi, quan la resposta sí guarda relació amb el temps i té lloc en dos fases, direm que aquell teixit presenta una propietat denominada viscoelasticitat (14).

A les articulacions de càrrega, com el genoll, durant la marxa el cartílag articular es veu sotmès a pressions de magnitud variable. L'aplicació d'aquestes pressions es dona en petites àrees que es van desplaçant al llarg de tota la superfície articular, a mesura que l'articulació es mou, provocant un considerable estrès. Les fibres de col·lagen i els proteoglicans donen al cartílag una ultraestructura que li confereix la seva consistència elàstica. Els cisallaments i friccions als que està sotmès el cartílag són absorbits per les fibres de col·lagen, mentre que les sol·licitacions verticals, de compressió, ho són pels proteoglicans (14).

3.5.3. RESPOSTA VISCOELÀSTICA DEL CARTÍLAG ARTICULAR

El cartílag articular posseeix aquesta propietat biomecànica i així presenta una resposta variable quan està sotmès a una pressió o deformació constant. Aquesta resposta és doble, davant una pressió constant es produeix una compressió i davant una deformació constant es produeix una relaxació o estirament. Aquests fenòmens es produeixen en una primera fase, de forma instantània i en una segona fase de forma progressivament lenta (1-3, 13, 14).

Aquesta resposta o comportament viscoelàstic es produeix pel flux inicial del fluid intersticial, l'aigua continguda a la matriu. Aquest flux determina, per la seva banda, un moviment de les macromolècules que originen un nou flux independent o intrínsec i per tant la resposta és de tipus bifàsic. En primer terme, quan el cartílag és comprimit, es produeix la seva deformitat motivada per la sortida de líquids intersticials. Aquest procés inicialment és ràpid provocant la deformació, després però es fa més lent, fins que s'atura el flux de líquid. Quan la pressió és elevada, al voltant del 70% del fluid total és exprimit des de la matriu, encara que en el moment que varia la pressió és completament recuperable. Al mateix temps que es produeix



INTRODUCCIÓ

la sortida, per l'estrès aplicat, quan es produeix la relaxació d'aquest estrès en el si del cartílag, es dona lloc a una redistribució del fluid en els porus de la matriu sòlida de col·lagen-proteoglicans (1-3, 13, 14).

El cartílag articular sota tensió també presenta un comportament viscoelàstic, mentre que sota fricció pura (en condicions infinitesimals de tensió) no es produeixen canvis de pressió o volumètrics dintre del teixit, és a dir, no s'indueixen efectes derivats del flux de fluids (13, 14).

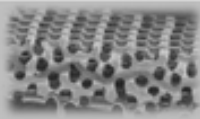
3.5.4. PERMEABILITAT

La permeabilitat és la mesura de la facilitat amb que el fluid pot sortir a través d'un material porós. El cartílag articular té molt baixa permeabilitat, pel que grans forces de resistència friccional són generades quan els fluids surten a través dels porus de la matriu del teixit. Quan les forces de compressió són elevades la permeabilitat disminueix exponencialment. Disminueix el diàmetre del porus dintre de la matriu sòlida, augmenta la resistència friccional i per tant disminueix la permeabilitat (1-3, 13, 14).

3.5.5. RELACIÓ ENTRE MORFOLOGIA I SOLICITACIONS

L'estructura i composició del cartílag articular permet l'absorció i transmissió de càrregues fins l'os subcondral, mentre que la superfície actua de suport. La distribució de les sol·licitacions en un material està relacionada amb el seu gruix i amb el grau de deformació davant la càrrega. La deformitat és inversament proporcional al gruix, fins un nivell de càrrega a partir del qual aquesta relació es perd.

El gruix del cartílag és inversament proporcional a la congruència articular (44) i per tant aquelles articulacions d'elevada incongruència presenten un cartílag més gruixut. En aquestes la deformació és major, amb objecte d'incrementar la seva àrea quan s'aplica càrrega. Finalment, l'absència de cartílag articular provoca una càrrega molt important a l'os subcondral, que pot arribar a patir fractures per sobrecàrrega.



3.6. RESPOSTA DEL CARTÍLAG ARTICULAR DAVANT ALTERACIONS I LESIONS MECÀNIQUES

Existeixen diferents situacions i procediments capaços de provocar una alteració histològica en el cartílag articular. Aquest procés, si bé és diferent en les seves fases inicials, presenta un únic final, i la seva traducció és l'alteració de la capacitat de resposta a les sol·licitacions mecàniques.

A continuació analitzarem aquesta resposta, quan el cartílag es sotmès a agressions de caràcter físic.

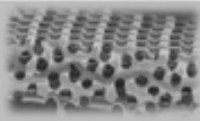
3.6.1. IMMOBILITZACIÓ – COMPRESSIÓ

Les propietats físiques del cartílag articular són degudes com hem vist a la resposta viscoelàstica que exhibeix quan es sotmès a càrregues i deformacions durant l'activitat articular. Aquest tipus de resposta permet el pas d'electròlits i nutrients a través del teixit. Pel contrari, quan s'immobilitza una articulació o es sotmet a una compressió constant, es produeix un deteriorament del cartílag articular, que té lloc en tres estadis:

Estadi I. Necrosis superficial, el cartílag es torna tou i els condrocits canvien la seva forma i s'agrupen en nius. Macroscòpicament es tradueix per una coloració groguenca.

Estadi II. Hi ha una pèrdua del gruix del cartílag, fonamentalment de la capa superficial.

Estadi III. Existeix una pèrdua total del gruix fins a arribar a l'os subcondral.



INTRODUCCIÓ

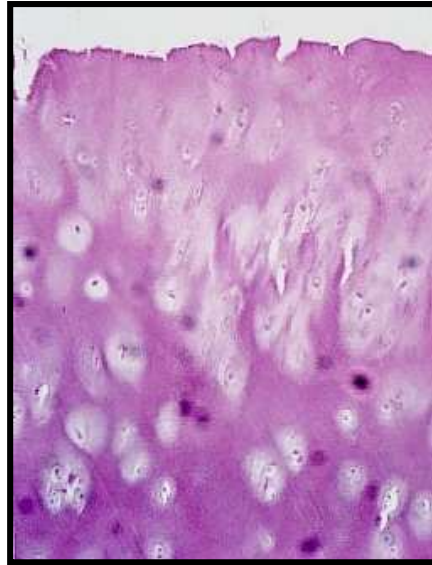
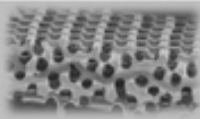


Figura 4. Secció de microscòpia òptica tenyida amb hematoxilina-eosina on podem observar un cartílag articular amb signes degeneratius (fibril·lació de la superfície, anòmala disposició cel·lular i formació de nius). Imatge reproduïda amb l'autorització del Dr. J. Cebamanos (13).

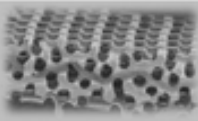
Diversos estudis han demostrat al llarg de la història, que l'afectació del cartílag quan es sotmet l'articulació a compressió és major a la zona d'aplicació de la càrrega i menor a la zona lliure (45-47). Pel contrari, a les articulacions immobilitzades, la zona de contacte articular presenta un menor grau d'afectació que a les zones lliures (13).



3.6.2. IMPACTES REPETITS

L'aparició de dolors articulars després de traumatismes directes sobre articulacions ha estat motiu constant de consulta per part dels pacients. Paradoxalment l'absència d'una fractura visible en l'estudi radiològic ha menyspreat aquesta situació i ha resultat d'escàs interès pels metges i investigadors en la recerca d'una explicació per aquesta problemàtica. C. Ficat (48) i posteriorment P. Ficat (49, 50) van ser dels els primers en relacionar el traumatisme per impacte articular i l'aparició ulterior del procés degeneratiu.

L'anàlisi d'una ampla sèrie de treballs confirma que els traumatismes per impacte, (simple o repetitiu) quan la força és suficient, són capaços de produir una degeneració del cartílag articular, que pot arribar fins la capa calcificada i l'os subcondral al igual que s'observa a l'artrosi, si bé la mobilitat articular precoç de forma controlada pot tenir un efecte reparador (51-54).

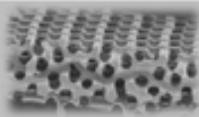


3.6.3. LESIONS PER PENETRACIÓ

La capacitat de reparació intrínseca del cartílag lesionat ha estat objecte de nombrosos estudis al llarg de la història i ha provocat també certa controvèrsia. Per a una millor sistematització dividirem les lesions en dos grups:

- a) **Superficials:** afecten tan sols al cartílag sense arribar a l'os subcondral i

- b) **Profundes:** afecten al cartílag i a l'os subcondral.



3.6.3.1. PENETRACIÓ SUPERFICIAL (CONDRAI)

Tres són els procediments que, de manera experimental, han estat emprats per tal de reproduir lesions superficials: escarificació, afaitat i creació de defectes superficials.

a) Escarificació

Aquest procediment consisteix en la realització de múltiples talls a la superfície del cartílag, sense penetrar la unió osteocondral. En els diversos estudis s'evidencia la síntesi de col·lagen, glucosaminoglicans i el reclutament de condrocits sobre tot en les zones profundes, sense evidenciar-ne cap procés de reparació i sense signes degeneratius en el cartílag veí (55-58).

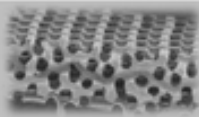
b) Afaitat

El terme "afaitat del cartílag articular" (*shaving* anglès) defineix una de les tècniques habituals de tractament de les lesions condrales que es fan servir en la cirurgia artroscòpica. Aquest procediment consisteix en la escissió parcial i posada a pla de lesions cartilaginoses, mitjançant la utilització d'una fresa motoritzada o, més recentment, d'emissors de radiofreqüència. L'objectiu és aconseguir una superfície articular el més congruent possible i evitar el despreniment de petits fragment condrales desvitalitzats (1-3).

Estudis clàssics que presenten els resultats dels pacients als que s'ha practicat aquesta tècnica per via artroscòpica (59) reflecteixen l'absència de reparació de la superfície articular, amb un augment de la fibril·lació i necrosi, i un deteriorament progressiu del cartílag adjacent (1-3).

c) Defectes superficials

La creació de defectes superficials en el cartílag articular d'animals d'experimentació ha estat realitzada per diversos investigadors, observant tots ells una absència de capacitat reparadora per part de les cèl·lules cartilaginoses, independentment de l'edat o el grau de maduració de l'animal (60-64).

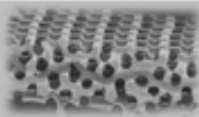


3.6.3.2. PENETRACIÓ PROFUNDA (OSTEOCONDRALE)

Un escenari totalment diferent apareix quan es realitzen defectes profunds, que inclouen l'os subcondral. En aquesta situació molts estudis coincideixen en l'aparició d'un procés reparador. Aquest procés té per objectiu reomplir el defecte amb un nou teixit de reparació, que en les fases inicials presenta un cert potencial, però que amb el decurs del temps pateix un deteriorament progressiu i acaba per transformar-se en un teixit fibrós o fibrocartilaginós. Així doncs semblen mantenir-se els postulats enunciats al segle XVIII per Hunter (36), sobre la incapacitat del cartílag d'obtenir una reparació de la seva superfície un cop lesionat ("*once destroyed it never heals*") (1-3, 36).

Cap dels tractaments actuals no ha aconseguit la reparació *ad integrum* del cartílag articular lesionat. Diverses línies de recerca però, intenten aconseguir les millors condicions per la regeneració del cartílag, amb l'objectiu de potenciar el procés de reparació natural i poder així deixar al marge els suposats processos reconstructors (1, 2, 9, 10).

Varies són les qüestions plantejades pels investigadors: mecanisme i naturalesa del teixit de reparació; grandària i localització del defecte; efecte de la mobilització i els seus diferents procediments; paper de la matriu òssia i, també, el model experimental emprat (tipus d'animal i grau de maduració).

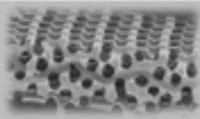


3.7. MECANISME DE REPARACIÓ

La seva existència sembla acceptada per tots els autors i té lloc a partir de la profunditat, és a dir, des de l'os subcondral. La creació d'un defecte lesionant l'os subcondral, actua de manera semblant a com ho fa després d'una fractura. En els primers dies es troba un hematoma parcialment organitzat produït per la ruptura de vasos, que gradualment es transforma en un coàgul ric en fibrina, que conté hematies, leucòcits i elements medul·lars entre els quals es troben les cèl·lules mare pluripotencials (*stem cells*). Amb el creixement de capil·lars procedents del llit vascular el coàgul es transforma en un teixit de reparació de caràcter fibroblàstic, ben vascularitzat. La metaplàsia progressiva d'aquest teixit de granulació fa que es torni més cel·lular i menys vascular. En la profunditat de la lesió la formació d'os és un procés actiu que tendeix a progressar de forma centrípeta cap a la superfície articular, encara que habitualment resta limitat als vells marges entre la capa calcificada i l'os subcondral. La detenció del creixement ossi des de la profunditat pot obeir a la menor presència de vasos i a l'efecte del líquid sinovial procedent de l'articulació. L'absència o presència de capil·lars condicionarà que les cèl·lules osteògenes es diferenciïn en condroblasts o osteoblasts respectivament (1, 2, 9, 10).

3.7.1. NATURALSA DEL TEIXIT DE REPARACIÓ

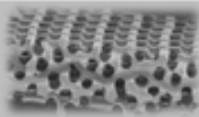
La discussió que ha existit i que encara existeix és condicionada per diferents aspectes. Un dels factors crítics en l'avaluació dels resultats sembla ser el temps. Efectivament, el temps transcorregut des de la reparació fa que l'aspecte microscòpic i l'avaluació histològica del teixit regenerat canviïn de forma significativa. En general però, les observacions a llarg termini (un o dos anys) permeten afirmar el deteriorament del teixit de reparació, que es tradueix bàsicament per un aprimament del neocartílag, amb pèrdua de les característiques microscòpiques de la superfície (1-3, 9, 10).



2.7.2. ACTUACIÓ DE LA MATRIU ÒSSIA

L'actuació de la matriu òssia com a factor inductor del procés de reparació ha estat estudiada al considerar la possibilitat de que contingui factors de creixement i diferenciació, que condicionin la formació d'os i cartílag. Així doncs, en les lesions osteocondrals poden alliberar-se aquests factors, fet que no succeirà amb les lesions estrictament superficials (1-3, 9, 10, 65).

A diferència de les lesions superficials, l'agressió de l'os subcondral desencadena un procés biològic reparador, que si bé no arriba a una restitució del teixit primitiu, permet obtenir en determinades situacions un teixit fibrocartilaginós (*hyaline-like*) (1-3).



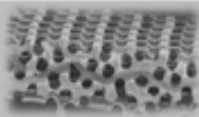
3.8. TRACTAMENT HISTÒRIC DE LES LESIONS DEL CARTÍLAG ARTICULAR

Com ja s'ha comentat prèviament, és ben conegut des de fa més de tres segles que la capacitat de reparació del cartílag articular és pràcticament nul·la i s'assumeix per tant que la degeneració articular és fins a cert punt un procés normal relacionat amb l'envelliment (66, 67). Aquest escàs potencial de curació espontània, junt amb la limitada capacitat de regeneració tissular exhibida pels mètodes tradicionals de tractament, han estimulat recentment un nou abordatge terapèutic basat en el desenvolupament de tècniques de cultiu cel·lular i d'enginyeria tissular que permeten la construcció *in vitro* d'anàlegs del cartílag (16, 17, 68).

Dos són els mecanismes potencials de reparació del cartílag articular i depenen, bàsicament, de la profunditat i l'extensió de la lesió. En aquelles lesions en que la profunditat no arriba a l'os subcondral i, per tant, no existeix aportació sanguínia, la reparació es basa en la capacitat mitòtica dels condrocits, que és certament limitada. Aquest mecanisme es coneix com a reparació intrínseca i rarament és efectiu. Pel contrari en les lesions més extenses, que impliquen tot el gruix del cartílag i arriben a l'os subcondral, el mecanisme de curació es denomina reparació extrínseca. Aquest procediment es fonamenta en el reclutament de cèl·lules pluripotencials mesenquimals (*stem cells*) procedents de l'os subcondral o de la sinovial adjacent, que participen en la formació d'un neoteixit connectiu que pot, o no, experimentar canvis metaplàsics per a formar finalment cartílag articular o, més aviat, fibrocartílag (69).

Basant-se en aquests coneixements, s'han desenvolupat diverses estratègies de tractament quirúrgic encaminades per una part a disminuir la simptomatologia del pacient i per altra a evitar el desenvolupament precoç de processos d'artrosi. Aquests mètodes es poden dividir en dos tipus: mètodes per a la formació d'un neoteixit cartilaginós mitjançant l'estimulació de la medul·la òssia subjacent i els trasplantaments de auto o al·loempelts osteocondrals (70-73).

Dintre del primer grup d'estimulació medul·lar, on es pretén facilitar l'aportació vascular a la zona malmesa des de l'os subcondral, són tractaments habituals: la condroplàstia per abrasió o esponjalització i la realització de perforacions, abans mecanitzades i, més recentment, per microfracturació. En general, aquestes tècniques ofereixen bons resultats



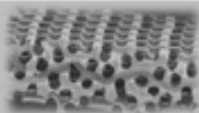
INTRODUCCIÓ

clínic a curt termini, ja que el neoteixit fibrocartilaginós que recobreix el defecte millora la simptomatologia, però com aquest teixit resisteix bé la tensió però no la compressió, els resultats a llarg termini són impredecibles i controvertits (67, 74).

En el segon grup, l'abordatge terapèutic ha consistit en la reparació directa del defecte mitjançant empelts condral o osteocondral autòlegs. Inicialment es tractava d'empelts de molta grandària, que ocasionaven una morbiditat considerable a la zona donant i dificultats per la incorporació a la zona receptora. En els últims anys però, la tècnica ha evolucionat cap a la utilització d'empelts múltiples, de petita grandària, en la tècnica denominada mosaicplàstia. Aquesta tècnica augmenta la taxa d'integració dels empelts i ha resultat útil per a defectes d'una determinada grandària, malauradament s'ha mostrat ineficaç en defectes moderats o grans (76-79).

També s'ha estudiat el potencial condrogènic dels trasplantaments de periosti i pericondri, però la seva utilització en la clínica humana ha estat escassa i, per tant, l'experiència és limitada (13, 80-83).

Els cultius de condrocits ofereixen una alternativa a totes aquestes tècniques (84-86). Donat que la utilització de condrocits heteròlegs pot produir reaccions immunològiques i augmenta el risc de transmissió de malalties infeccioses, els estudis s'han centrat en la implantació de condrocits autòlegs (6). El concepte de trasplantament autòleg de condrocits cultivats (ACI) fou introduït fa més de 20 anys i es va considerar el mètode amb més futur en el tractament de les lesions condral (4). La tècnica consisteix en l'obtenció de cartílag autòleg en una primera cirurgia, que es fragmenta i sotmet a una digestió química, amb el que s'obtenen cèl·lules cartilaginoses aïllades, que després es cultiven en medis específics. Posteriorment aquestes cèl·lules cultivades s'implanten mitjançant cirurgia oberta en el defecte condral, que prèviament ha estat desbridat i es recobreix amb un penjoll de periosti obtingut normalment de la part proximal i medial de la tibia, que es sutura a les vores del defecte i es segella amb cola de fibrina (6, 87-93). Els principals problemes derivats de l'ús d'aquesta tècnica són la necessitat de dues intervencions quirúrgiques, (una per obtenir les cèl·lules cartilaginoses i l'altra per a implantar-les) i la forma de contenir aquests condrocits cultivats a l'interior del defecte (6, 94). Estudis experimentals en gossos han observat que la sutura del penjoll periòstic en el defecte presenta efectes nocius en el cartílag adjacent, com fissures, pèrdua de



INTRODUCCIÓ

proteoglicans i augment de la clonació de condrocits (88). Per això, a l'actualitat s'estan dissenyant nous mètodes d'implantació dels condrocits en el defecte, com la substitució del penjoll de periosti per una membrana de col·lagen sintètica, fixada amb cola de fibrina (95). En l'experiència amb aquesta tècnica, s'ha vist que la capacitat d'orientació espacial dels condrocits és limitada. És per això que, a l'implantar els condrocits en monocapa mitjançant una tècnica ACI, els condrocits no s'organitzen amb les característiques tridimensionals del cartílag hialí sa i finalment es diferencien en un teixit amb característiques de fibrocartílag. Per aquest motiu, es va començar a treballar en la utilització de sistemes de cultiu i implantació tridimensionals de condrocits, amb la finalitat de mantenir la ultraestructura del cartílag hialí sa i que en aquest sentit actués com a modulador del creixement contribuint a mantenir l'estabilitat fenotípica dels condrocits (1-3, 5, 16, 17).

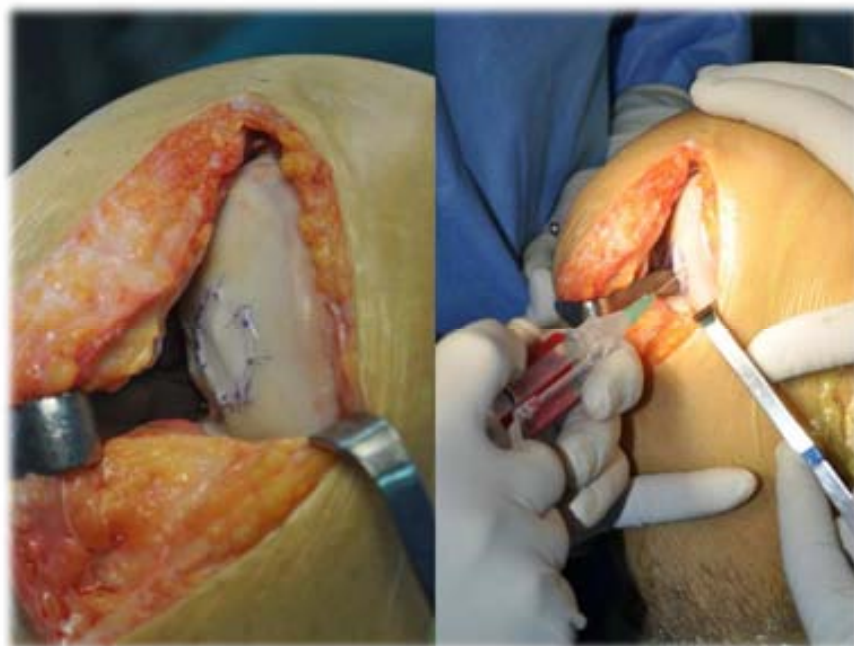
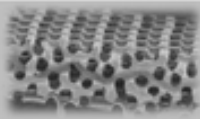


Figura 5. – Fotografies intraoperatòries d'una tècnica d'implantació de condrocits autòlegs per a la reparació d'un defecte al còndil femoral intern del genoll d'un pacient humà. **Imatge de l'esquerra:** Defecte condral en el còndil femoral cobert amb una membrana de col·lagen sintètica suturada al cartílag sa. **Imatge de la dreta:** Introducció dels condrocits cultivats mitjançant una cànula. Fotografies reproduïdes amb l'autorització del Dr. JC Monllau.



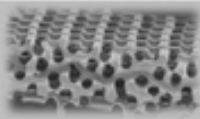
3.9. ENGINYERIA TISSULAR

L'enginyeria tissular és una ciència multidisciplinària que aplica els principis i mètodes de l'enginyeria de materials i la biologia molecular per a el desenvolupament de substitutius que restaurin, reparin, millorin o mantinguin la funció biològica d'un teixit o òrgan danyat (96, 98).

Aquests substitutius biològics estan basats en tres components principals: les cèl·lules, les molècules bioactives i els materials polimèrics tridimensionals, les anomenades matrius de suport o bastides (*scaffolds* en anglès). Les cèl·lules són les encarregades de sintetitzar la matriu extracel·lular del nou teixit i restaurar la funció dels teixits lesionats, mentre que la matriu sintètica de suport ha de proporcionar un ambient favorable per a l'adhesió, proliferació i diferenciació cel·lular. Les molècules bioactives han de facilitar i promoure la regeneració del nou teixit.

La matriu de suport a part de proporcionar una estructura tridimensional temporal on es formarà el nou teixit pot ésser el vehicle que controli l'alliberament de substàncies biològicament actives que afavoreixin el creixement o la diferenciació cel·lular. Aquesta matriu, per a poder dur a terme aquesta varietat de funcions ha de complir alguns requeriments (97, 98):

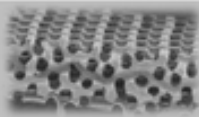
1. Ha de ser biocompatible amb els teixits.
2. Ha de tenir una biodegradabilitat controlada amb la finalitat que el nou teixit substitueixi eventualment a la matriu.
3. No ha d'induir cap resposta adversa a l'organisme.
4. Ha de tenir unes propietats mecàniques adequades segons el tipus d'aplicació.



INTRODUCCIÓ

5. Ha de tenir una porositat i una morfologia apropiada per afavorir el transport de cèl·lules, gasos, metabòlits, nutrients i molècules bioactives tant dintre de la matriu com entre aquesta i el medi circumdant.

L'aportació de l'enginyeria tissular pot ser d'una gran utilitat en el tractament de les lesions cartilaginoses ajudant; a l'elecció del tipus de cèl·lula a utilitzar en el cultiu, a la modificació genètica d'aquesta cèl·lula, a aconseguir una matriu extracel·lular adequada i a proporcionar una adequada fixació del sistema al defecte (69, 99-105). Grande (106) va demostrar que la utilització d'una matriu de suport sintètica, biodegradable, pot ésser un requeriment bàsic per a aconseguir una reparació organitzada i capaç d'omplir d'una forma funcional un defecte cartilaginós.

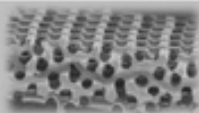


3.10. SUPORTS MACROPOROSOS TRIDIMENSIONALS PER A L'ENGINYERIA TISSULAR DEL CARTÍLAG

La matriu de suport tridimensional utilitzada en l'enginyeria tissular del cartílag, subministra el substrat necessari per a l'ancoratge i la proliferació de condrocits *in vitro*, mantenint la seva funció diferenciada. Una vegada implantada en el lloc de la lesió, aquest suport manté els condrocits en el lloc desitjat mentre produeixen la seva pròpia matriu extracel·lular, donant l'estabilitat mecànica necessària en aquesta etapa, i té la capacitat de degradar-se a mesura que es regenera el cartílag. Tanmateix, aquesta matriu pot ser el vehicle que permet el subministrament controlat d'agents biològicament actius que afegint-se a la matriu s'alliberen de forma controlada per difusió: com són els factors de creixement, pèptids ancorats a la pròpia cadena polimèrica, polisacàrids, glucosaminoglicans, condroitin sulfat, àcid hialurònic, etc (98, 107-109).

S'han fet servir (a nivell de recerca) una important varietat de matrius poroses per al cultiu i transport de condrocits: gels basats en el col·lagen, fibrina, alginat, àcid hialurònic, polímers de la família de àcid polilàctic i poliglicòlic, la policaprolactona, hidrogels de poliòxid d'etilè, copolímers biomimètics que imiten la composició de la matriu extracel·lular, quitosà i altres (98, 106-114).

Alguns detalls tècnics respecte al procediment de cultiu *in vitro* dels condrocits semblen també força importants, com és el cas de la penetració de les cèl·lules cultivades cap a l'interior de la matriu de suport. Els condrocits en cultius estàtics tendeixen a aglomerar-se en la superfície del material de suport (confluència). La penetració de les cèl·lules en el suport es veu afavorida per cultius dinàmics realitzats amb bioreactors. La influència de l'estimulació mecànica del cultiu bé sigui mitjançant pressió hidrostàtica o mitjançant esforços mecànics aplicats a sobre el material de la matriu de suport pot ésser també un factor clau en el manteniment del fenotip dels condrocits en cultiu, tot i que aquest aspecte encara no és suficientment conegut (16, 17, 124-126).



3.11. PRINCIPALS CARACTERÍSTIQUES DE LA POLICAPROLACTONA

La PCL pertany a la família dels polièsters, és un polímer semicristal·lí, amb un baix punt de fusió (60°), una temperatura de transició vítria al voltant dels - 60° i s'obté mitjançant una reacció de polimerització d'obertura d'anell a partir de la ϵ -caprolactona, fent servir com a catalitzador l'octanoat d'estany (16-18, 98, 115).

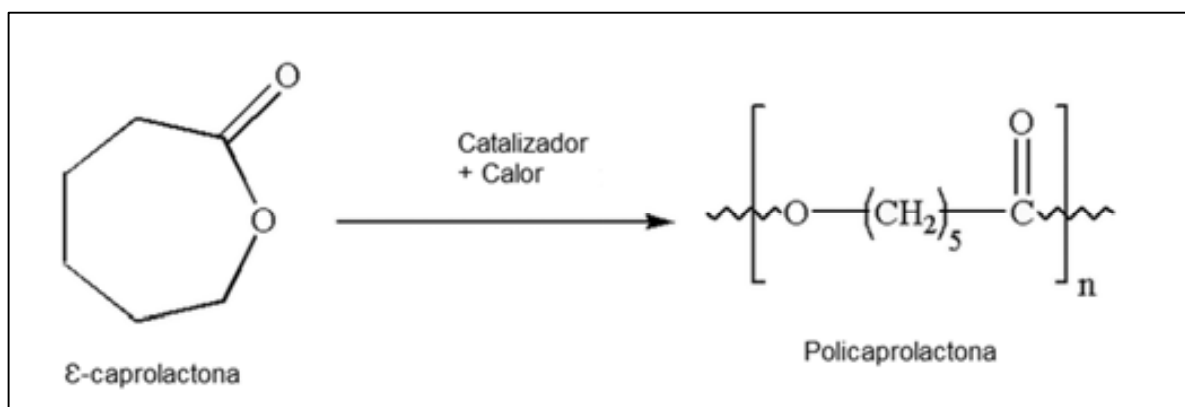
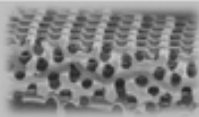


Figura 6. Síntesis per obertura d'anell de la policaprolactona.

L'estructura molecular de la PCL consta d'un grup èster polar i cinc grups metilens amb característiques apolars. La seva biodegradabilitat en medis biològics *in vitro* i *in vivo* és conseqüència de la susceptibilitat dels enllaços èster a la hidròlisi.

La cinètica de degradació de la PCL és més aviat lenta degut a la seva cristal·linitat i a la seva semblança estructural amb les olefines. La completa degradació i eliminació *in vivo* dels homopolímers de poli (caprolactona) poden trigar fins a 2 ó 4 anys. La velocitat de degradació de la PCL es pot incrementar notablement mitjançant copolimerització o a través de la formació de mescles amb polímers hidrofílics com per exemple l'addició d'àcid oleic, amines terciàries, àcid hialurònic, etc (18, 115).

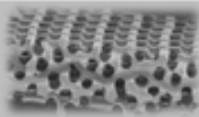


3.12. FONAMENTS PER A LA REALITZACIÓ DELS NOSTRES TREBALLS DE RECERCA

Estudis previs del nostre grup de recerca ens van permetre sintetitzar una sèrie de suports macroporosos de PCL pel cultiu *in vitro* de condrocits (16-18). Es va fer servir per a formar els porus un material polimèric que es dissol després de modelar-los a la PCL que forma la matriu de suport. Els principals avenços tècnics van ser per una banda preparar una sèrie de matrius de suport d'un mateix material, amb diferent grandària de porus i amb distints graus d'interconnexió espacial. I per altra banda, preparar una sèrie homòloga de materials en els que es va variar una característica de la seva estructura química, la hidrofília, mantenint invariable l'arquitectura de l'estructura porosa (16-18, 115, 116). Es troben a la literatura pocs exemples de procediments de preparació de matrius de suport en els que la microestructura porosa no depengui directament del material amb que es fabrica l'esponja i de la tècnica emprada per a generar el porus, com ara les tècniques de preparació de suports utilitzant màquines de prototip ràpid (110-113) o utilitzant com a formador dels porus les esferes de parafina (109). Es van realitzar diversos assajos *in vitro* amb grandària de porus variables, d'entre 80 i 600 μ , fins a posar a punt les matrius de suport per els estudis *in vivo* (16-18, 116).

Aquets dissenys de matrius de suport ens van permetre avançar en la comprensió de la influència de les característiques físiques i químiques del suport sobre l'adhesió cel·lular i la proliferació, i les característiques biològiques dels condrocits cultivats (16-18).

Una vegada es va optimitzar el disseny de les matrius de suport de PCL *in vitro* i es va comprovar la viabilitat de les sembres de condrocits (16, 17), es va considerar que estàvem en disposició tècnica de determinar la viabilitat del procés de regeneració del cartílag en un model d'experimentació animal i comparar-lo amb els cultius habituals en monocapa (tipus ACI). Era necessari valorar la producció de la matriu extracel·lular, el fenotip dels condrocits, la morfologia i biomecànica del teixit resultant, i de la cinètica de reabsorció del suport sintètic *in vivo*. Per aquest motiu es van dissenyar els 2 estudis que conformen aquesta tesi amb la intenció de valorar aquests paràmetres en un model d'experimentació animal.



INTRODUCCIÓ

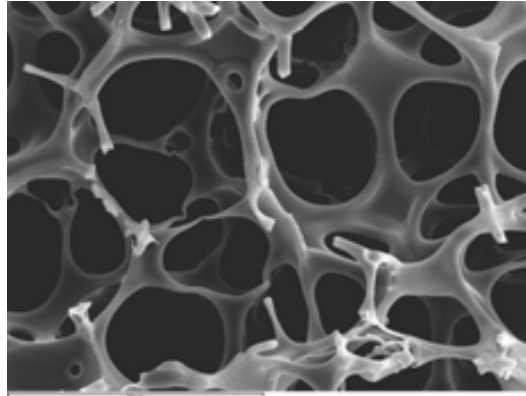
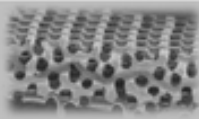


Figura 7. Microfotografia de microscòpia electrònica d'experiments previs amb un suport macroporosos de copolímers de poliacrilat d'etil i polimetacrilat d'hidroxietilè on podem observar com es conformen porus esfèrics bioestables. Marca a peu de foto de 80 micres. Imatge reproduïda amb l'autorització de Carmen Antolinos i el Prof. JL Gómez-Ribelles de la Universitat Politècnica de València.

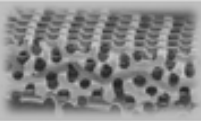
En el treball nº 1 es va demostrar la capacitat de les matrius de suport de PCL sembrades amb condrocits al·logènics de conill de reparar lesions condrials realitzades a la seva tròclea femoral. Amb aquestes matrius de suport es va aconseguir una reparació amb característiques de cartílag hialí sa tant biomecàniques, com histològiques i immunohistològiques. També es va evidenciar que les matrius de suport de PCL no es degradaven completament al final de l'estudi i que milloraven la qualitat del teixit de reparació condrial quan s'implantaven després de realitzar perforacions subcondrials, encara que no estiguessin sembrades amb condrocits. Aquestes matrius de suport no sembrades amb condrocits que es van implantar en lesions condrials amb perforacions subcondrials, van mostrar una reparació atribuïble a la invasió per *stem cells* mesenquimals provinents de l'os subcondrial. Igualment es va observar que les matrius de suport no es degradaven completament i que aquesta invasió per *stem cells* era bastant pobre.

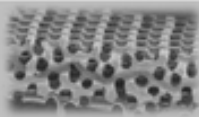
Per aquest motiu es va dissenyar el treball nº 2, on es va estudiar la capacitat de reparar lesions condrials de les matrius de suport de PCL i de les matrius de suport de PCL enriquides amb àcid hialurònic (PCL-AH); sense ser sembrades amb condrocits al·logènics però realitzant perforacions subcondrials per a afavorir la invasió cel·lular per *stem cells*. L'àcid hialurònic és un polisacàrid natural hidrofílic que forma part del cartílag hialí sa i del líquid sinovial. A través del receptor CD44 de la superfície dels condrocits influeix positivament en la proliferació cel·lular, formació de matriu extracel·lular i regulació del fenotip cel·lular a condrocit



INTRODUCCIÓ

(116-119). Com hem comentat anteriorment, la PCL és una substància bastant hidròfoba. En afegir àcid hialurònic a les matrius de PCL es va buscar conferir-lis unes característiques més avantatjoses secundàries al seu perfil hidrofílic. Aquestes característiques cercaven facilitar la invasió sanguínia provinent de l'os subcondral, dotar al medi d'unes característiques similars al cartílag hialí i afavorir la diferenciació cel·lular a condrocits. A més secundàriament es va voler estudiar el ritme de degradació de les matrius de suport; presumiblement les matrius de PCL-AH haviem de degradar-se més ràpidament al ser més hidrofíliques, que les matrius de PCL estàndard (com hem comentat anteriorment la PCL és una molècula bastant hidròfoba). La motivació d'aquesta modificació tècnica va ser demostrar que es podia aconseguir una correcta reparació de les lesions condrials amb matrius de suport de PCL (amb o sense àcid hialurònic) no sembrades prèviament amb condrocits. Això els hi conferiria moltes avantatges a l'hora de ser utilitzades a la pràctica clínica habitual. La més important d'elles seria evitar la cirurgia prèvia per a l'obtenció dels condrocits autòlegs, necessaris per a realitzar els cultius cel·lulars que s'han d'afegir a les matrius de suport abans de ser implantades.



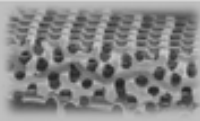


4. HIPÒTESI DE TREBALL

La hipòtesi de treball es basa en 2 estudis relacionats amb la reparació de lesions condrials mitjançant suports macroporosos biodegradables tridimensionals de PCL en el conill com a animal experimental. Es tracta de valorar *in vivo* la reparació de lesions condrials realitzades a la tròclea femoral del genoll del conill amb matrius de suport tridimensional de PCL, comparant-les amb tècniques habituals i validades per a la reparació de lesions condrials.

En el primer article es compara la capacitat de regeneració d'aquestes lesions condrials amb la implantació de matrius de suport de PCL sembrades o no amb condrocits al·logènics de conill i comparant-les amb la reparació que proporciona la sembra de condrocits en monocapa (implantant un pèl·let de condrocits), la reparació amb matrius de suport de PCL sense sembra de condrocits realitzant perforacions subcondrials, la reparació amb matrius de suport de PCL sense sembra de condrocits en absència de perforacions subcondrials i la reparació deixada a una evolució natural d'aquestes lesions realitzant únicament perforacions subcondrials en el defecte creat.

Donat que en el primer treball s'evidencià una millor capacitat de les matrius de suport de PCL no sembrades amb condrocits quan es realitzaven perforacions de l'os subcondrial de reparar les lesions condrials, que les lesions condrials sense cap tipus d'implant deixades a la seva evolució natural i, que la degradació de les matrius implantades *in vivo* no va ser completa al final de l'eutanàsia dels animals, es va dissenyar el segon treball. En aquest segon treball, fruit del segon article que conforma aquesta tesi per compendi de publicacions, es compara la capacitat de reparar lesions condrials de les matrius de suport de PCL estàndard amb les matrius de suport de PCL-AH, ambdues sense ser sembrades amb condrocits. El fonament d'aquest segon treball, es basa en que l'àcid hialurònic, donat que és una substància hidrofílica i que forma part del cartílag hialí, ha de permetre una millor reparació de les lesions condrials i una més ràpida degradació de les matrius de suport de PCL-AH, que les matrius de suport de PCL.

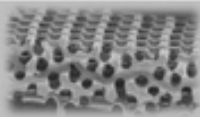


Hipòtesi del treball 1.

Les matrius de suport tridimensional de PCL sembrades amb condrocits al·logènics de conill proporcionen una millor capacitat de reparar les lesions condrials realitzades a la tròclea femoral del conill amb un teixit amb característiques similars al cartílag hialí, que la reparació d'aquesta lesió amb condrocits al·logènics de conill sembrats en monocapa (pèl·let), les matrius de PCL sense condrocits sembrats amb perforacions subcondrials, les matrius de PCL sense condrocits sembrats i sense perforacions subcondrials i que les lesions sense implants ni condrocits al·logènics sembrats amb perforacions subcondrials.

Hipòtesi del treball 2.

Les matrius de suport tridimensional de PCL-AH proporcionen una millor capacitat per a reparar les lesions condrials realitzades a la tròclea femoral del conill i es degraden més ràpidament que les matrius de suport tridimensional de PCL.



5. MATERIAL I MÈTODES

El material i mètodes es correspon amb cadascun dels treballs que formen part d'aquesta tesi per compendi d'articles i que s'adjunten a l'apartat número 9.

Treball n° 1

Martínez-Díaz S, Garcia-Giralt N, Lebourg M, Gómez-Tejedor JA, Vila G, Caceres E, Benito P, Pradas MM, Nogues X, Gómez-Ribelles JL, Monllau JC.

In vivo evaluation of three-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits.

Am J Sports Med. 2010 Mar;38(3):509-19.

5.1. PREPARACIÓ DE LES Matrius DE SUPORT

Es van preparar plantilles poroses de les matrius per aglomeració de microesferes de resines acríliques (Elvacite 2043, Lucite Internacional) a 140°. La porositat de les plantilles es va ajustar sotmetent-les a una determinada compressió. Les matrius de PCL es van obtenir amb la injecció de PCL fosa (Polysciences, Mw=50000) a 110° dins les plantilles fetes a mida mitjançant un efecte de pressió amb gas nitrogen. Més tard es van filtrar les partícules poroses (microesferes acríliques) amb rentats repetits d'etanol. Les matrius resultants tenien una porositat del 70 +/- 2 % amb una bona morfologia i homogeneïtat. El tamany del porus que es va dissenyar va ser d'unes 200 micres.

El diàmetre de les matrius de suport era de 3 mm amb una profunditat d'uns 0,8-1 mm.

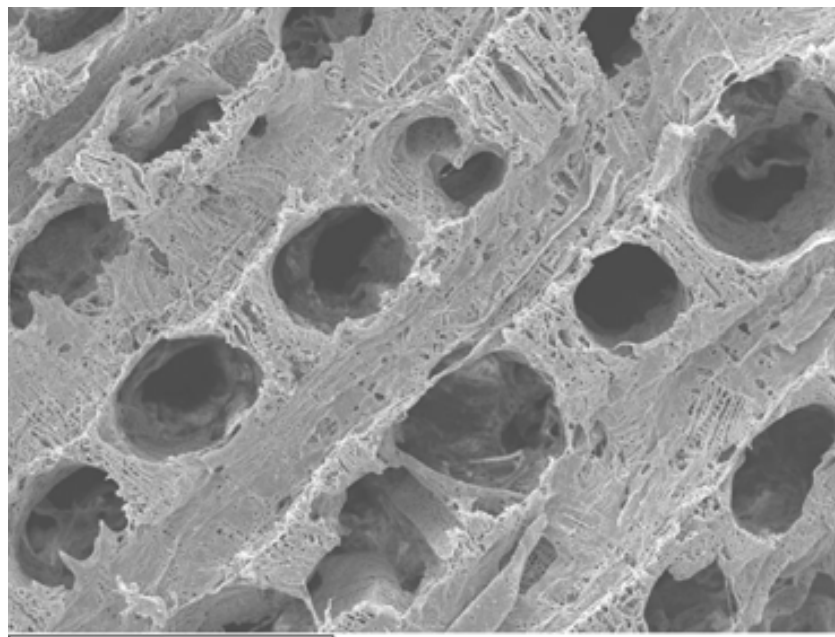
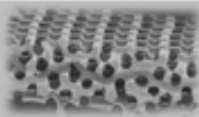
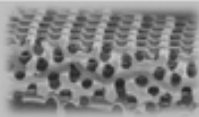


Figura 8. Microfotografia de microscòpia electrònica d'una matriu de suport macroporosa de policaprolactona amb estructura de porós esfèrics altament interconnectats amb grandàries de l'ordre de 200 micres. Marca del peu de foto de 1 mm. Imatge reproduïda amb l'autorització de Marta Oliver, Line Vikingsson i el Prof. JL Gómez-Ribelles de la Universitat Politècnica de València.

5.2. ANIMAL D'EXPERIMENTACIÓ

Es van fer servir 26 conills albins de raça *New Zealand*, adolescents, mascles, de més de tres mesos d'edat amb un pes d'uns 2,5 i 3,00 kg. Per abaratir el cost de l'experiment i per estalviar una cirurgia a cada conill per a l'obtenció de condrocits autòlegs, amb el patiment que això suposaria, es van utilitzar en els primers espècimens els condrocits d'un únic donant inicial. Hi treballs previs que demostren pràcticament l'absència de rebuig amb condrocits al·logènics de conills *New Zealand* estàndard (120-123).

Igualment donat que està demostrat com hem comentat que els condrocits de cada espècimen de l'experiment poden ser útils per a la resta (són igualment al·logènics), en els primers sacrificis reglats, es van obtenir condrocits del cartílag hialí de les articulacions no intervingudes prèviament. Aquests condrocits es van processar i cultivar, i es van implantar en la resta d'espècimens segons la metodologia assignada.

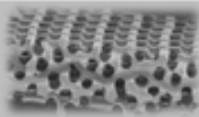


MATERIAL I MÈTODES: Treball nº 1

En el postoperatori immediat als animals se'ls hi permetia la mobilització lliure i en gàbies individuals adequades segons la normativa vigent i acceptada pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal del centre on els animals van estar estabulats.

El control general de l'animal es va realitzar a la seva recepció i diàriament després de la intervenció per personal qualificat segons el protocol de supervisió acceptat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal. Tots els animals van estar estabulats un mínim de 4-7 dies com a període de quarantena amb la finalitat de permetre'ls la seva aclimatació al seu nou estabulari abans del procés quirúrgic. Es va registrar el pes inicial i el final en el moment del sacrifici de cada animal. Els genolls dels animals van ser revisats per tal de comprovar l'evolució de la ferida quirúrgica i descartar possibles infeccions, rigideses, fractures i luxacions de la ròtula. Els animals van rebre menjar i beguda *ad libitum* durant tot el procés.

En tot moment es va seguir la normativa vigent (86/609/CEE) relativa a la protecció d'animals utilitzats per a l'experimentació i altres finalitats científiques, i a la modificació de la Generalitat de Catalunya amb la llei 5/1995 i els decrets 214/1997 i 164/1998. El protocol de l'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (Permís 273/6) d'acord amb la llei 86/609/EEC (*European Economic Community*) i el decret 214/1997 de la Generalitat de Catalunya.



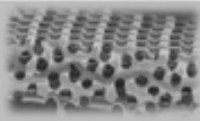
5.3. OBTENCIÓ DELS CONDRÒCITS DE CONILL

Es va obtenir cartílag articular dels genolls dels conills, una vegada sacrificats amb una sobredosi de Tiopental (Tiobarbital, Braun Laboratoris) intravenosa a la vena marginal de l'orella.

Primerament es va sacrificar un únic conill per tal d'obtenir suficients condrocits per sembrar les matrius de PCL i preparar els pèl·lets, necessaris per a ser utilitzats a la primera ronda d'experiments *in vivo*.

El cartílag articular del genoll sa contralateral (no intervingut) dels conills sacrificats un cop finalitzada la primera ronda, es va utilitzar per a l'obtenció de més condrocits i preparar-los per a la seva implantació segons el grup assignat a les posteriors cirurgies. Tal com hem comentat prèviament, en tot moment es van implantar condrocits al·logènics donat que està demostrat que no produeixen rebuig en aquestes línies d'animals (120-123).

Per a l'obtenció dels condrocits es va dissecar el cartílag de l'os subcondral, es va tallar finament i es va conservar en un medi que consta de: penicil·lina (100U), estreptomina (100 micrograms) (Biological Industries) i 0,4% de fungizona (Gibco), anomenat Medi de Dulbecco's modificat d'Eagle (DMEM). Els enzims de digestió de cartílag es van preparar en aquest medi. Per a l'aïllament dels condrocits es van incubar les mostres de cartílag amb 0.5 mg/ml de hialuronidasa (Sigma-Aldrich) durant 30 minuts a una temperatura de 37° C. Posteriorment es va retirar la hialuronidasa i es va afegir 1 mg/ml de pronasa (Merck, VWR Internacional SL). Després de 60 minuts d'incubació dins aigua a 37° C les mostres es van rentar amb la solució DMEM. Es va continuar la digestió enzimàtica afegint 0.5 mg/ml de col·lagenasa-IA (Sigma-Aldrich) que es va mantindre al mateix bany a 37° C durant 12 hores. La suspensió cel·lular resultant es va filtrar a través d'un filtre porós de nylon de 70 micres (BD biosciences) per eliminar tot el teixit sobrant. Les cèl·lules es van centrifugar i rentar amb el medi DMEM suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (FBS) (Invitrogen SA). Finalment les cèl·lules es van col·locar en flascons de cultiu tissular per a realitzar el cultiu de condrocits immediatament o bé per a criopreservar-les en nitrogen líquid amb DMEM al 20% de FBS i 10% de dimetil sulfòxid (DMSO) (Sigma Aldrich) fins que va ser necessària la seva utilització.

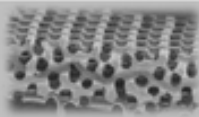


5.4. CULTIU CEL·LULAR EN Matrius DE POLICAPROLACTONA

Després de l'aïllament cel·lular, els condrocits es van dipositar en recipients específics amb una densitat elevada de medi de cultiu (DMEM suplementat amb 10% de FBS i 50 micrograms/ml d'àcid ascòrbic) a 37° C i en una atmosfera al 5% de CO₂ humidificat. El medi es va canviar cada tres dies. Després de 7-14 dies es van recollir les cèl·lules adherides per incubació amb tripsina-EDTA (Biological Industries) i es van resuspendre amb un mínim volum de medi de cultiu. A l'arribar a la fase de confluència, les cèl·lules es van subcultivar en proporció 1:4. Es van fer servir els condrocits obtinguts entre el primer i el segon subcultiu. Les mostres de PCL es van col·locar a una safata de cultiu de 96-well polystyrene (Nunc A/S) i es van barrejar amb Hank's Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich). Després de retirar la solució de Hank, la suspensió cel·lular ($0.5-1 \times 10^6$) es va abocar a les matrius de suport de PCL per permetre la infiltració cel·lular dins l'estructura porosa. Es va deixar una hora i es va afegir medi de cultiu fins a cobrir tot el material. Les cèl·lules es van cultivar amb DMEM suplementat amb 1% ITS (BD Biosciences) i 50 micrograms/ml d'àcid ascòrbic durant 7 dies.

Es van preparar 2 mostres addicionals de matrius de PCL sembrades amb condrocits. Aquestes no van ser implantades i es van analitzar en paral·lel a les implantades en el conills per a complementar els resultats, i valorar la viabilitat dels condrocits.

Les matrius de PCL es van dipositar en pous de 16 mm de diàmetre afegint els condrocits que s'havien incubat amb HAM'S F-12/DMEM complementat amb un 10 % de FBS, antibiòtics i àcid ascòrbic. Els subcultius dels condrocits en monocapa es van centrifugar per a aconseguir un pèl·let. Es van incubar durant 2 setmanes abans de ser implantats als defectes produïts als conills.



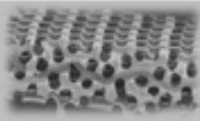
5.5. PREPARACIÓ DELS PÈL·LETS DE CONDRÒCITS

Un cop recollides les cèl·lules dels pots de sembra, es van transferir a un tub per a centrifugar-les (1.000.000 de cèl·lules per tub) al que es va afegir medi de cultiu fins a obtenir 1 ml. La suspensió cel·lular es va centrifugar durant 4 minuts a 1200 rpm. El pèl·let resultant es va cultivar amb DMEM suplementat amb un 1% d' ITS i 50 micrograms d' àcid ascòrbic i es va deixar durant 7 dies a una temperatura de 37° C i una atmosfera al 5% de CO₂ humidificat.

Es van preparar 2 mostres addicionals de pèl·les de condrocits. Aquestes no van ser implantades i es van analitzar en paral·lel a les implantades en el conills per a complementar els resultats, i valorar la viabilitat dels condrocits.

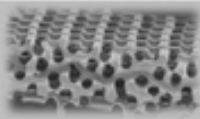
5.6. ANESTÈSIA DELS ANIMALS

Es va administrar una dosi preanestèsica de sedants i relaxants musculars per evitar en tot el moment el patiment de l'animal en la fase inicial de preparació. Aquesta preanestèsia es va realitzar mitjançant l'administració subcutània d'una barreja de Ketamina (Ketolar® laboratoris Pfizer) 25 mg/Kg i Xilacine (Xilagesic 2% ® laboratoris Calier S.A.) 3 mg/Kg. Aquesta medicació provoca una sedació, analgèsia i relaxació muscular als 5-10 minuts de la seva administració que va permetre realitzar la preparació prèvia a la cirurgia (rentat, rasurat, col·locació...) sense forcejar amb l'animal estalviant-li així un patiment innecessari. Una vegada preparat l'espècimen per a l'acte quirúrgic i abans de començar-lo, es va induir l'anestèsia amb isofluorà al 4% amb una mascareta conformada fins a obtenir la profunditat anestèsica adequada. El manteniment anestèsic es va fer amb isofluorà al 2 % amb un flux d'oxigen de 2 litres/minut fins a la conclusió de l'acte quirúrgic. Per tal de protegir la còrnia de l'animal, una vegada anestesiats es va tancar la parpella i es va fixar amb esparadrap específic (micropore ®) tal com es realitza amb els humans. L'esparadrap es va retirar en el moment previ al despertar de l'animal.



5.7. IMPLANTACIÓ DE LES MOSTRES AL CONILL

Amb l'animal ja anestesiàt, es va preparar un camp quirúrgic estèril i s' inicià l'acte quirúrgic: abordatge central, artrotomia medial pararrotoiana interna, luxació de la patel·la a nivell extern i amb una trefina de 3 mm de diàmetre es va realitzar de forma manual un defecte condral al solc intercondili troclear de 3 mm de diàmetre per aproximadament 1 mm de profunditat. La localització del defecte al solc intercondili ofereix una bona grandària i és avalada per nombrosos estudis (13-15, 127-129). El cartílag es va buidar mitjançant l'ajut d'una cullereta per a curetatge de 4/0. No es va penetrar en cap moment l'os subcondral a excepció dels espècimens seleccionats a tal efecte. Després del curetatge i buidament del cartílag del defecte, es van implantar les mostres preparades prèviament de manera aleatòria. En els casos en que es van fer lesions subcondrals per afavorir la presència d'un hematoma i de cèl·lules pluripotencials provinents del moll d'os, aquestes es van realitzar mitjançant 4-5 perforacions amb una agulla de 25 G (BD Microlance™ 3) en el diàmetre del defecte creat, assegurant-nos macroscòpicament de la penetració subcondral i de la presència activa de sagnat. Una vegada es va implantar la mostra es va fixar, es va reduir la patel·la i es van realitzar varies mobilitzacions articulars del genoll per objectivar el correcte recorregut sobre l'empelt i l'estabilitat i permanència d'aquest en el defecte creat. L'estabilització de l'implant es va realitzar mitjançant una sutura amb Coated Vicryl ® de 6/0 (Johnson-Johnson Intl) que es va fixar a banda i banda del cartílag circumdant a la lesió amb 4 punts. En els casos que es va utilitzar periosti per a donar suport al pèl·let, aquest es va obtenir de la metàfisi medial de la tibia intervinguda. Finalment, es va reduir la patel·la i es va tancar l'artrotomia per plans amb vycril 4/0. Es va col·locar un embenat elàstic que es va mantenir durant 24-72 hores segons el deteriorament del mateix. Després de la finalització de l'acte quirúrgic els animals es van retornar a les seves gàbies i se'ls va deixar lliures, amb alimentació i beguda *ad libitum*. L'analgèsia postoperatòria va consistir en una injecció intramuscular de dexketoprofè (Enantyum ® , Menarini Laboratoris) a una dosi de 3 mg/Kg cada 24 hores durant 3 dies. Al final de la intervenció quirúrgica també s'administrà una dosi de Gentamicina (Genta-Gobens ®, Normon Laboratoris) intramuscular de 3mg/Kg com a profilaxi antibiòtica.



5.8. CONDICIONS D'ESTABULACIÓ

Es va respectar un cicle de llum de 12 hores al dia alternat amb 12 hores de foscor. Els animals van disposar d'aigua i menjar *ad libitum*. Tant l'humitat relativa com la temperatura es van mantenir constants amb condicionadors d'aire. Es va canviar cada 24 hores el material absorbent d'excrements segons la indicació del fabricant.

5.9. PROTOCOL DE SUPERVISIÓ

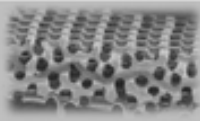
Es va seguir en tot moment el protocol de supervisió aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (Permís 273/6) d'acord amb la llei 86/609/EEC i el decret 214/1997 de la Generalitat de Catalunya.

No va ser necessari en cap moment prendre mesures de punt final per patiment animal durant tot l'estudi.

5.10. EUTANÀSIA

El sacrifici del primer espècimen per a l'obtenció de cartílag pel processament de condrocits i de la resta d'espècimens després del període d'estabulació de 3 mesos, es va realitzar amb una dosi de 500 mg/ev de Tiopental (Tiobarbital ® de laboratoris Braun). Prèvia cateterització de la vena marginal de l'orella del conill, es va administrar una dosi de 500 mg de Tiopental provocant la mort immediata de l'animal. Aquest procediment obté la més alta puntuació, un valor de 5 punts, dels mitjans d'eutanàsia per evitar el patiment animal segons les associacions americana i europea de veterinaris (AUMA i FELASA respectivament).

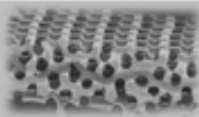
Es va seguir en tot moment els criteris per a practicar l'eutanàsia establerts en el protocol de supervisió validat pel comitè ètic per aquest procediment.



5.11. OBTENCIÓ DE MOSTRES

Una vegada es va sacrificar l'animal es va procedir al rasurat, pintat amb povidona iodada del genoll intervingut i la preparació d'un camp estèril. Sobre la cicatriu cutània prèvia i amb un artrotomia interna es va accedir a la troclea femoral. Es va identificar l'àrea del defecte i es va realitzar un forat vertical a la superfície articular, a nivell de la unió proximal del defecte amb el cartílag sa, amb una broca de 1.2 mm. Aquest orifici es va realitzar amb la finalitat d'identificar macroscòpicament amb els talls del micròtom, el començament del defecte i l'àrea de reparació, ja que en alguns casos aquesta transició era pràcticament inapreciable macroscòpicament. Una vegada realitzat aquest marcatge amb la broca, es va procedir a l'obtenció del defecte inclòs en un bloc quadrat de troclea femoral amb uns 6-8 mm de costat mantenint la lesió al centre; el tall ossi es va realitzar amb una mini serra circular de 20 mm de diàmetre a baixa velocitat. La mostra obtinguda es va rentar repetidament amb sèrum fisiològic i es va introduir en flascons també en sèrum fisiològic pel seu transport. Els flascons amb les mostres es van mantindre en nevera a 4-7° C durant el transport i fins l'arribada al laboratori on va ser processats.

En els 6 espècimens en els que es va realitzar l'estudi biomecànic a la Universitat Politècnica de València, es va obtindre la mostra de la tròclea femoral tal com s'ha explicat prèviament, però sense realitzar el brocat previ de marcatge amb la broca de 1.2 mm. La part contrària a la superfície articular (la zona d'os subcondral-esponjós) es va regularitzar amb la mini serra circular de 20 mm de diàmetre amb la finalitat d'obtenir un recolzament pla de la mostra per a fixar-la correctament al portaobjectes de l'indentador de pressions. Es va fer servir la zona homònima de la troclea femoral esquerra com a control en els 6 casos. A 3 d'aquests 6 conills se'ls hi havia implantat una matriu de suport de PCL amb condrocits al·logènics i als altres 3 se'ls hi havia implantat un pèl·let de condrocits recobert amb periosti autòleg. Les mostres es van traslladar a la Universitat Politècnica de València en menys de 12 hores en sèrum fisiològic i refrigerades a uns 4-7° C, fins al seu processament per a l'estudi biomecànic.



5.12. GRUPS EXPERIMENTALS I PROCEDIMENT

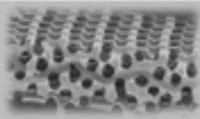
L'experiment va consistir en realitzar lesions condrials amb o sense perforacions subcondrials, a la tròclea femoral del genoll dret dels conills, que es van reparar de forma aleatòria segons cada grup:

- a) Sense implant amb perforacions de l'os subcondrial
- b) Amb matrius de PCL sense condriòcits i amb perforacions de l'os subcondrial
- c) Amb matrius de PCL sense sembrar sense perforacions de l'os subcondrial
- d) Amb matrius de PCL sembrades amb condriòcits al·logènics sense perforar l'os subcondrial
- e) Lesió condrial amb pèl·let de condriòcits cobert amb periosti autòleg de metàfisi proximal de tibia dreta

Es van fer servir un total de 26 conills. La distribució per grups va ser la següent:

GRUP	Nº d'espècimens
Lesió condrial amb perforacions subcondrials sense implant	2
Lesió condrial amb perforacions subcondrials amb matrius de PCL sense condriòcits	4
Lesió condrial amb matrius de PCL sense sembrar amb condriòcits	4
Lesió condrial amb matrius de PCL sembrades amb condriòcits al·logènics	10
Lesió condrial amb pèl·let de condriòcits recobert amb periosti	6

Taula 1. Distribució per grups i número d'espècimens de cada grup.



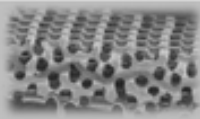
El sacrifici es va realitzar als 3 mesos de la cirurgia i les mostres es van processar pel posterior estudi biomecànic (comportament viscoelàstic i tècnica d'espectrometria mecànica i dinàmica) i histològic (proliferació cel·lular, expressió de fenotip, síntesi de col·lagen tipus II, expressió de proteïna S-100 i síntesi de proteoglicans).

5.13. ESTUDI HISTOLÒGIC

Es va mesura la capacitat dels condrocits per a sintetitzar glucosaminoglicans en els porus de les matrius de PCL i en els pèl·lets de condrocits, en les mostres de controls no implantades i en les mostres implantades després del sacrifici dels animals als 3 mesos. Les mostres van ser analitzades amb microscòpia òptica després de ésser tenyides amb blau alcià i hematoxilina de Mayer, i tallades amb micròtom.

5.14. ESTUDI IMMUNOHISTOLÒGIC

Es va mesura la capacitat dels condrocits per a sintetitzar col·lagen tipus I i tipus II i l'expressió de Ki-67 (com a marcador de proliferació) en els porus de les malles de policaprolactona i en els pèl·lets, dels controls no implantats, i de les mostres implantades després del sacrifici dels animals als 3 mesos



5.15. TESTS D'INDENTACIÓ

Les propietats mecàniques es van mesurar amb un equip Seiko TMA/6000 en mode de compressió, amb una sonda d'acer inoxidable d'1mm de diàmetre. Les mostres van ser tallades amb geometria prismàtica i tamany aproximat de 10x10x5 mm i contenien tant teixit normal com la zona defecte. El genoll contralateral es va utilitzar com a grup control. Es va aplicar la sonda al centre del cartílag reparat i en el genoll contralateral en el punt que vam considerar de simetria.

Es va aplicar un rampa de càrrega a una velocitat constant 10 gr/min. Després s'eliminà la càrrega a la mateixa velocitat i es deixà reposar la mostra 10 minuts. Es va repetir el mateix procés unes 3-5 vegades per mostra. Es va realitzar l'experiment a una temperatura de 38° C en solució salina.

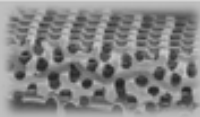
Es van mesurar les corbes de tensió-deformació amb els resultats obtinguts d'aquestes mesures i es va calcular el mòdul de Young en totes les mostres.

La pendent de la corba es va relacionar amb el mòdul de Young a través de la següent equació:

$$T = \frac{2\kappa E}{\pi a(1-\nu^2)} \omega_0$$

On T és l'estrès aplicat, on a és el radi de la sonda, ν és la raó de Poisson, w és el gruix del cartílag, ϵ és la tensió de la mostra i K és un factor de correcció que depèn de ν i de la ràtio a/h (h és el gruix de la mostra).

El gruix de la mostra es va mesurar amb un tall d'aquesta observat al microscopi òptic, així es va calcular la tensió dividint el desplaçament entre el gruix del cartílag.



Treball nº 2

Lebourg M, Martínez-Díaz S, García-Giralt N, Torres-Claramunt R, Gómez-Ribelles JL, Vila-Canet G, Monllau JC.

Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic acid-polycaprolactone scaffolds: A study in vivo.

J Biomater Appl. 2014 May;28(9):1304-15.

5.1. PREPARACIÓ DE LES MATRIUS DE SUPORT

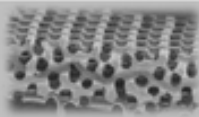
La preparació de les matrius de suport va ser equiparable a la detallada a l'apartat 4.1 del treball nº 1. Es van fabricar matrius de suport de 2 tipus: de PCL i de PCL-AH per a dotar-les d'una major capacitat hidrofílica.

5.2. GRUPS EXPERIMENTALS I PROCEDIMENT

Es van fer servir 28 conills de característiques idèntiques als del treball nº 1. Es va realitzar la mateixa preparació i tècnica quirúrgica que al treball nº 1 realitzant una lesió condral completa de 3 mm de diàmetre i de aproximadament 1 mm de profunditat fins a aconseguir el sagnat macroscòpic de la lesió amb perforacions subcondrals. Es van crear 3 grups amb lesions idèntiques:

- Grup sense implant
- Grup amb matriu de suport de PCL.
- Grup amb matriu de suport de PCL-AH.

L'eutanàsia es va realitzar segons el grup assignat a 1 setmana de la cirurgia, a les 4 setmanes de la cirurgia, a les 12 setmanes de la cirurgia i a les 24 setmanes de la cirurgia.



	Número d'espècimens			
	Temps 1 setmana	Temps 4 setmanes	Temps 12 setmanes	Temps 24 setmanes
CONTROL (sense implant)	2	2	2	2
PCL	2	3	3	2
PCL-AH	2	3	3	2

Taula 2: PCL; grup al que se li va implantar una matriu de PCL. PCL-AH; grup al que se li va implantar una matriu de PCL-AH. Temps: en setmanes fins a eutanàsia.

5.3. PROTOCOL QUIRÚRGIC I D'ESTABILACIÓ

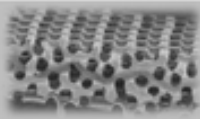
El protocol anestèsic, d'implantació de matrius, de condicions d'establació i d'eutanàsia van ser idèntics als del treball nº 1.

El protocol de supervisió aplicat va ser igual al del treball nº 1 seguint la normativa aprovada pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (Permís 202/10) d'acord amb la llei 86/609/EEC (*European Economic Community*) i el decret 214/1997 i 164/1998 de la Generalitat de Catalunya.

5.4. ANÀLISIS MACROSCÒPIC

En el moment de l'eutanàsia es van prendre fotografies i vídeos de l'articulació incloent la lesió que van mostrats a cirurgians ortopèdics amb experiència en la cirurgia de reparació del cartílag articular. En cap moment s'els hi va fer cap referència al tipus d'implant utilitzat, tipus de defecte ni temps d'implantació.

Es van aplicar l'*International Cartilage Repair Society Score* (ICRS) i el *Oswestry Arthroscopy Score* (OAS) calculant les mitges dels resultats observacionals obtinguts (130-132).



L'ICRS ha estat validat per a realitzar una valoració qualitativa de la reparació i grau de curació del cartílag articular durant un procediment artroscòpic. Valora el grau de la reparació del defectes, la integració amb el cartílag sa de la perifèria i l'aparença macroscòpica. El rang varia de 0-12, sent normal amb 12 punts, quasi normal entre 8 i 11 punts, anormal entre 7 i 4 punts, i severament anormal quan és menor de 4 punts.

L'OAS també ha estat validat per a valorar la qualitat de la reparació del cartílag hialí durant un procediment artroscòpic de revisió articular. Es valora l'aparença en superfície de la lesió, el color, la integració amb el cartílag sa adjacent i la consistència de la lesió per palpació. El rang varia de 0 a 10, sent 10 la puntuació màxima.

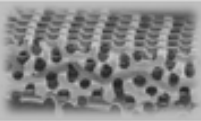
Ambdues escales estan validades per a l'avaluació macroscòpica de lesions de cartílag i s'han fet servir en models animals prèviament (130-135).

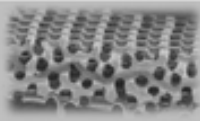
5.5. ESTUDI HISTOLÒGIC

A les mostres obtingudes es va valorar la presència de glucosaminoglicans mitjançant microscòpia òptica de forma equiparable al treball nº 1.

5.6. ESTUDI IMMUNOHISTOLÒGIC

A les mostres obtingudes es va valorar la presència de col·lagen tipus I, col·lagen tipus II i l'expressió del marcador de proliferació Ki-67. Aquestes valoracions es van fer amb tècniques equiparables a les del treball nº 1.





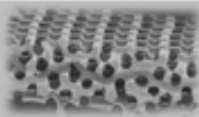
6. RESULTATS

Treball nº 1

Martínez-Díaz S, Garcia-Giralt N, Lebourg M, Gómez-Tejedor JA, Vila G, Caceres E, Benito P, Pradas MM, Nogues X, Gómez-Ribelles JL, Monllau JC.

In vivo evaluation of three-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits.

Am J Sports Med. 2010 Mar;38(3):509-19.



6.1. ESTUDI DE LES MOSTRES IMPLANTADES

La regeneració del cartílag després de la implantació de les mostres es va avaluar amb la formació de col·lagen tipus I, col·lagen tipus II i amb la síntesi de glucosaminoglicans. Les matrius sembrades en paral·lel com a controls i no implantades, es van analitzar abans del moment de la cirurgia per a determinar si les cèl·lules adherides eren viables dins la matriu i per determinar també el grau de diferenciació dels condrocits. Totes les matrius de suport de PCL implantades a l'articulació van mostrar una elevada densitat cel·lular i producció de matriu extracel·lular (expressió de glucosaminoglicans i col·lagen tipus II) (**Figures 9 A i B**). També es va detectar síntesi de col·lagen tipus I (**Figura 9 C**). Els resultats obtinguts van ser similars amb pèl·let i matrius de PCL no sembrades, pel que fa al grau de diferenciació dels condrocits i a la producció de matriu extracel·lular (**Figura 9 D i E**).

El col·lagen tipus I es va expressar només en cèl·lules de la perifèria dels espècimens tractats amb pèl·lets, les quals tenien una morfologia similar als fibroblasts (**Figura 9 F**).

Les cèl·lules tant del pèl·let com de les matrius de PCL expressaven S-100, el que suggereix una bona diferenciació a condrocits.

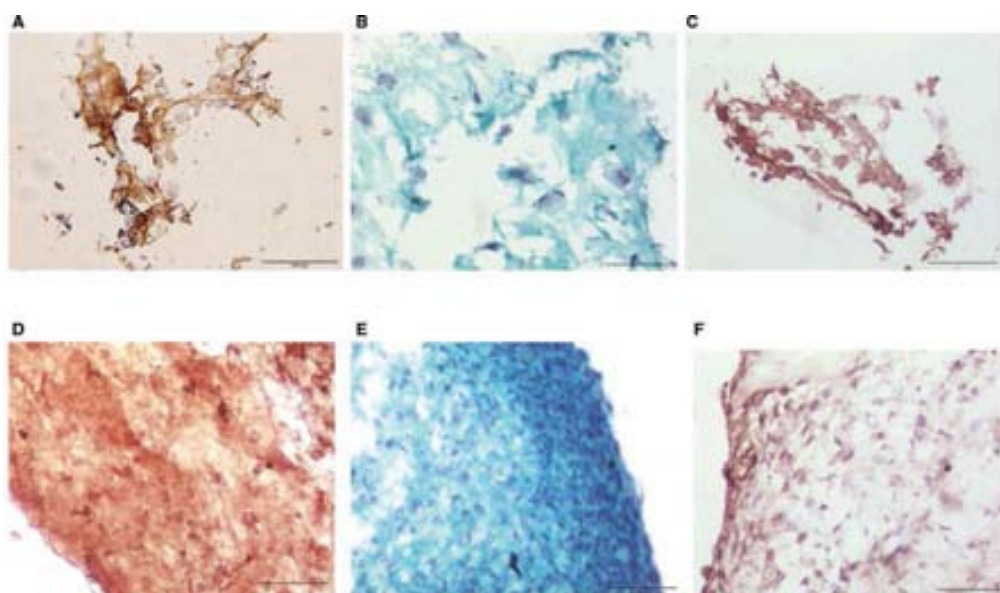
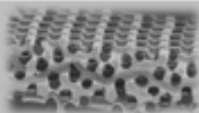


Figura 9. Seccions del defecte reparat a l'articulació del conill. A, B i C espècimens amb implantació de matrius de PCL i condrocits. D, E i F espècimens amb implantació de condrocits en pèl·let. Tinció immunohistoquímica de Col·lagen tipus II (A i D) i tipus I (C i F). Tinció amb blau d'alcià (B i E). Escala 100 μ m.



RESULTATS: Treball nº 1

L'anàlisi macroscòpic de les mostres va mostrar una bona integració de l'implant amb el cartílag natiu. Tot i això, la zona de transició era visible a la majoria dels casos (**Figura 10**). Les reparacions amb PCL sembrada amb condròcits (**Figura 10 A**) i els pèl·lets (**Figura 10 C**) mostraven una millor continuïtat i transició amb el cartílag natiu. En alguns casos d'espècimens als que s'els hi va implantar matrius de suport de PCL (amb o sense condròcits al·logènics) el cartílag neofomat va presentar un aspecte molt similar al cartílag adjacent. En els casos en que no es van implantar ni pèl·let ni matrius de PCL, els defecte era evident als 3 mesos i mostraven diferències clares amb el teixit sa de la perifèria (**Figura 10 E**).

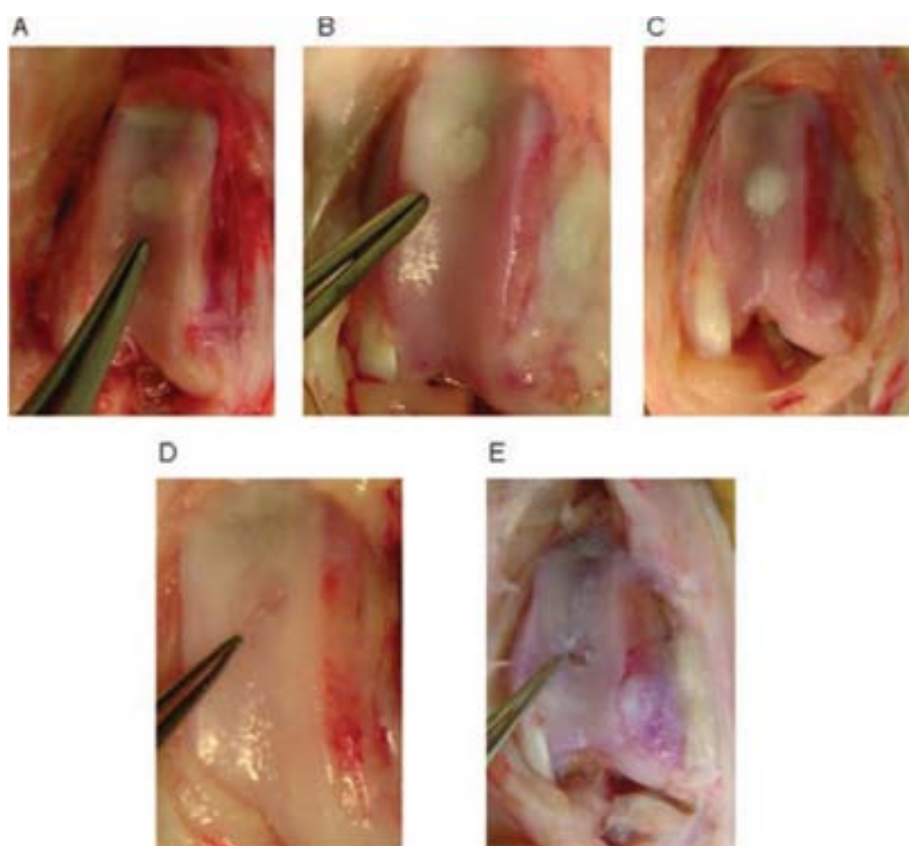
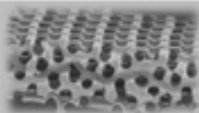


Figura 10. Visió macroscòpica dels defectes reparats als 3 mesos. **A**, PCL + condròcits; **B**, PCL + lesió subcondral; **C**, Pèl·let de condròcits; **D**, PCL i **E**, lesió subcondral lliure.



RESULTATS: Treball nº 1

L'anàlisi microscòpic va evidenciar que totes les mostres implantades presentaven una bona integració amb l'os subcondral i al cartílag subjacent (**Figura 11**). Tot i així, només els defectes reparats amb matrius de suport de PCL + condrocits (**Figura 11 A**) o matrius de suport de PCL sense condrocits i amb perforacions subcondrals (**Figura 11 B**) mostraren una estructura comparable al cartílag natiu, si eren comparades a les lesions reparades amb pèl·let (**Figura 11 C**), matrius de suport de PCL no sembrades i sense perforacions subcondrals (**Figura 11 D**) i les lesions sense implants només amb perforacions subcondrals (**Figura 11 E**).

Es va evidenciar que les matrius de suport de PCL encara no s'havien degradat al finalitzar l'estudi (3 mesos).

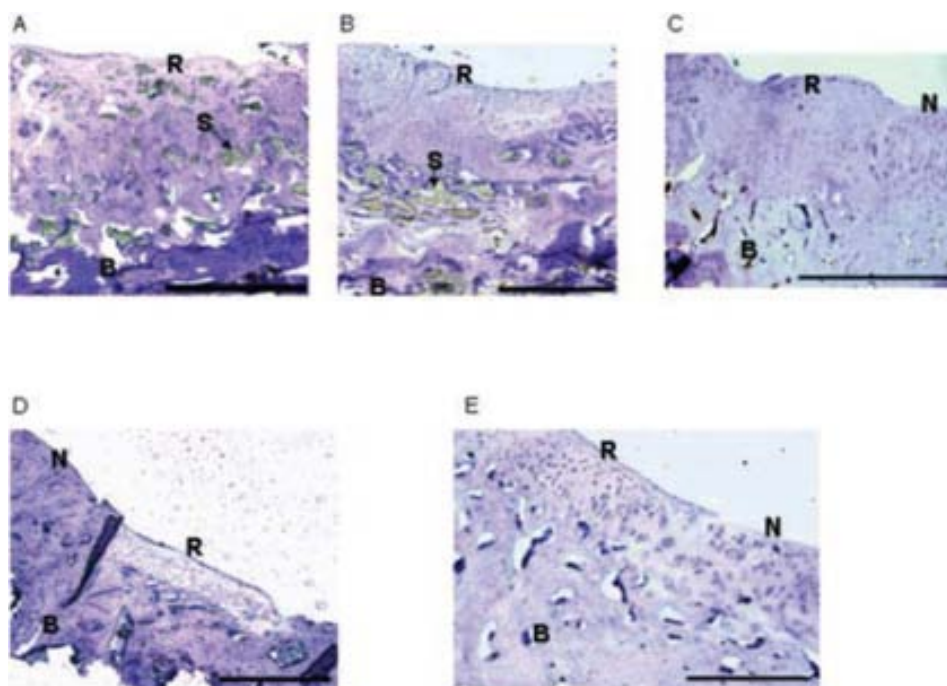
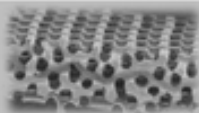


FIGURA 11. Preparació d'hematoxilina per a l'observació histològica de seccions del defecte reparat a les articulacions del conill. **A:** PCL amb cèl·lules sembrades; **B:** PCL amb lesió subcondral; **C:** Pèl·let; **D:** PCL i **E:** lesió subcondral. **B,** os subcondral; **S,** matriu de suport (*scaffold*); **N,** cartílag natiu; **R,** cartílag reparat. Escala 500 μ m.



RESULTATS: Treball nº 1

Es va detectar una baixa proliferació cel·lular en totes les mostres (**Figura 12**). En els defectes reparats amb matrius de suport de PCL sembrades amb condròcits i amb matrius de suport de PCL sense condròcits i amb perforacions subcondrals es va evidenciar amb l'expressió del Ki-67 una proliferació cel·lular escassa (nuclis marrons en **Figures 12 A i B**). En la reparació amb pèl·let i les reparacions només amb perforacions subcondrals la proliferació cel·lular va ser una mica major (**Figures 12 C i E**).

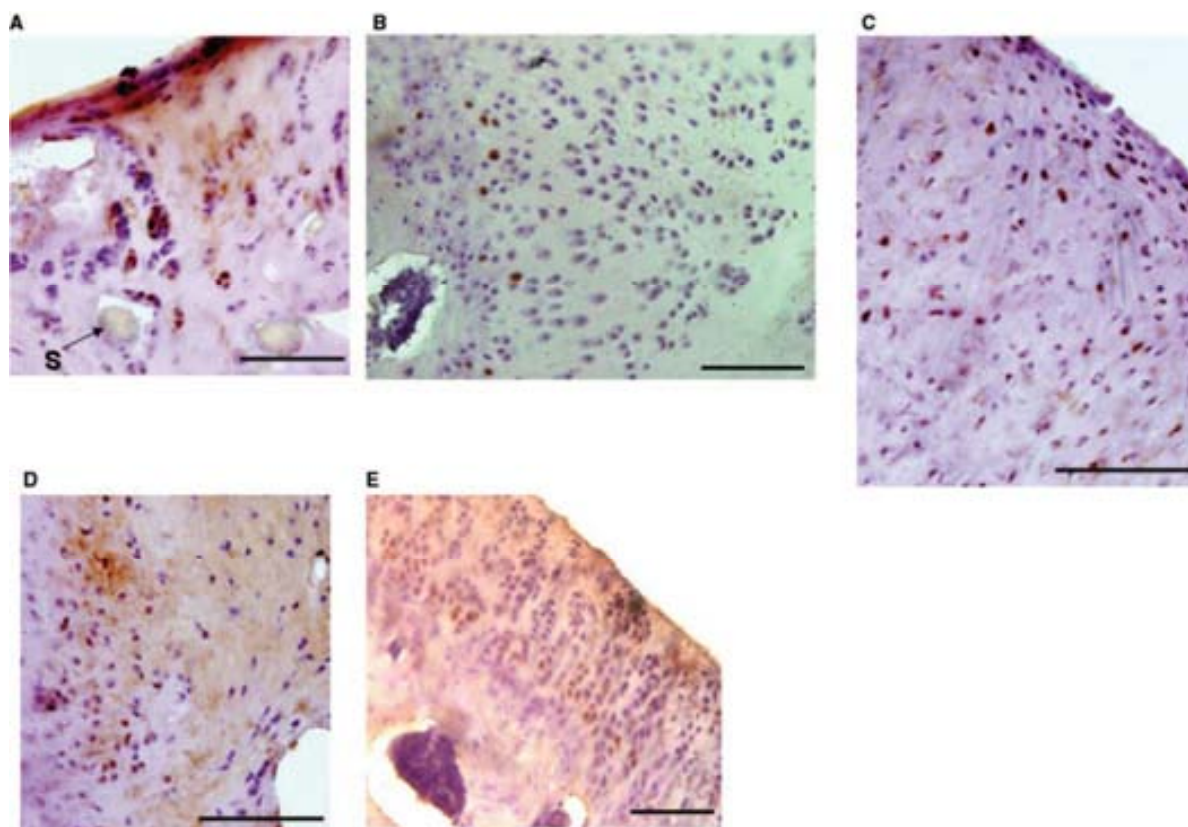
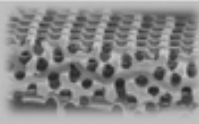


Figura 12. Seccions del defecte reparat a les articulacions del conill amb tinció immunohistoquímica de Ki-67. **A**, PCL + condròcits; **B**, PCL + lesió subcondral; **C**, Pèl·let; **D**, PCL i **E**, lesió subcondral lliure. Els nuclis marrons indiquen les zones de proliferació cel·lular. Escala 100 μ m.



RESULTATS: Treball nº 1

Es van detectar nivells elevats de glucosaminoglicans en totes les mostres (**Figura 13 de la mostra A, a la mostra E**). Els estudis immunohistoquímics de les mostres reparades amb PCL i condrocits van evidenciar una síntesi de col·lagen tipus II amb distribució similar a cartílag natiu (**Figura 13 K**) i no es va detectar en aquestes mostres col·lagen tipus I (**Figura 13 F**). Una dèbil expressió de col·lagen tipus I s'observà en els espècimens tractats amb matrius de PCL sense condrocits i perforacions subcondrals (**Figura 13 G**) amb una important expressió de col·lagen tipus II (**Figura 13 L**) tot i que menor a que en el cartílag natiu. El cartílag reparat amb matrius de PCL sense condrocits i sense perforacions subcondrals va mostrar elevats nivells de col·lagen tipus II i baixos de col·lagen tipus I (**Figures 13 N i I**) però amb una gruix de cartílag molt fi i fràgil. Les lesions reparades amb pèl·let de condrocits van mostrar una síntesi de col·lagen tipus II elevada i menors de col·lagen tipus I (**Figures 13 H i M**). Les lesions reparades només amb perforacions subcondrals sense cap tipus d'implant van mostrar una expressió elevada de col·lagen tipus II i menor de I (**Figures 13 J i O**) però només en la seva superfície sense mostrar una correcta distribució espacial.

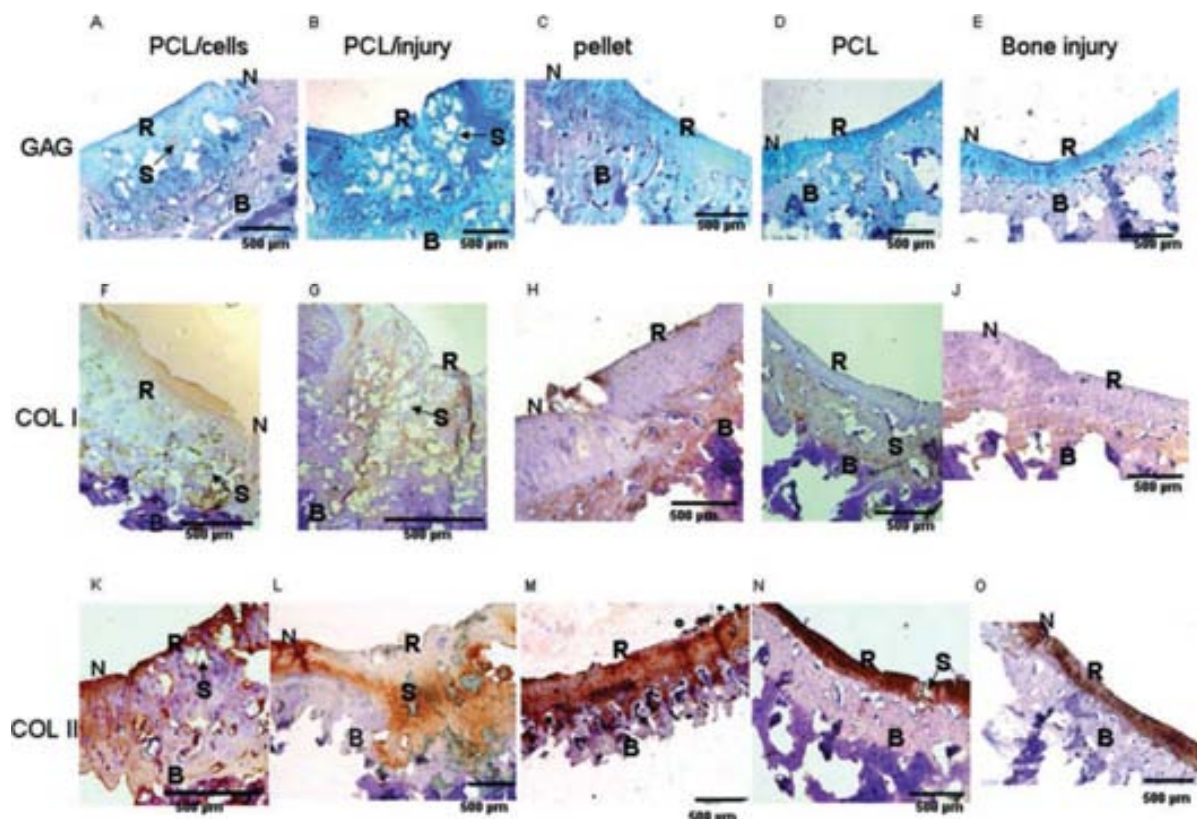
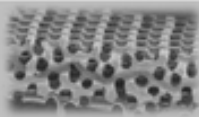


Figura 13. Seccions histològiques i immunohistològiques del teixit de reparació a les articulacions dels espècimens. **A, F i K,** PCL + condrocits, **B, G i L** PCL amb lesió subcondral; **C, H i M,** Pèl·let; **D, I, i N,** PCL; **E, J i O,** lesió osteocondral lliure. A l'interior de les preparacions: **B,** os subcondral; **S,** restes de matriu de suport (*S=scaffold*); **N,** cartílag natiu; **R,** cartílag reparat. Escala 500 µm.



6.2. TEST D'INDENTACIÓ

Es van estudiar les característiques biomecàniques de 3 lesions condrials reparades amb matrius de suport de PCL sembrades amb condrocits al·logènics i 3 lesions condrials reparades amb pèl·lets de condrocits al·logènics. La zona simètrica del genoll contralateral no intervingut, es va fer servir com a control en cada cas.

Les **figures 14 A i B** mostren un exemple de les corbes d'estrès obtingudes en els experiments realitzats en dos dels espècimens estudiats.

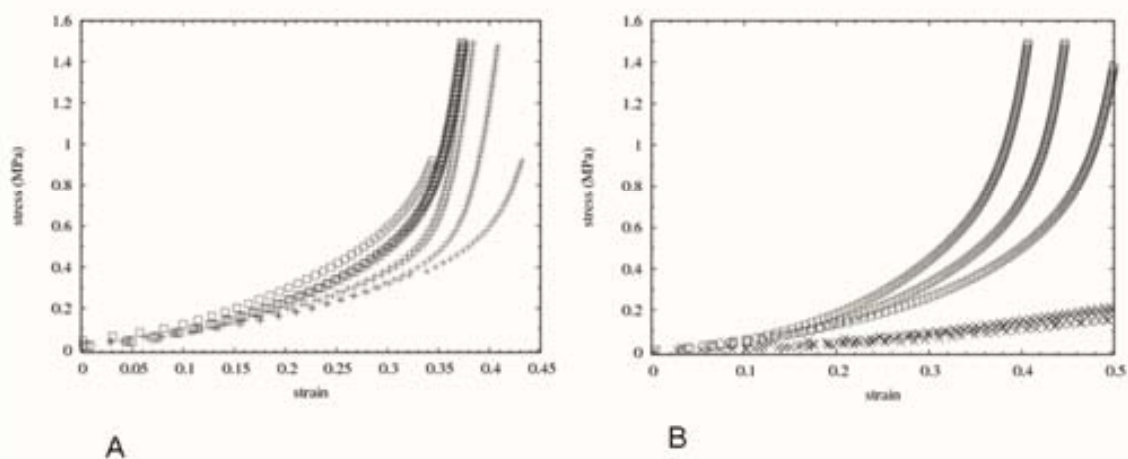
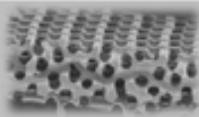


Figura 14. Corbes de tensió/deformació. **A**, \square representa el genoll contralateral i $+$, representa el genoll reparat amb policaprolactona i condrocits. **B**, \square representa el genoll contralateral i \times , el genoll reparat amb un pèl·let de condrocits.

La **Figura 14 A** mostra que per tensions menors al 20% la lesió que es va reparar amb la matriu de suport de PCL i condrocits al·logènics tenia una resposta similar al cartílag control. El mòdul de Young es calcula amb els resultats inicials d'aquestes corbes. Per tant, veiem resultats del mòdul de Young similars per a la reparació amb matrius de suport de PCL sembrades amb condrocits al·logènics, si els comparem amb el cartílag control sa, tal i com podem veure a la **Taula 3**. Es van evidenciar petites diferències en deformacions superiors al 20%, però es consideren de poca rellevància pel nostre objectiu ja que són similars a les que es produeixen fisiològicament.



RESULTATS: Treball nº 1

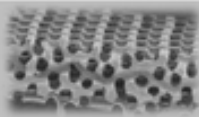
Les reparacions amb pèl·let no van tenir un comportament fisiològic: davant de poc estrés es produïen grans deformacions (figura 14B), resultant en un mòdul de Young menor al del cartílag natiu sa (**Taula 3**).

El comportament mostrat a la **Figura 14** és similar en totes les mostres de l'estudi analitzades de cada grup.

La **Taula 3** mostra el mòdul de Young de totes les mostres. En les mostres reparades amb matrius de suport de PCL sembrades amb condrocits al·logènics aquest és molt similar al cartílag natiu control. En canvi les mostres reparades amb pèl·let de condrocits presentaven un mòdul de Young molt menor al del cartílag natiu.

Specimen implant method	Implanted knee		Contralateral knee	
	<i>E (MPa)</i>	<i>SD (MPa)</i>	<i>E (MPa)</i>	<i>SD (MPa)</i>
Autologous chondrocyte transplantation (pellet)	0.20	0.04	0.57	0.02
	0.08	0.03	0.28	0.05
	0.10	0.04	0.37	0.04
PCL/cells	0.33	0.28	0.38	0.55
	0.47	0.04	0.43	0.02
	0.28	0.04	0.26	0.03

Taula 3. Mòduls de Young (E) i desviació estàndard (SD) calculats de la pendent de la corba de tensió/deformació.



6. RESULTATS

Treball nº 2

Lebourg M, Martínez-Díaz S, García-Giralt N, Torres-Claramunt R, Gómez-Ribelles JL, Vila-Canet G, Monllau JC.

Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic acid-polycaprolactone scaffolds: A study in vivo.

J Biomater Appl. 2014 May;28(9):1304-15.

6.1. ESTUDI DE LES MOSTRES IMPLANTADES

Es van estudiar microscòpicament les matrius implantades evidenciant-se uns porus homogenis i correctament interconnectats. La infiltració del 2% de concentració d'àcid hialurònic a les matrius va ser valorada amb microscopi electrònic observant-se una distribució homogènia del mateix als porus permeten un diàmetre suficient per a la invasió cel·lular. Les matrius conformades per PCL-AH van resultar 10 vegades més hidrofíliques que les conformades només per PCL.

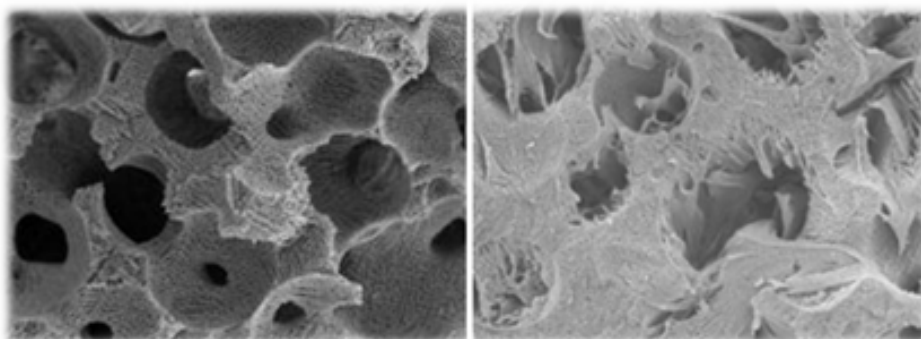
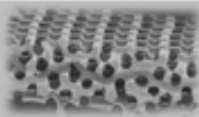


Figura 15. Imatges de microscòpia electrònica de matrius de suport de PCL (esquerra) i de PCL-AH (dreta).



6.2. OBSERVACIÓ MACROSCÒPICA

A les 24 setmanes es va evidenciar una correcta integració de les matrius al cartílag natiu. Tot i que el lloc d'implantació era apreciable en la majoria dels casos, l'aspecte del cartílag reparat en quant a brillantor, duresa i color, era molt similar al cartílag natiu adjacent. Als controls als que no se'ls hi van implantar matrius de suport el defecte era més evident, però també presentava un bon aspecte macroscòpic de reparació.

L'observació macroscòpica valorada mitjançant l'ICRS, començant des de les mostres obtingudes a les 4 setmanes, van ser millors pel grup de PCL-AH que per a les del grup de PCL. Com hem comentat la puntuació màxima d'aquesta escala és de 12 punts. Per a les mostres obtingudes a les 24 setmanes, es van obtenir uns valors mitjans de 10.5 pel grup de PCL-AH, mentre que va ser de 7 punts pel grup de PCL i de 5 punts pel grup control (ambdues puntuacions, 7 i 5, són considerades com a un cartílag anormal en aquesta escala).

Respecte a l'observació macroscòpica valorada mitjançant l'OAS la puntuació obtinguda pel grup de PCL-AH va ser millor que l'obtinguda pel grup de PCL. Com hem comentat la puntuació màxima d'aquesta escala és de 10. Per a les mostres obtingudes a les 24 setmanes, es van obtenir uns valors mitjans de 9.5 pel grup de PCL-AH, mentre que va ser de 6.5 punts pel grup de PCL i de 5 punts pel grup control.

En general, tot i que el número de casos de cada grup és limitat, es va evidenciar una millora de la qualitat del teixit reparat en totes les mostres observades en les que es van implantar matrius de suport (tant de PCL com de PCL-AH) si les comparem amb les mostres control. Igualment, basant-nos en les puntuacions obtingudes, es pot considerar que macroscòpicament les lesions a les que se'ls hi van implantar les matrius de PCL-AH van formar un teixit cartilaginós amb unes característiques macroscòpiques millors i d'una forma més ràpida, que quan es van implantar matrius de suport de PCL o quan no es va implantar cap tipus de matriu de suport.

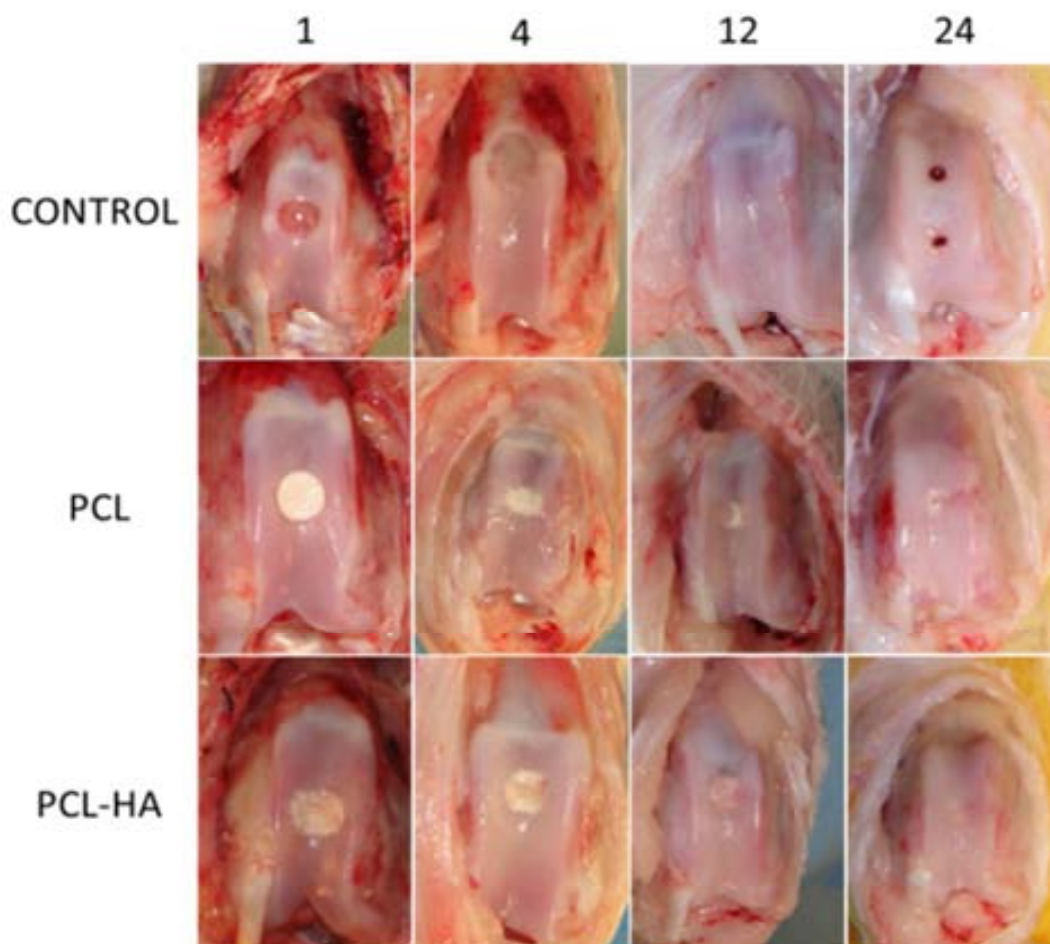
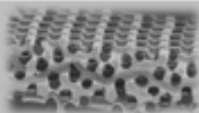
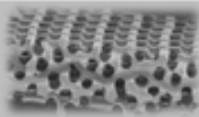


Figura 16. Exemples de l'aspecte macroscòpic dels defectes creats a la tròclea del conill a 1, 4, 12 i 24 setmanes en els diferents grups. Es van realitzar forats proximals i distals a la lesió per a una millor localització al preparar les mostres (exemple la figura control de les 24 setmanes). **Control:** grup sense implant; **PCL:** grup amb matrius de PCL; **PCL-HA:** grup amb matrius de PCL-AH.



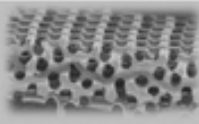
Temps	t=1 setmana		t=4 setmanes		t=12 setmanes		t=24 setmanes	
	ICRS	OAS	ICRS	OAS	ICRS	OAS	ICRS	OAS
Control	0	0	1.5	0	4	3	5	5
PCL	5.5	6	6	5.6	8.5	7	7	6.5
PCL-AH	5	5.5	9	7.2	9	7.2	10.5	9.5

Taula 4. **PCL:** grup amb matrius de PCL; **PCL-AH:** grup amb matrius de PCL-AH; **Control:** grup control; **ICRS:** *International Cartilage Repair Society score*; **OAS:** *Oswestry Arthroscopy Score*.

6.3. ANÀLISI HISTOLÒGIC

No va ser possible l'estudi en les mostres dels espècimens que es van sacrificar en 1 setmana donat que les matrius estaven pobrament adherides al defecte i es desprenien en el procés de fixació. Els resultats histològics i immunohistològics es van realitzar amb les mostres implantades a partir de les 4 setmanes. Des de les 4 setmanes les matrius de suport estaven suficientment adherides per a la seva manipulació i fixació.

A les 4 setmanes en les mostres reparades amb matrius de suport es van evidenciar signes de fixació de la mateixa a l'os subcondral, una correcta alineació en alçada amb la superfície del cartílag sa circumdant i signes d'invasió i creixement cel·lular. En les mostres examinades a les 12 i 24 setmanes, s'apreciaven signes de degradació de les matrius de suport (major a les mostres de 24 setmanes) que apareixien separades en diversos fragments i aparentment desintegrades pel teixit neofomat en el defecte. A les 24 setmanes les matrius de suport es mostraven envoltades d'os subcondral excepte la part de la mateixa que estava integrada a la capa de cartílag neofomat. Comparant amb el grup control, ambdós grups amb matrius de suport (PCL i PCL-AH) van produir una cobertura d'aspecte llis de cartílag rica en proteoglicans. Als controls examinats també es va observar la presència de proteoglicans, però a les 24 setmanes la superfície del cartílag reparat apareixia desorganitzada, amb signes de disrupció i formació de cavitats.



RESULTATS: Treball nº 2

Des del punt de vista histològic no es van evidenciar grans diferències entre els grups tractats amb matrius de suport de PCL o PCL-AH: es va formar un teixit ordenat i amb organització columnar dels condrocits sobre tot a la capa mitja del cartílag. Sí es va observar per a totes les mostres estudiades, que el grup amb matrius de suport de PCL-AH, es va integrar més ràpidament amb el cartílag natiu circumdant que el grup de matrius de suport de PCL.

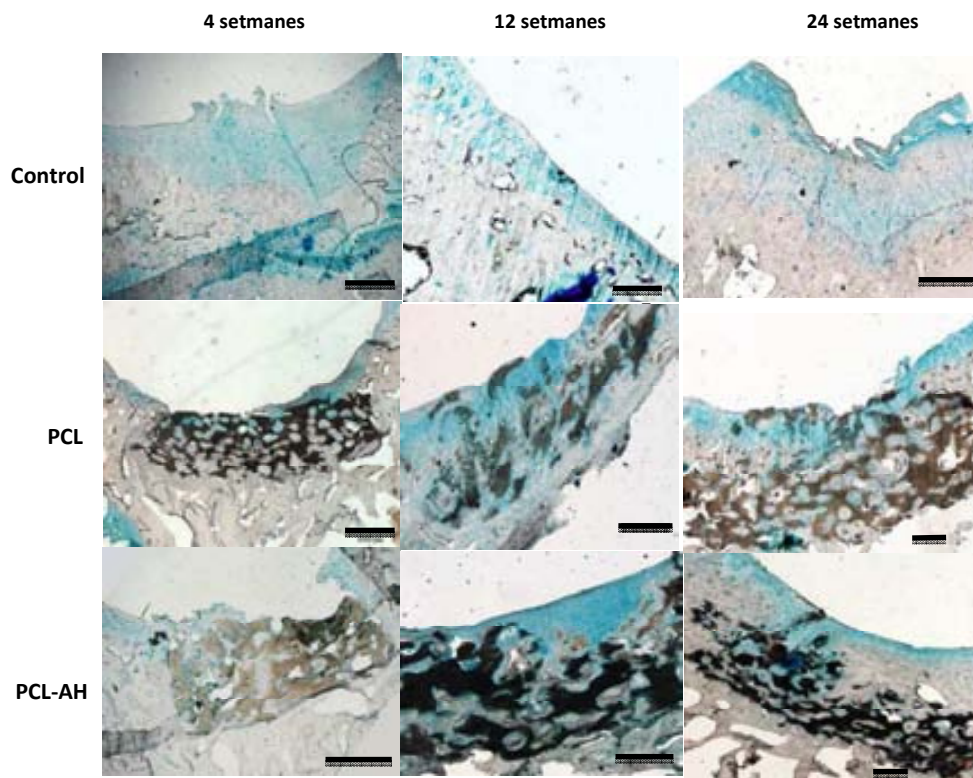
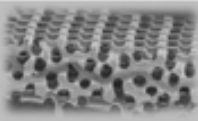


Figura 17. Tinció amb blau alcian de les mostres reparades a les 4, 12 i 24 setmanes. **Control:** grup control; **PCL:** grup amb matrius de PCL; **PCL-AH:** grup amb matrius de PCL-AH. L'escala és de 1 mm a les 4 setmanes i de 500 µm per a les mostres de 12 i 24 setmanes.



RESULTATS: Treball nº 2

A la **Figura 18** es pot observar un exemple de com una mostra reparada amb una matriu de PCL-AH presenta una millor organització del teixit amb una estructura similar al cartílag natiu i un creixement cel·lular controlat, mentre que el grup control presenta una organització i proliferació cel·lular molt més irregular.

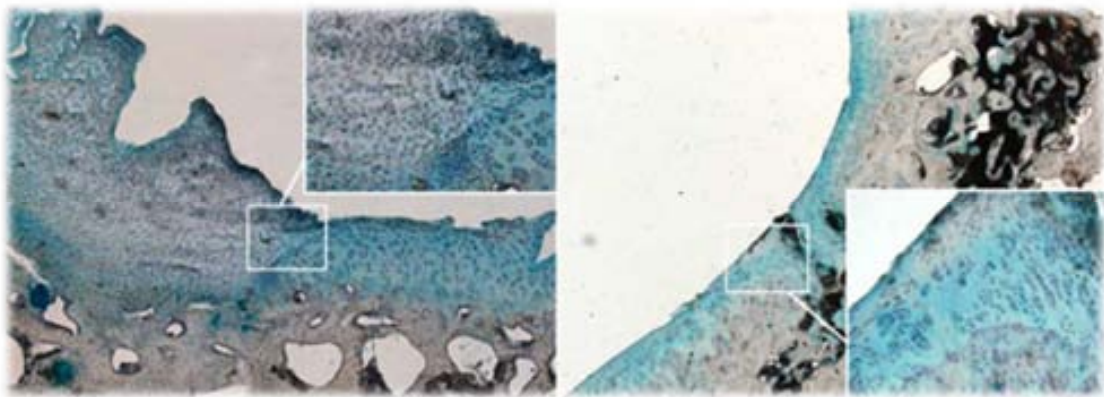


Figura 18. Detalls de l'organització del teixit reparat en el grup control (sense matriu) a l'esquerra i del grup al que es va implantar una matriu de PCL-AH a la dreta en una secció a les 24 setmanes.

6.4. ANÀLISI IMMUNOHISTOLÒGIC

Es va observar la presència de col·lagen tipus II en les lesions reparades amb matrius tant de PCL com de PCL-AH, a les 12 i 24 setmanes. També es va evidenciar la presència de col·lagen tipus II a les mostres control però en menor quantia i amb una disposició superficial i desorganitzada similar a una reparació de tipus fibrocartílag. Quan les reparacions de les lesions es va fer amb matrius de PCL l'aspecte en disposició columnar del col·lagen tipus II va ser comparable a la del cartílag hialí sa.

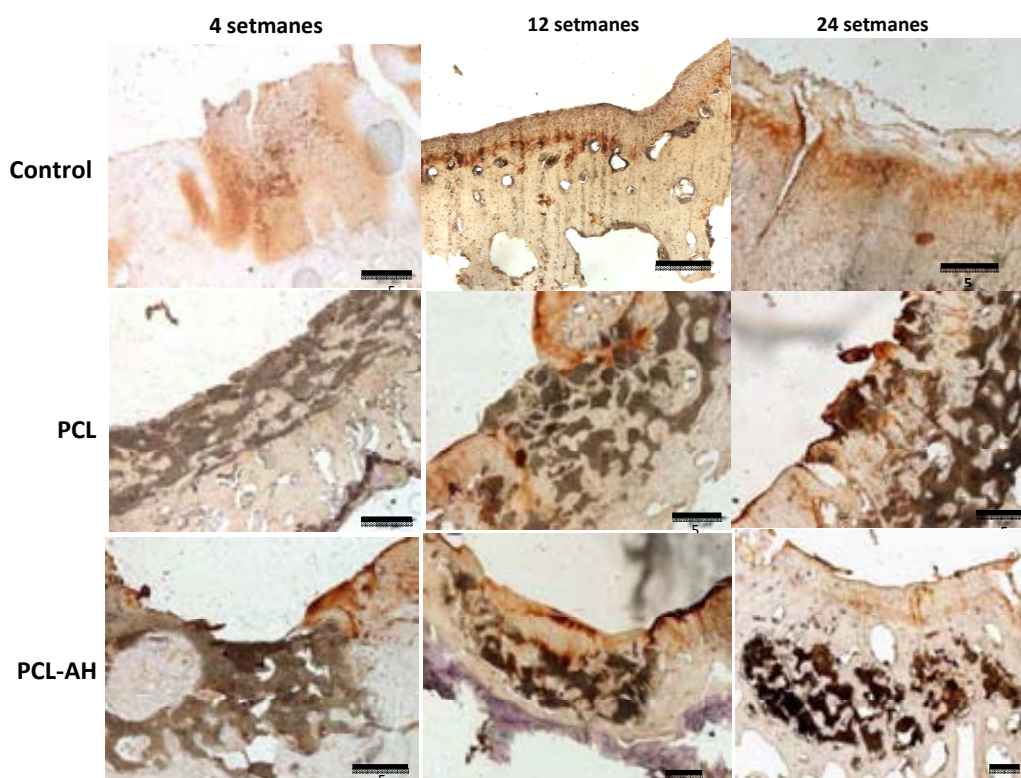


Figura 19. Preparacions immunohistoquímiques per a col·lagen tipus II en reparacions a les 4, 12 i 24 setmanes (Escala 500 µm). **Control:** grup control; **PCL:** mostra reparada amb matriu de PCL; **PCL-AH:** mostra reparada amb matriu de PCL-AH.

Pràcticament no es va evidenciar la presència de col·lagen tipus I a les mostres reparades amb matrius de suport a les 4, 12 i 24 setmanes, en el gruix de cartílag neofomat, si bé la seva tinció va ser positiva a la zona profunda mineralitzada. Al grup control la presència de col·lagen tipus I va ser abundant, sobre tot a les 24 setmanes, sent compatible amb una reparació del teixit de tipus fibrocartílag. A les 24 setmanes, les mostres reparades amb matrius de suport de PCL-AH presentaven una fina capa de col·lagen tipus I visible a la superfície del cartílag. No es va evidenciar aquesta capa de col·lagen tipus I en les mostres reparades amb les matrius de suport de PCL-AH.

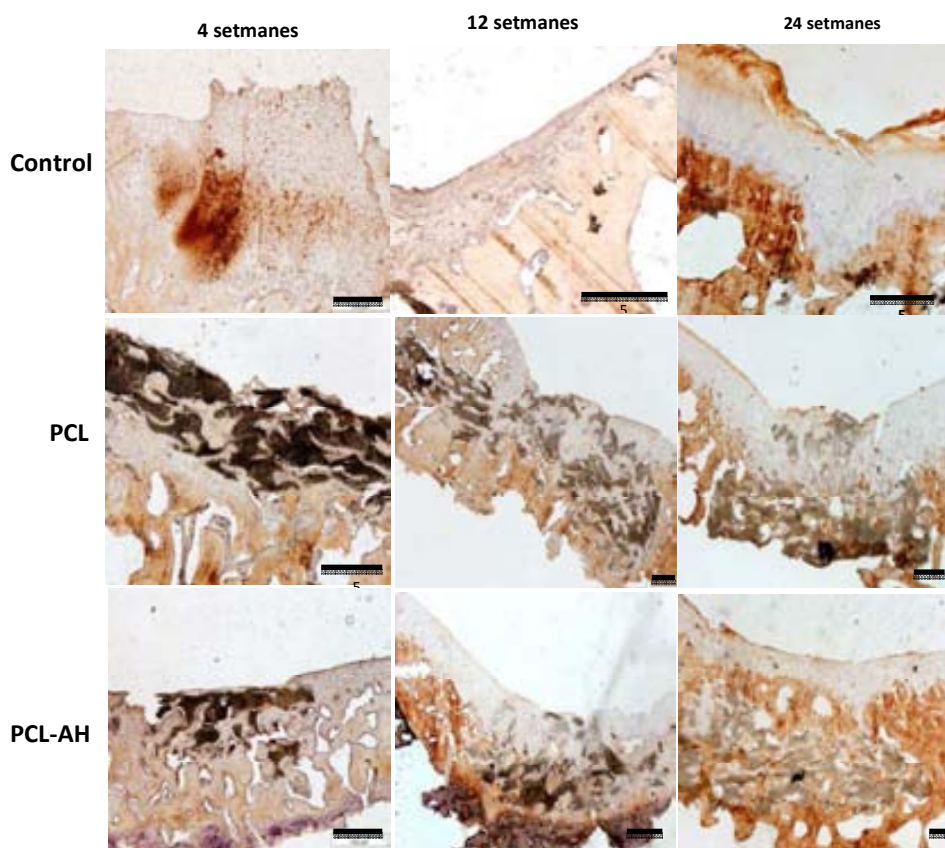
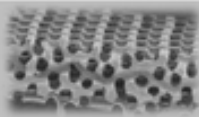


Figura 20. Preparacions immunohistoquímiques per a col·lagen tipus I en reparacions a les 4, 12 i 24 setmanes (escala 500 µm). **Control:** grup control; **PCL:** mostra reparada amb matriu de PCL; **HA:** mostra reparada amb matriu de PCL-AH.



RESULTATS: Treball nº 2

L'estudi de la proliferació cel·lular es va realitzar amb el marcador Ki-67. Es va evidenciar una reparació cel·lular controlada i a les zones superficials, en els espècimens als que se'ls hi havia implantat matrius de suport. En els controls es va observar una gran proliferació cel·lular però desestructurada.

PCL

PCL-AH

Control

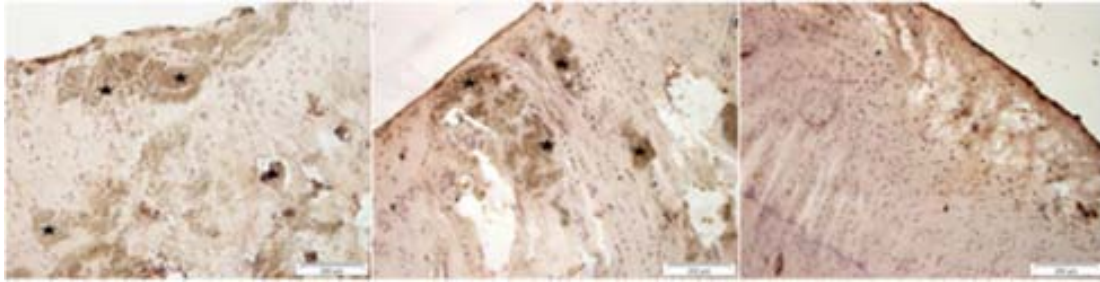
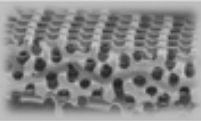
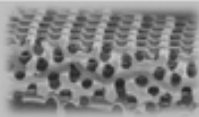


Figura 21. Preparacions immunohistoquímiques per a Ki-67 en reparacions a les 24 setmanes (escala 200 μm). Les marques tipus "estrella" indiquen la presència de restes de matriu de suport. **Control:** grup control; **PCL:** mostra reparada amb matriu de PCL; **PCL-AH:** mostra reparada amb matriu de PCL-AH.





7. DISCUSSIÓ

La discussió s'ha agrupat en 2 blocs; primerament és discutiran els resultats obtinguts en el treball n° 1 i després els del treball n° 2.

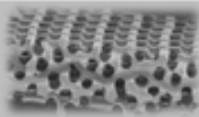
Treball n° 1

Martínez-Díaz S, Garcia-Giralt N, Lebourg M, Gómez-Tejedor JA, Vila G, Caceres E, Benito P, Pradas MM, Nogues X, Gómez-Ribelles JL, Monllau JC.

In vivo evaluation of three-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits.

Am J Sports Med. 2010 Mar;38(3):509-19.

Aquest treball es va centrar en avaluar la capacitat de reparació *in vivo* de lesions condrials creades al cartílag articular de la troclea femoral del conill (com a model experimental), de les matrius de suport de PCL. Es va seleccionar el conill *New Zealand* ja que és una espècie molt dòcil, té un tamany de fàcil maneig i manipulació. A més, com els conills tenen una vida mitja curta, els processos de reparació es produeixen amb més rapidesa. Finalment, diferents autors han demostrat una resposta immunològica mínima quan es trasplanten condrocits al·logènics en el conill (120-123) . Per altra banda, sabem que hi ha certes diferències entre la morfologia i la cinemàtica del conill i de l'humà (136) però no s'ha trobat cap model experimental ideal i validat per a realitzar estudis biomecànics (137). Per els nostres estudis, el conill s'adequa bastant degut als seus aspectes biològics, d'ultraestructura (138), creixement (139) i deteriorament progressiu (140).



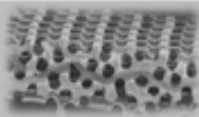
DISCUSSIÓ: Treball nº 1

El primer pas va ser avaluar la qualitat del cartílag a implantar estudiant les mostres de matrius de suport PCL sembrades amb condrocits i les mostres de pèl·let de condrocits, preparades en paral·lel. Els resultats immunohistològics de les mostres preparades amb matrius de suport de PCL sembrades amb condrocits al·logènics i les preparades amb pèl·lets, van ser similars als obtinguts prèviament en altres estudis del nostre grup (16, 17). En tots els casos a les mostres es va evidenciar la capacitat de síntesi de proteïnes específiques del cartílag articular hialí sa.

Als 3 mesos post-implantació, es van sacrificar els animals i es va realitzar l'anàlisi macro i microscòpic tal i com s'ha comentat prèviament. Macroscòpicament es va evidenciar una reparació parcial en diferents graus en tots els casos. En alguns casos de reparacions amb matrius de suport de PCL sembrades amb condrocits al·logènics i de matrius de suport de PCL sense cèl·lules amb lesions subcondrals, era difícil diferenciar el teixit neofomat del teixit sa circumdant. Les reparacions amb pèl·let mostraven una coloració més blanquinosa que el teixit sa però la rigidesa era similar. En cap cas es va detectar cap signe d'infecció, sinovitis o rebuig del material.

La regeneració del cartílag va ser bona en els casos en que es van implantar matrius de suport de PCL sembrades amb condrocits al·logènics i en els que es van implantar matrius de PCL sense condrocits però realitzant lesions subcondrals. En els casos restants (reparacions amb pèl·let, matrius de suport de PCL sense cèl·lules i sense realització de lesió subcondral, i lesions subcondrals sense matrius ni condrocits implantats) aquesta regeneració va ser menys eficient.

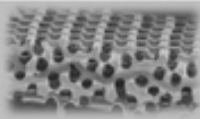
El transplantament autòleg de condrocits (ACI) s'ha considerat el *Gold Standard* en la reparació de lesions condrals a la pràctica clínica habitual amb éssers humans (1-3). Es va considerar que la reparació realitzada al treball nº 1 amb pèl·let de condrocits al·logènics recoberts amb periosti com l'equiparable a aquest procés. Per aquest motiu es van fer servir els espècimens als que se'ls va reparar el defecte amb un pèl·let de condrocits recobert amb periosti per a comparar-lo biomecànicament amb els que es van reparar amb matrius sembrades amb condrocits al·logènics. Tal com hem comentat, vam obtenir millors resultats biomecànics en les lesions reparades amb matrius de suport de PCL i condrocits al·logènics, que les reparades amb pèl·let (**Figura 14**).



DISCUSSIÓ: Treball nº 1

A les **Figures 13 A i 13 B** podem observar com la regeneració tissular es bastant diferent quan la matriu implantada amb condrocits es col·loca evitant l'aport sanguini (sense lesió subcondral) i quan s'implanta sense condrocits i s'espera obtenir la regeneració a partir de les cèl·lules (*stem cells*) que fluiran a la zona lesionada a partir de la lesió subcondral. En el primer cas es va observar que als 3 mesos els porus de la matriu s'havien omplert de teixit cartilaginós, la matriu mantenia la seva forma original i posició ja que tal i com s'ha mencionat abans, la cinètica de reabsorció de la PCL és molt lenta. Per tant, encara es podia trobar *in situ* la matriu després dels 3 mesos, és a dir, durant tot l'experiment la matriu va ser biomecànicament activa i segurament va contribuir a que el teixit neoformat tingués una morfologia similar al cartílag sa. Les cèl·lules que ocupen els porus de les matriu estan subjectes a forces de compressió similars a les forces que pateix el teixit cartilaginós sa (141-143). Aquestes forces sembla que influeixen en la morfologia i les característiques del cartílag que es formarà. A l'estudi biomecànic es va observar que els defectes que es van reparar amb un pèl·let de condrocits, on les cèl·lules microscòpicament s'organitzen més pobrament, també mostraven un mòdul elàstic menor, i per tant amb unes característiques biomecàniques diferents a les del cartílag natiu (Figura 14).

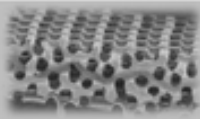
En els espècimens en els que es va implantar una matriu de suport sense condrocits, però estimulant l'aport sanguini (realitzant perforacions subcondrals) a envair la zona lesionada, el nou teixit es va formar a la part superior de la matriu (**figura 11 B**). Aquest teixit va presentar característiques histològiques similars a les del cartílag hialí amb la formació de columnes de condrocits perpendiculars a la superfície articular, tot i que sobrepasant la matriu de suport i progressant cap a la zona subcondral. Les imatges van evidenciar també que el teixit format dins els porus de les matrius de suport era deficient. Per tant podem considerar que l'adhesió entre el teixit neoformat i el biomaterial va ser bastant pobre. Aquest comportament pot ésser degut al caràcter hidròfob de la PCL, cosa que no afavoreix l'ompliment dels porus amb l'aportació sanguínia durant la implantació. Aquests resultats obtinguts amb les matrius de suport de PCL sense ser sembrades amb condrocits, ens deixaven la porta oberta a testar nous materials més hidrofílics que la PCL i que afavorissin la invasió cel·lular. Fruït d'aquests resultats, vam començar a desenvolupar les matrius de suport de PCL-AH que donarien pas al treball nº 2 que presentem.



DISCUSSIÓ: Treball nº 1

Els resultats obtinguts en el treball nº1 van ser similars als obtinguts per altres grups, que també han demostrat bons resultats per a la reparació condral utilitzant matrius de suport tridimensionals sembrades amb condrocits al·logènics en el conill (144, 145).

Tot i que la PCL és biodegradable, la seva taxa de degradació és molt lenta i manté totes les seves propietats durant un temps bastant llarg. En el treball nº 1 va quedar demostrat, que després de 3 mesos de ser implantada a les lesions condral creades a la tròclea femoral del conill, no s'havia degradat completament. Aquest últim fet que comentem també ens va fer plantejar-nos un nou treball amb implantacions de les matrius més llargues per a estudiar la seva degradació en el temps. Per aquest motiu el treball nº 2 es va dissenyar amb eutanàxies dels espècimens progressives en el temps, amb un màxim de 6 mesos, i així poder valorar el grau de degradació de les matrius durant l'estudi.



Treball nº 2

Lebourg M, Martínez-Díaz S, García-Giralt N, Torres-Claramunt R, Gómez-Ribelles JL, Vila-Canet G, Monllau JC.

Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic acid-polycaprolactone scaffolds: A study in vivo.

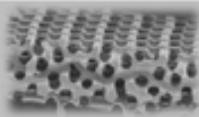
J Biomater Appl. 2014 May;28(9):1304-15.

En aquest treball es va avaluar la capacitat de les matrius de suport de PCL i les matrius de suport de PCL-AH per a reparar lesions condrials *in vivo* utilitzant el conill com a model experimental.

L'addició d'àcid hialurònic a les matrius de suport de PCL ha demostrat que no modifica les característiques estructurals d'aquesta matriu. Aquesta addició d'àcid hialurònic sembla li confereix unes millors condicions que a les matrius només conformades de PCL per a la invasió cel·lular, ja que les dota d'una major hidrofília (116).

Es va utilitzar el conill *New Zealand* de les mateixes característiques i amb els mateixos protocols quirúrgics i d'estabulació que en el treball nº 1 amb la finalitat que els resultats foren comparables. Les justificacions per a la utilització del conill van ser les mateixes que en el treball nº 1.

La realització de perforacions subcondrials (amb tècniques com les microfractures) s'ha mostrat efectiva per a la reparació de lesions condrials ja que el sagnat que provoquen sembla afavorir la migració de cèl·lules mesenquimals pluripotencials (*stem cells*) de la placa subcondrial (146). La implantació d'una matriu durant aquest procés té la finalitat de proporcionar una estructura tridimensional per al desenvolupament d'aquestes cèl·lules i la seva diferenciació a condrocits. En aquest treball es va demostrar la invasió cel·lular i el desenvolupament de teixit viable en els porus de les matrius de suport, a partir de les 4 setmanes de la seva implantació.

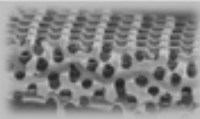


DISCUSSIÓ: Treball nº 2

Estudis previs demostren que la implantació d'una matriu de suport en un defecte osteocondral es veu sotmès a unes forces de compressió dinàmiques, que condicionen el seu desplaçament en profunditat a la capa subcondral. Tan mateix, aquest procés afavoreix l'ocupació superficial per un teixit cartilaginós amb característiques morfològiques i immunohistològiques de cartílag hialí sa (147).

L'origen de les cèl·lules responsables de la reparació de la capa superficial de cartílag en aquestes lesions és incert. En el treball nº 1 es va demostrar la capacitat de regenerar lesions condral amb matrius de suport sembrades amb condrocits al·logènics sense provocar lesions ni sagnat subcondral. Aquestes matrius romanien al defecte després de 3 mesos, sense penetrar en l'os subcondral. Quan es van provocar lesions subcondral i es van implantar matrius sense sembrar amb condrocits, la matriu era desplaçada a l'os subcondral i es formava un teixit de característiques cartilaginoses a la superfície, de forma similar que a l'estudi comentat prèviament (147). Per tant, sembla que les cèl·lules mesenquimals pluripotencials han de tenir un paper en la invasió de la matriu i en la formació del cartílag en la superfície de la lesió.

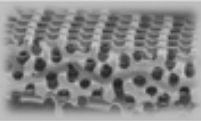
Per altra banda, sembla que pugui haver un paper del cartílag circumdant en la reparació d'aquestes lesions, probablement sota la influència de factors de creixement paracrins. En el treball nº 2, es va evidenciar en primer lloc com el cartílag hialí circumdant envaeix la matriu i la desplaça a l'os subcondral (Figura 19; PCL-12 setmanes de la figura de immunohistoquímica col·lagen tipus II). En segon lloc, es va evidenciar una major proliferació cel·lular a la superfície del cartílag neofomat com es pot apreciar a la Figura 21 a les 24 setmanes. Aquest fenomen pot ser específic de l'espècie, com seria el cas del conill que té una alt potencial regeneratiu, sobre tot quan s'utilitzen espècimens joves (148). Altres estudis per a la reparació de lesions condral amb matrius de suport al conill, demostren també la regeneració superficial del cartílag i el desplaçament a la capa subcondral de la matriu (149, 150). La capa superficial del cartílag conté cèl·lules amb major activitat proliferativa i afinitat per a la fibronectina (151, 152). Per tant, la participació de la capa superficial del cartílag no es pot descartar i podria explicar les troballes observades. En els casos en els que es realitzen defectes osteocondral o perforacions, la secreció de factors paracrins per les cèl·lules mesenquimals pluripotencials de la medul·la òssia podria afavorir aquesta resposta (153). També podria ser atribuïble a la presència de la matriu de suport, el que proporcionaria un entorn biomecànic definit i podria facilitar la migració cel·lular.

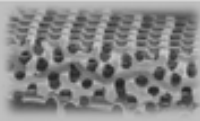


DISCUSSIÓ: Treball nº 2

Es va observar una millor qualitat del teixit de reparació a nivell macroscòpic quan es van implantar matrius de suport de PCL-AH, que quan estaven conformades només de PCL. Histològicament els 2 tipus de matrius de suport van ser fàcilment colonitzades i es van integrar al teixit circumdant. Si bé, en les mostres de 12 i 24 setmanes, les matrius de suport de PCL-AH s'havien integrat més ràpidament a l'os subcondral que les constituïdes només per PCL, el que suggereix que les propietats de l'àcid hialurònic podrien accelerar la colonització del porus i per tant de la regeneració del cartílag.

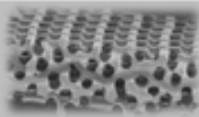
Tant l'ICRS com l'OAS han sigut validats per a l'avaluació macroscòpica amb imatges obtingudes amb artroscòpia de lesions de cartílag articular reparades amb microfractures o ACI als 12 mesos (132). Les reparacions macroscòpiques observades al treball nº 2 i valorades amb aquestes escales han sigut millors a les 24 setmanes pel grup al que es va implantar les matrius de suport de PCL-AH. Assumim que les puntuacions obtingudes a la 1^a i 4^a setmanes després de la cirurgia no es poden considerar vàlides, ja que paràmetres com ara la profunditat del defecte, no són valorables en aquest curt termini de temps. No obstant, les valoracions a partir de les 12 setmanes es podrien considerar vàlides ja que es corroboren amb els estudis microscòpics.





8. CONCLUSIONS

Les conclusions s'han estructurat en 3 apartats. Primerament s'exposaran les conclusions particulars de cadascun dels dos treballs experimentals. Finalment, s'analitzen conjuntament les conclusions d'ambdós treballs i es reflexiona sobre el futur d'aquesta línia de recerca.



8.1. Conclusions del Treball nº 1

Martínez-Díaz S, Garcia-Giralt N, Lebourg M, Gómez-Tejedor JA, Vila G, Caceres E, Benito P, Pradas MM, Nogues X, Gómez-Ribelles JL, Monllau JC.

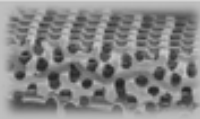
In vivo evaluation of three-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits.

Am J Sports Med. 2010 Mar;38(3):509-19.

Hipòtesi del treball 1.

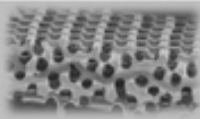
Les matrius de suport tridimensional de PCL sembrades amb condrocits al·logènics de conill proporcionen una millor capacitat de reparar les lesions condrials realitzades a la tròclea femoral del conill amb un teixit amb característiques similars al cartílag hialí sa, que la reparació d'aquesta lesió amb condrocits al·logènics de conill sembrats en monocapa (pèl·let), les matrius de PCL sense condrocits sembrats amb perforacions subcondrials, les matrius de PCL sense condrocits sembrats i sense perforacions subcondrials i que les lesions sense implants ni condrocits al·logènics sembrats amb perforacions subcondrials.

- Als 3 mesos de la seva implantació, les matrius de suport tridimensional de PCL sembrades amb condrocits al·logènics han aconseguit una reparació completa de les lesions condrials creades a la tròclea femoral del conill. El cartílag neofomat ha mostrat bona integració, distribució espacial dels condrocits i formació de matriu extracel·lular amb histologia de cartílag hialí sa.



CONCLUSIONS: Treball nº 1

- Les matrius de suport tridimensional de PCL han mantingut la seva integritat estructural després de la implantació i han guiat el creixement del nou teixit, tant quan han estat implantades amb condrocits al·logènics com quan s'han implantat aïllades, sense cèl·lules, en defectes condrials tractats amb perforacions subcondrials.
- Les propietats biomecàniques del teixit neofomat en els espècimens on s'han implantat matrius tridimensionals de PCL i condrocits al·logènics, són similars a les del cartílag natiu i millors que les obtingudes amb la sembra de condrocits en monocapa (pèl·let).
- Els resultats obtinguts amb les matrius de suport tridimensional de PCL que s'han implantat aïllades (sense cèl·lules) però combinades amb perforacions subcondrials també han estat satisfactoris. Les característiques histològiques han estat similars a les del cartílag hialí, encara que qualitativament inferiors a les obtingudes per les matrius tridimensionals de PCL sembrades amb condrocits al·logènics. Els pitjors resultats, macroscòpics i histològics, s'han obtingut quan les matrius de suport tridimensional de PCL no estaven sembrades amb condrocits i no s'han realitzat perforacions subcondrials.



8.2. Conclusions del Treball nº 2

Lebourg M, Martínez-Díaz S, García-Giralt N, Torres-Claramunt R, Gómez-Ribelles JL, Vila-Canet G, Monllau JC.

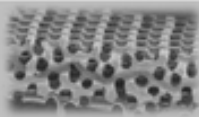
Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic acid-polycaprolactone scaffolds: A study in vivo.

J Biomater Appl. 2014 May;28(9):1304-15.

Hipòtesi del treball 2.

Les matrius de suport tridimensional de PCL-AH proporcionen una millor capacitat per a reparar les lesions condrials realitzades a la tròclea femoral del conill i es degraden més ràpidament que les matrius de suport tridimensional de PCL.

- Les matrius de suport tridimensional de PCL i de PCL-AH, combinades amb perforacions subcondrials són capaces de reparar les lesions condrials produïdes a la tròclea femoral del conill, amb bona qualitat del teixit neofomat, a partir de les 12 setmanes de la seva implantació.
- Cap a les 24 setmanes, els implants es troben a l'interior de la capa subcondrial i el teixit cartilaginós neofomat recobreix la part superior de la matriu.
- L'addició d'àcid hialurònic a les matrius de suport tridimensional de PCL, en aquest model experimental, ha augmentat la qualitat, organització, velocitat de degradació de la matriu i velocitat de regeneració del teixit cartilaginós neofomat.



8. NEXE D'UNIÓ DELS DOS TREBALLS

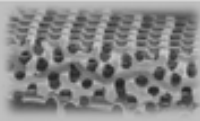
En el primer treball es va demostrar la utilitat de les matrius de suport tridimensional de PCL sembrades amb condrocits al·logènics per a la reparació de lesions condrials en un model experimental. A més, es va constatar l'important paper que juguen aquestes matrius de suport en l'obtenció d'un teixit neofomat amb adequada disposició espacial dels condrocits i de la matriu extracel·lular, qüestió aquesta que proporciona al cartílag hialí les seves especials característiques biomecàniques.

A partir d'aquests resultats i amb la idea d'avançar en la obtenció d'un model de reparació condrial ideal, es va treballar en dos sentits. Per una banda, es va intentar millorar el suport tridimensional. Així es va desenvolupar una modificació química de la matriu de suport de PCL mitjançant l'addició d'àcid hialurònic, que teòricament la faria més porosa i hidròfila, millorant la seva integració i taxa de degradació.

D'altra banda, degut a que l'obtenció de condrocits i el seu posterior cultiu, és un factor limitant; és necessària una cirurgia prèvia i el seu posterior cultiu encareix enormement aquest procediment en la pràctica clínica humana, es va dissenyar un nou model de reparació. En aquest model es van afegir microfractures (perforacions subcondrials) a les lesions condrials com a tècnica alternativa a la sembra de condrocits, per a obtenir la cel·lularitat necessària provinent de les *stem cells* de l'os subcondrial i que aquestes col·laboressin en el procés de regeneració cartilaginosa.

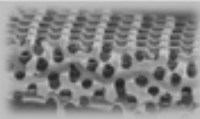
Finalment, donat que en el primer treball, amb seguiment de 3 mesos (habitual en aquest tipus d'estudis), es va evidenciar una degradació incompleta de les matrius de suport de PCL, en el segon treball es va augmentar fins a 6 mesos el temps de seguiment per tal de monitoritzar convenientment el procés de degradació dels implants.

Els resultats del segon treball, van demostrar que les matrius de suport tridimensional de PCL-AH sense la necessitat de ser sembrades amb condrocits, obtenen un teixit neofomat de millor qualitat i organització i que, a més, es regenera més ràpid. La taxa de degradació d'aquests implants als que se'ls hi ha afegit l'àcid hialurònic, sembla també més accelerada. No



CONCLUSIONS

obstant, malgrat la bona qualitat del teixit regenerat, l'existència d'implants situats a l'interior de l'os subcondral fa reflexionar sobre el possible paper de les perforacions subcondrals (microfractures) en comprometre la integritat de l'os subcondral, qüestió aquesta darrera que cal seguir investigant.



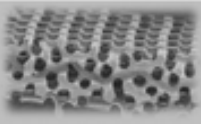
9.1. CÒPIA DEL TREBALL N° 1:

Martínez-Díaz S, Garcia-Giralt N, Lebourg M, Gómez-Tejedor JA, Vila G, Cáceres E, Benito P, Pradas MM, Nogues X, Gómez-Ribelles JL, Monllau JC.

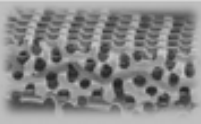
In vivo evaluation of three-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits.

Am J Sports Med. 2010 Mar;38(3):509-19.

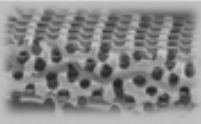
In vivo evaluation of three-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits.



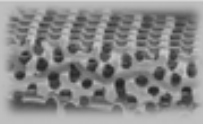
CÒPIA DEL Treball nº 1



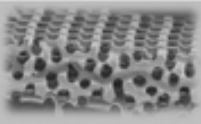
CÒPIA DEL Treball nº 1



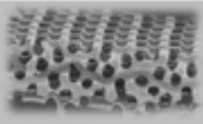
CÒPIA DEL Treball nº 1



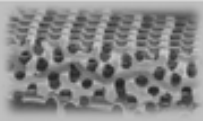
CÒPIA DEL Treball nº 1



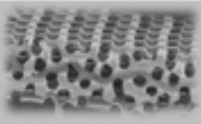
CÒPIA DEL Treball nº 1



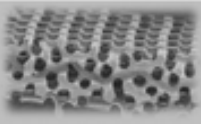
CÒPIA DEL Treball nº 1



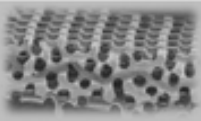
CÒPIA DEL Treball nº 1



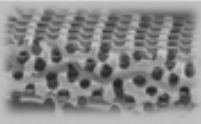
CÒPIA DEL Treball nº 1



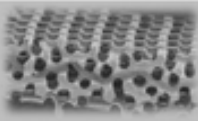
CÒPIA DEL Treball nº 1



CÒPIA DEL Treball nº 1



CÒPIA DEL Treball nº 1



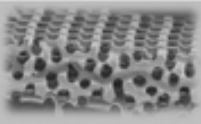
9.2. CÒPIA DEL TREBALL N° 2:

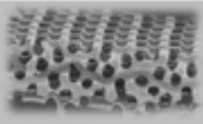
Lebourg M, Martínez-Díaz S, García-Giralt N, Torres-Claramunt R, Gómez-Ribelles JL, Vila-Canet G, Monllau JC.

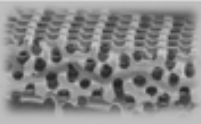
Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic acid-polycaprolactone scaffolds: A study in vivo.

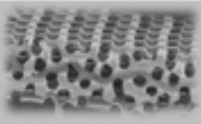
J Biomater Appl. 2014 May;28(9):1304-15.

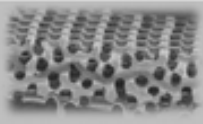
Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic acid-polycaprolactone scaffolds: A study in vivo.

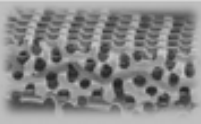


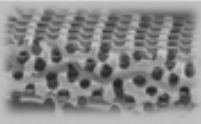


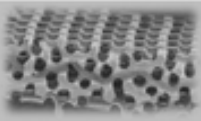


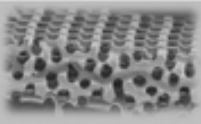


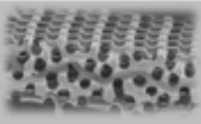


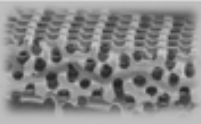


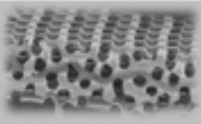


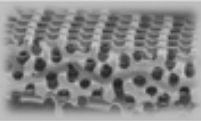


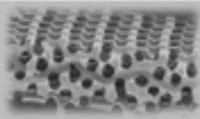






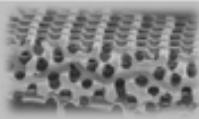






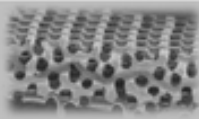
10. BIBLIOGRAFIA:

- 1.** Schindler OS. Current concepts of articular cartilage repair. *Acta Orthop Belg.* 2011 Dec;77(6):709-26. Review.
- 2.** Newman AP. Articular cartilage repair. *Am J Sports Med.* 1998 Mar-Apr;26(2):309-24. Review.
- 3.** Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:58-69.
- 4.** 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.
- 5.** Brittberg M, Peterson L, Sjögren-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.
- 6.** Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 May;(374):212-34.
- 7.** Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med.* 2010 Jun;38(6):1117-24.
- 8.** Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation--technique and long-term follow-up. *Injury.* 2008 Apr;39 Suppl 1:S40-9.



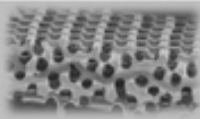
BIBLIOGRAFIA

9. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol*. 2006 Jan;18(1):64-73. Review.
10. Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI. Cartilage regeneration using principles of tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*. 2001 Oct;(391 Suppl):S161-70. Review.
11. Brittberg M, Peterson L, Sjögren-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.
12. Brittberg M. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am J Sports Med*. 2010 Jun;38(6):1259-71.
13. Cebamanos J. Estudio experimental en el conejo del proceso de reparación de los defectos osteocondrales mediante el empleo de un injerto de periostio y un biomaterial (Tesis Doctoral). Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 1992.
14. Martin C. Estudio mecánico, histológico e histomorfométrico del regenerado de cartílago a partir de injertos de periostio invertido (Tesis Doctoral). Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2001.
15. Martin-Hernandez C, Cebamanos-Celma J, Molina-Ros A, Ballester-Jimenez JJ, Ballester-Soleda J. Regenerated cartilage produced by autogenous periosteal grafts: a histologic and mechanical study in rabbits under the influence of continuous passive motion. *Arthroscopy*. 2010 Jan;26(1):76-83.
16. Garcia-Giralt N, Izquierdo R, Nogués X, Perez-Olmedilla M, Benito P, Gómez-Ribelles JL, Checa MA, Suay J, Caceres E, Monllau JC. A porous PCL scaffold promotes the human chondrocytes redifferentiation and hyaline-specific extracellular matrix protein synthesis. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jun 15;85(4):1082-9.



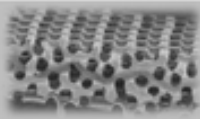
BIBLIOGRAFIA

- 17.** Izquierdo R, Garcia-Giralt N, Rodriguez MT, Cáceres E, García SJ, Gómez-Ribelles JL, Monleón M, Monllau JC, Suay J. Biodegradable PCL scaffolds with an interconnected spherical pore network for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Apr;85(1):25-35.
- 18.** Lebourg M, Sabater Serra R, Más Estellés J, Hernández Sánchez F, Gómez-Ribelles JL, Suay Antón J. Biodegradable polycaprolactone scaffold with controlled porosity obtained by modified particle-leaching technique. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 May;19(5):2047-53.
- 19.** O'Rahilly R, Gardner E. The embryology of movable joints; in Sokoloff L (ed): *The Joints and Synovial Fluid*. New York, Academic Press, 1978; pp. 49-103.
- 20.** Clark CR, Ogden J. Development of human knee joint menisci: Relationship to childhood meniscal injury. *J Bone Joint Surg* 1983 (Am); 65: 538-547.
- 21.** Andersen M, Bro-Rasmussen F. Histochemical studies on the histogenesis of the joint in human foetuis with special reference to the development of joints cavities in the hand and foot. *Am J Anat* 1961; 108: 111-122.
- 22.** Drachman DB, Sokoloff L. The role of movement in embrionic joint development. *Dev Biol* 1966;14: 401-420.
- 23.** Ruano-Gil D, Nardi J, Tejedo A. Influence of extrinsic factors in the development of the articular system. *Acta Anat* 1978; 101: 36-44.
- 24.** Ruano-Gil D, Nardi Vilardaga J, Teixido-Johe A. Embryonal hypermobility and articular development. *Acta Anat* 1985; 123: 90-92.



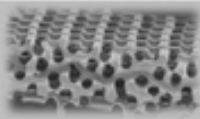
BIBLIOGRAFIA

25. Chun JS, Oh H, Yang S, Park M. Wnt signaling in cartilage development and degeneration. *BMB Rep.* 2008;41(7):485-94.
26. Stockwell RA. The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat* 1967; 101: 753-763.
27. Hamerman D, Rosemberg LC, Schubert M. Diarthrodial joints revisited. *J Bone Joint Surg (Am)* 1970; 52: 725-774.
28. Anderson CE. The structure and function of cartilage. *J Bone Joint Surg (Am)* 1962; 44: 777-786.
29. Lane Smith R, Trindade MC, Ikenoue T, Mohtai M, Das P, Carter DR, Goodman SB, Schurman DJ. Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology.* 2000;37(1-2):95-107.
30. So CL, Kaluarachi, Tam PPL, Cheah KSE. Impact of mutations of cartilage matrix genes on matrix structure, gene activity and chondrogenesis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001; 9 (suppl. A):S160-S173.
31. Mundlos S, Zabel B. Development expression of human cartilage matrix protein. *Dev Dyn* 1994; 199: 241-252.
32. Heinegaard DK, Franzen A, Hedbon E, Sommarin Y. Common structures of the core proteins of interstitial proteoglycans. A: VC Hascall (ed.). *Function of proteoglycans.* New York: Wiley, 1986; 69-88.
33. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: Many forms, many functions. *FASEB J*, 1992; 6: 861-870.



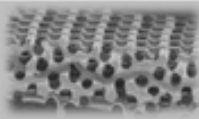
BIBLIOGRAFIA

- 34.** Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; 427:152-62.
- 35.** Fawns HT, Landells JW. Histochemical studies of rheumatic conditions. I. Observations on the fine structure of the matrix of normal bone and cartilage. *Ann Rheum Dis.* 1953; 12: 105-113.
- 36.** Hunter W. On the structure and diseases of articulating cartilages. *Trans R Soc London.* 1743; 6: 514-521.
- 37.** Benninghoff A. Form und Bau der Gelekknorpel in ihren Beziehungen zur Function. II Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Function. *Zeitschrift für Zellforschung and mikroskopische Anatomie.* 1925; 2: 783-862.
- 38.** MacConaill MA. The movements of bones and joints. 4. The mechanical structure of articulating cartilage. *J. Bone Joint Surg.* 1951(Br); 33: 251-257.
- 39.** Clark JM. The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *J Anat.* 1990; 171: 117-130.
- 40.** Maroudas A, Bullough P, Swanson SAV, Freeman MAR. The permeability of articular cartilage. *J Bone Joint Surg. (Br)* 1968; 50: 166-177.
- 41.** Buckwalter JA, Hunziker E, Rosemberg L, Coutts R et al. Articular Cartilage: Composition and structure, in Woo SL, Buckwalter JA (eds) *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues.* Park Ridge IL, AAOS, 1988, pp. 405-425. 27.
- 42.** Trueta J. *La estructura del cuerpo humano. Estudios sobre su desarrollo y decadencia.* Barcelona: Labor; 1974.



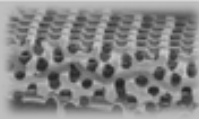
BIBLIOGRAFIA

43. Fisher AGT. Contribution to the pathology and etiology of osteo-arthritis: with observagtions upon the principles underlying its surgical treatment. *British J Surg.* 1922; 10: 52-80.
44. Simon WH, Friedemberg S, Richardson S. Joint congruence. *J Bone Joint Surg. (Am)* 1973; 1614-1620.
45. Ely LW, Mensor MC. Studies on the inmovilization of normal joints. *Surg Gynec Obstet.* 1933; 57: 212-215.
46. Salter RB, Field P. The effects of continous compression on living articular cartilage. *J Bone Joint Surg. (Am)* 1960; 42: 31-49.
47. Thaxter TH, Mann RA, Anderson CE. Degeneration of immobilized knee joints in rats. *J Bone Joint Surg. (Am)* 1965; 47: 567-585.
48. Ficat C. Les contusions du cartilage. *Rev. Chirg. Orthop.* 1976; 62: 493-500.
49. Ficat P. *Cartilage et Arthrose.* Paris. Masson. 1978.
50. Ficat P. Artrosis post-contusión del cartilago rotuliano. Estudio experimental y clínico. Madrid. *Artrosis: Fundació MAPFRE* 1985; 20: 21-34.
51. Radin EL, Ehrlich MG, Chernac R, Abernethy P, Paul IL, Rose R. Effect of repetitive impulse loading on the knee joint of rabbit. *Clin Orthop.* 1978; 131: 288-293.
52. Dekel S, Weissman SL. Joints changes after overuse and peak overloading of rabbit knees in Vivo. *Acta Orthop Scand.* 1978; 49: 519-528.



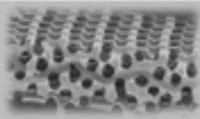
BIBLIOGRAFIA

- 53.** Donohue JM, Oegema TR, Thompson RC. The zone of calcified cartilage: The focal point of changes following blunt trauma to articular cartilage. *Trans Orthop Res.* 1986; 32: 233.
- 54.** Tomatsu T, Takeuchi N, Takahashi K, Kimura N. Experimentally produced fractures of articular cartilage and bone. The effects of shear forces on the pig knee. *J Bone Joint Surg. (Br)* 1992; 74: 457-462.
- 55.** Meachim G. The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit. *J Bone Joint Surg. (Br)* 1963; 45: 150-161.
- 56.** Ghadially FN. Fine structure of sinovial joints. A text and atlas of the ultrastructure of normal and pathological articular tissues. London. Butterworths. 1983.
- 57.** Thompson RC. An experimental study of surface injury to articular cartilage and enzymes responses within the joint. *Clin Orthop* 1975; 107: 239-248.
- 58.** Cheung HS, Cottrell WH, Stephenson K, Nimmi ME. In Vitro collagen biosynthesis in healing and normal rabbit articular cartilage. *J Bone Joint Surg. (Am)* 1978; 60: 1076-1081.
- 59.** Schmid A, Schmid F. Results after cartilage shaving studied by electron microscopy. *Am J Sports Med.* 1987; 15: 386-387.
- 60.** Bennet GA Bauer W., Further studies concerning the repair of articular cartilage in dog joints. *J Bone Joint Surg.* 1935; 17: 141-150.
- 61.** Calandruccio RA, Gilmer Ws Jr. Proliferation, regeneration, and repair of articular cartilage of immature animals. *J Bone Joint Surg. (Am)* 1962; 44: 431-455.



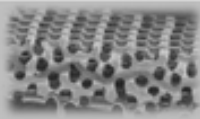
BIBLIOGRAFIA

62. Mankin Hj. Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. I. Growth in immature cartilage. J Bone Joint Surg (Am) 1962; 44: 682-688. (a)
63. Mankin Hj. Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. II. Repair in immature cartilage. J Bone Joint Surg (Am) 1962; 44: 688-698 (b)
64. De Palma Af, Mckeever Cd, Subin Dk. Process of repair of articular cartilage. Demonstrated by histology and autoradiography with tritiated thymidine. Clin Orthop. 1966; 48: 229-242.
65. Reddi AH. Extracellular bone matrix dependent local induction of cartilage and bone. J Rheumatol. 1983; 10 (suppl 11): 67-69.
66. Bobic V, Noble J. Articular cartilage - To repair or not repair. J Bone Joint Surg. 2000 Mar; 82 B(2): 165-6.
67. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. Two to nine year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. Clin Orthop; 2000 May; 374: 212-34.
68. Forriol F. Ingeniería tisular en el cartílago articular: estudio in vivo del proceso de regeneración mediante scaffolds bioestables (Tesis Doctoral). Universidad de Valencia; 2010.
69. Johnstone B, Yoo JU. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. Clin Orthop. 1999 Oct; 366S: 156-62.
70. Bucwalter JA. Evaluation methods of restoring cartilaginous articular surfaces. Clin Orthop. 1999 Oct; 366S: 224-38.



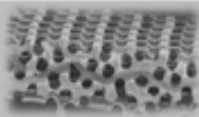
BIBLIOGRAFIA

- 71.** Bucwalter J, Coutts R, Hunziker E, Mow VC. Cartílage articular. Clin Orthop. 1999 Oct; 366S: 239-43.
- 72.** Hunziker E. Biològic repair of articular cartílage: defect models in experimental animals and matrix requeriments. Clin Orthop. 1999 Oct; 366S: 135-46.
- 73.** Neher S, Spector M, Minas T. Histologic analysis of tissue after failed cartílage repair procedures. Clin Orthop. 1999 Aug; 365: 149-62.
- 74.** Kuss WM, Gorecki A, Strzelczyk P, Swiader P. Carbon fiber scaffolds in the surgical treatment of cartílage lesions. Ann Transplant. 1999; 4(3-4): 101-2.
- 75.** Gudas R, Kalesinskas RJ, Kimtys V, Stankevicius E, Toliuisis V, Bernotavicius G, Samily A. 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.
- 76.** Kim SJ, Shin SJ. Loose bodies after arthroscopic osteochondral autograft in osteochondritis dissecans of the knee. Arthroscopy 2000 Oct; 16(7): E16.
- 77.** Onstott AT, Moczó A, Harris NL. Osteochondral autotransfer-newer treatment for chondral defects. AORN J. 2000 Apr; 71 (4): 843-5,848-51.
- 78.** Outerbridge HK, Outerbridge RE, Smith DE. Osteochondral defects in the knee. Clin Orthop. 2000 Aug; 377: 145-51.
- 79.** Solheim E. Mosaicplastý in articular cartílage injuries of the knee. Tidsskr Nor Laegeforen. 1999 Nov 10; 119 (27): 4022-5.



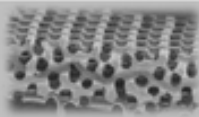
BIBLIOGRAFIA

- 80.** Bruns J, Kersten P, Liese W, Weiss A, Silbermann M. The in vitro influence of different culture conditions on the potential of sheep rib perichondrium to form hyaline-like cartilage. Evaluation of gluing materials used for in vivo graft fixation. *Virchows Arch.* 1994; 424(2): 169-75.
- 81.** Naito K. Chondrogenic potential of a free autogenous periosteal graft for biological resurfacing over a half-thickness defect in anoin surface: an experimental study. *Nippon Seikeifeka Gakkai Zasshi.* 1995 Sep; 69(9):767-75.
- 82.** O'Driscoll SW. Articular cartilage regeneration using periosteum. *Clin Orthop.* 1999 Oct; 366S: 186-203.
- 83.** Tsai CL, Liu TK, Fu SL, Perng JH, Lin AC. Preliminary studi of cartilage repair with autologous periosteum and fibrin adhesive system. *J Formos Med Assoc.* 1992 Sep; 91 Suppl 3: S239-45.
- 84.** Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. Chondrocyte transplantation and experimental treatment options for articular cartilage defects. *Am J Orthop.* 1997 Jun; 26 (6): 396-406.
- 85.** Minas T, Peterson L. Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation. *Clin Sports Med.* 1999 Jan; 18 (1): 13-44.
- 86.** Steinwachs MR, Erggelet C, Lahm A, Gohlke-Steinwachs U. Clinical and cell biology aspects of autologous chondrocytes transplantation. *Unfallchirurg.* 1999 Nov; 102 (11): 855-60.
- 87.** Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes or repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg* 1997 Oct; 79-A(10): 1439-51.



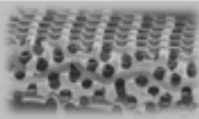
BIBLIOGRAFIA

- 88.** Erggelet C, Broene JE, Fu F, Mandelbaum BR, Micheli LJ, Mosely JB. Autologous chondrocyte transplantation for treatment of cartilage defects of the knee joint. Clinical results. *Zentralbl Chir.* 2000; 125(6): 516-22.
- 89.** Neher S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkreoff Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials.* 1998 Dec; 19 (24): 2313-28.
- 90.** Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S. Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg.* 1999 Nov; 81-B 1064-68.
- 91.** Robert H, Bahaud J. Autologous chondrocyte implantation. A review of technique and preliminary results. *Rev Rhum Engl Ed.* 1999 Dec; 66 (12): 724-7.
- 92.** Robinson D, Ash H, Aviezer D, Agar G, Halperin N, Nevo Z. Autologous chondrocyte transplantation from science fiction to routine clinical practice. *Harefuah.* 2000 Mar; 138 (6): 425-9,520.
- 93.** Robinson D, Ash H, Aviezer D, Agar G, Halperin N, Nevo Z. Autologous chondrocyte transplantation for reconstruction of isolated joint defects: the Assaf Harofeh experience. *Isr Med Assoc J.* 2000 Apr; 2 (4): 290-5.
- 94.** Mont MA, Jones LC, Vofelstein BN, Hungerford DS. Evidence of inappropriate application of autologous cartilage transplantation therapy in a uncontrolled environment. *Am J Sports Med.* 1999 Sep-Oct; 27 (5): 617-20.
- 95.** Behrens P, Ehlers EM, Kochermann KU, Rohwedel J, Russlies M. New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation. *MMW Fortschr Med.* 1999 Nov 11; 141 (45): 49-51.



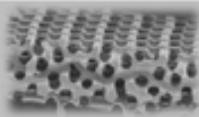
BIBLIOGRAFIA

- 96.** Vacanti CA, Vacanti JP. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am.* 2000 Jul;31(3):351-6.
- 97.** Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science.* 1993 May 14;260(5110):920-6. Review.
- 98.** Garcia DM. Materiales macroporosos biodegradables basados en quitosano para la ingeniería tisular (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Valencia; 2008.
- 99.** Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Ibarra C, Arevalo C, Vacanti CA. Comparative study of the use of poly (glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998; 9 (5): 475-87.
- 100.** Ehlers EM, Fuss M, Rohwedel J, Russlies M, Kuhnek W, Beherens P. Development of a biocomposite to fill out articular cartilage lesions. Light, scanning and transmission electron microscopy of sheep chondrocytes cultured on a collagen I/III sponge. *Anat Anz.* 1999 Dec; 181 (6): 513-8.
- 101.** Marinjnissen WJ, Van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials* 2000 Mar; 21 (6): 571-80.
- 102.** Mow VC, Wang C. Some bioengineering considerations for Tissue Engineering of articular cartilage. *Clin Orthop.* 1999 Oct; 366S: 204-23.
- 103.** Neidel J, Schulzq M. Value of synovial analysis for prognosis of matrix synthesis of transplanted chondrocytes. *Orthopade.* 2000 Feb; 29(2): 158-63.



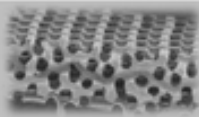
BIBLIOGRAFIA

- 104.** Robinson D, Hasharoni A, Cohen N, Yayon A, Moskowitz RM, Nevo Z. Fibroblast growth factor receptor-3 as a marker for precartilaginous stem cells. *Clin Orthop*. 2000 Oct; 366S:163-75.
- 105.** Sttinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, Planck H, Burmester GR, Bujia J. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res*. 1996 Summer; 33 (2): 57-63.
- 106.** Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE. Cartilage tissue Engineering: Current limitations and solutions. *Clin Orthop*. 1999; 366S: 176-85.
- 107.** Gallardo A, Abraham GA, Elvira C, Vazquez B, San Roman J. Polymeric Matrices for release of growth factors, hormones and other bioactive agents, en "Polymer Based Systems on Tissue Engineering, Replacement and Regeneration, Editores RL Reis i D. Cohn, Kluwer Academic Publishers 2002.
- 108.** Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Bräuer R. Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defectes of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998 Jan;6(1):50-65.
- 109.** Zhou G, Liu W, Cui L, Wang X, Liu T, Cao Y. Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologus bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*. 2006 Nov;12(11):3209-21.
- 110.** Kang SW, Yoon JR, Lee JS, Kim HJ, Lim HC, Park JH, Kim BS. The use of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as injectable cell carriers for cartilage regeneration in rabbit knees. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2006;17(8):925-39.



BIBLIOGRAFIA

- 111.** Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Shirasaki Y, Ochiai N, Tateishi T. The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Dec 15;67(4):1170-80.
- 112.** Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, Vittur F. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*. 2000 Apr;21(8):795-801.
- 113.** Cohen SB, Meirisch CM, Wilson HA, Diduch DR. The use of absorbable co-polymer pads with alginate cells for articular cartilage repair in rabbits. *Biomaterials*. 2003. Jul;24(15):2653-60.
- 114.** Zwingmann J, Mehlhorn AT, Südkamp N, Stark B, Dauner M, Schmal H. Chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes differs in biodegradable PGA/PLA scaffolds. *Tissue Eng*. 2007 Sep;13(9):2335-43.
- 115.** Olmedilla MP, Lebourg M, Ivirico JE, Nebot I, Giralt NG, Ferrer GG, Soria J, Gómez-Ribelles JG. In vitro 3D culture of human chondrocytes using modified ϵ -caprolactone scaffolds with varying hydrophilicity and porosity. *J Biomater Appl*. 2012 Sep;27(3):299-309.
- 116.** Lebourg M, Rochina JR, Sousa T, Mano J, Ribelles JL. Different hyaluronic acid morphology modulates primary articular chondrocyte behavior in hyaluronic acid-coated polycaprolactone scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2013 Feb;101(2):518-27.
- 117.** Patti AM, Gabriele A, Vulcano A, Ramieri MT, Della Rocca C. Effect of hyaluronic acid on human chondrocyte cell lines from articular cartilage. *Tissue Cell*. 2001; 33: 294–300.
- 118.** Yoo HS, Lee EA, Yoon JJ, Park TG. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2005 May; 26: 1925–1933.



BIBLIOGRAFIA

- 119.** Grigolo B, De Franceschi L, Roseti L, Cattini L, Facchini A. Down regulation of degenerative cartilage molecules in chondrocytes grown on a hyaluronan-based scaffold. *Biomaterials*. 2005 Oct; 26: 5668–5676.

- 120.** Masuoka K, Asazuma T, Ishihara M, Sato M, Hattori H, Ishihara M, Yoshihara Y, Matsui T, Takase B, Kikuchi M, Nemoto K. Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Oct; 75 (1): 177-84.

- 121.** Wong MW, Qin L, Tai JK, Lee SK, Leung KS, Chan KM. Engineered allogeneic chondrocyte pellet for reconstruction of fibrocartilage zone at bone-tendon junction—a preliminary histological observation. *J Biomed Mater Res*. 2004 Aug 15; 70 B(2): 362-7.

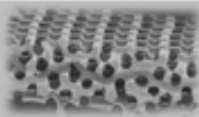
- 122.** Ling JH, Huang JZ, Du J, Cheng Y. Repair of the rabbit ear cartilage defects with transforming growth factor-beta1 and allogeneic chondrocyte/poly-DL-lactide higher porosity polymer. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2004 Jun; 39(6): 340-3.

- 123.** Lu W, Zhang L, Cai Z, Zhou T, Li D. The study of producing allogeneic-tissue engineering cartilage. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2004 Aug; 18(8): 485-7.

- 124.** Darling EM, Anastasiou KA. Biomechanical strategies for articular regeneration. *Ann Biomed Eng*. 2003 Oct;31(9):114-24. Review.

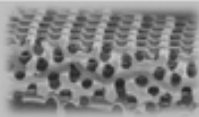
- 125.** Demarteau O, Wendt D, Braccini A, Jakob M, Schafer D, Heberer M, Martin I. *Biomedical and Biophysical Research Communications* 310 (2003) 580.

- 126.** Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotech Prog*. 1998 Mar-Apr;14(2):193-202.



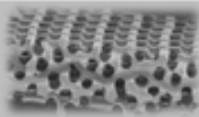
BIBLIOGRAFIA

- 127.** Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res.* 1996 May;(326):270-83.
- 128.** Hult A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report. *Acta Orthop Scand.* 1970; 41: 522-530.
- 129.** Coutts RD, Woo SL, Amiel D, von Schroeder HP, Kwan MK. Rib perichondral autografts in full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Clin. Orthop.* 1992; 275: 263-272.
- 130.** Brittberg M and Peterson L. Introduction of an articular cartilage classification. *ICRS Newsl* 1998; 1: 5–8.
- 131.** Smith GD, Taylor J, Almqvist KF, Erggelet C, Knutsen G, Garcia Portabella M, Smith T, Richardson JB. Arthroscopic assessment of cartilage repair: a validation study of 2 scoring systems. *Arthroscopy.* 2005 Dec; 21: 1462–1467.
- 132.** Van der Borne MP, Raijmakers NJ, Vanlauwe J, Victor J, de Jonq SN, Bellemans J, Saris DB; International Cartilage Repair Society. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfractures. *Osteoarthr Cartil.* 2007 Dec; 15 (12): 1397–1402.
- 133.** Trzeciak T, Krucznski J, Jaroszewski J, Lubiowski P. Evaluation of cartilage reconstruction by means of autologous chondrocyte versus periosteal graft transplantation: an animal study. *Transplant Proc* 2006 Jan-Feb; 38(1): 305–311.
- 134.** Ito S, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Nagai T, Ukai T, Kobayashi M, Kokubo M, Okano T, Mochida J. Repair of articular defect with layered chondrocyte sheets and cultured synovial cells. *Biomaterials* 2012 Jul; 33(21): 5278–5286.



BIBLIOGRAFIA

- 135.** Im GI, Lee JH. Repair of osteochondral defects with adipose stem cells and a dual growth factor-releasing scaffold in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 92: 552–560.
- 136.** Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral Cartilage. *J Orthop Relat Research.* 1991;9:330
- 137.** Dye SF. An evolutionary perspective of the knee. *J. Bone Joint Surg (Am).* 1987;69:976.
- 138.** Davies DV, Barnett CH, Cochran W, Palfre AJ. Electron microscopy of articular cartilage in the young adult rabbit. *Ann Rheum Dis.* 1962 Mar;21:11-22.
- 139.** Mankin HJ. Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. I. Growth in immature cartilage. *J Bone Joint Surg (Am).* 1962;44:682.
- 140.** Hult A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report. *Acta Orthop Scand.* 1970;41:522.
- 141.** Li KW, Falcovitz YH, Nagrampa JP, Chen AC, Lottman LM, Shy JY, Sah RL. Mechanical compression modulates proliferation of transplanted chondrocytes. *J Orthopaedic Research.* 2000;18:374.
- 142.** Jung Y, Park MS, Lee JW, Kim YH, Kim SH. Cartilage regeneration with highly-elastic three dimensional scaffolds prepared from biodegradable poly(L-lactide-co-caprolactone). *Biomaterials.* 2008;29:4630.
- 143.** Appelman TP, Mizrahi J, Elisseeff JH, Seliktar D. The differential effect of scaffold composition and architecture on chondrocyte response to mechanical stimulation. *Biomaterials.* 2009;30:518.



BIBLIOGRAFIA

- 144.** Wang Y, Bian YZ, Wu Q, Chen GQ. Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits. *Biomaterials*. 2008;29:2858.

- 145.** Song HX, Li FB, Shen HL, Liao WM, Liu M, Wang M, Cao JL. Repairing articular cartilage defects with tissue-engineering cartilage in rabbits. *Chin J Traumatol*. 2006;9:266.

- 146.** Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. *Osteoarthr Cartil* 2001; 10: 432.

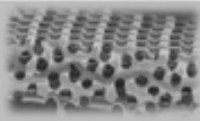
- 147.** Maher SA, Doty SB, Torzilli PA, Thornton S, Lowman AM, Thomas JD, Warren R, Wright TM, Myers E. Nondegradable hydrogels for the treatment of focal cartilage defects. *J Biomed Mat Res A*. 2007 Oct;83(1):145–155.

- 148.** Hunziker EB, Kapfinger E and Geiss J. The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neoformation during postnatal development. *Osteoarthr Cartil*. 2007; 15: 403–413.

- 149.** Cohen SB, Meirisch CM, Wilson HA, Diduch DR. The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits. *Biomaterials*. 2003 Jul; 24(15):2653–2660.

- 150.** Köse GT, Korkusuz F, Ozkul A, Soysl Y, Ozdemir T, Yidiz C, Hasirci V. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(25): 5187–5197.

- 151.** Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thompson B, Wolfe MS, Archer CW. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*. 2004 Feb 29; 117 (Pt 6): 889–897.



BIBLIOGRAFIA

- 152.** Grogan SP, Barbero A, Diaz-Romero J, Cleton-Jansen AM, Soeder S, Whiteside R, Hogendoom PC, Farhadi J, Aigner T, Martin I, Mainil-Varlet P. Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. *Arthr Rheum.* 2007 Feb; 56(2):586–595.
- 153.** Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006 Aug 1; 98 (5):1076–1084. Review.

