



**TRATAMIENTO DE DEFECTOS
OSTEOCONDRALES EN CONEJOS
TRATADOS CON CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES ALOGÉNICAS EN
MATRIZ DE POLÍMERO TERMOSENSIBLE:
PRUEBA DE CONCEPTO.**

**Trabajo de Fin de Grado, 6º de Medicina de la
Universidad de Valladolid. Curso 2015-2016**

**Autores: Guillermo Ordax Calvo. Juan José Robles
Gaitero**

Tutor: Dr. Aurelio Vega Castrillo

Índice

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	3
3. Objetivos.....	5
4. Material y método.....	5
5. Resultados.....	12
6. Discusión.....	15
7. Conclusiones.....	17
8. Bibliografía.....	17

Resumen:

En este trabajo hemos desarrollado un modelo experimental para llevar a cabo el estudio del tratamiento de defectos osteocondrales en rodillas de conejos, realizado en condiciones controladas, para la posterior realización del mismo siguiendo una metodología homogénea y optimizada.

Hemos seleccionado la raza Nueva Zelanda Blanco, siguiendo los protocolos de anestesia y eutanasia legalmente establecidos para la experimentación animal.

Nuestro trabajo se ha centrado en tres aspectos para desarrollar el modelo experimental:

1. Elección material quirúrgico
2. La técnica quirúrgica a emplear
3. Elección de las concentraciones y cantidades de células madre y matriz necesarias para rellenar adecuadamente los defectos realizados

Introducción:

El cartílago articular es un tejido altamente diferenciado con un bajo potencial de curación. Debido a su limitada capacidad de regeneración tras microtraumatismos repetidos o traumatismos únicos, se puede producir una lesión osteocondral focal de mayor o menor tamaño. La evolución sin tratamiento de este tipo de lesiones puede desembocar eventualmente en lo que se conoce como artrosis (osteoartritis). Numerosos tratamientos se han puesto a prueba en la actualidad, entre ellos la artroplastia de periostio, la artroplastia pericondral, el trasplante autólogo osteocondral (mosaicoplastia), trasplante autólogo de condrocitos. Ninguno de ellos con una alta eficacia comprobada¹⁾.

Apostamos por la ingeniería tisular y la terapia celular como posible terapéutica para la regeneración de cartílago articular en los defectos osteocondrales, a sabiendas de la meticulosidad exigida en este tipo de estudios y que augura un futuro muy prometedor a los pacientes que sufren este tipo de lesiones. Entendiendo la ingeniería tisular como al área científica interdisciplinaria cuyo

fundamento esencial es el uso de células vivas, manipulación del entorno extracelular, creación de sustitutos biológicos y su consecuente implantación en el cuerpo. Es la intención de esta ciencia reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido²⁾ Y la terapia celular como método de tratamiento que consiste en curar un órgano a partir de células madre. Estas células no diferenciadas que pueden multiplicarse son capaces de transformarse para dar lugar a las células necesarias para curar el órgano en cuestión. La terapia celular forma parte de las medicinas regenerativas que consisten en trasplantar células madre que serán capaces de restaurar las funciones de un tejido o de un órgano.

Para una exitosa terapia celular es necesario identificar una fuente apropiada, la cual sea fácilmente accesible, posea la capacidad de multiplicarse y tenga potencial condrogénico. Es por eso que entre los numerosos progenitores celulares, las células madre mesenquimales (MSCs), derivadas de medula ósea, han sido extensamente investigadas y han demostrado un enorme potencial para la regeneración de cartílago, las mismas se definen por las siguientes cualidades: autorrenovación, estado de indiferenciación, pluripotencialidad, integración en el desarrollo embrionario, proliferación indiferenciada in vitro, diferenciación in vitro y formación de teratomas³⁾. Las células madre mesenquimales tienen algunas ventajas teóricas comparadas con los condrocitos, sobre todo basadas en su potencial curativo. Estas células tienen capacidad de proliferar sin perder su capacidad de diferenciarse en condrocitos maduros produciendo colágeno tipo II y proteoglicanos específicos de cartílago así como osteoblastos produciendo material osteoide. En conclusión, las células madre mesenquimales pueden inducir a la reparación tanto de hueso como de cartílago en un defecto osteocondral.

Tan importante como la elección de las células es la elección de la matriz extracelular que soporte dichas células, ambas se describirán posteriormente en el apartado de materiales y método.

Por último cabe destacar la elección del trasplante celular a realizar, en nuestro caso alogénico. Las células proceden de un donante, en nuestro caso de un

conejo de la misma especie que los conejos con los que realizamos esta prueba concepto⁴).

Objetivos:

Nuestro objetivo principal es desarrollar un modelo experimental para estudiar la regeneración de cartílago articular.

En cuanto a los objetivos secundarios se encuentran establecer el material necesario, describir la técnica quirúrgica, calcular volúmenes y concentraciones óptimas de polímero y células para el tratamiento del defecto provocado.

Material y método:

Sesión 1. Prueba concepto con conejos muertos. 3 conejos descongelados. 6 rodillas

Material:

-Conejos sacrificados descongelados el día anterior.

-Material quirúrgico: Bisturí de piel, pinza de disección, dos separadores tipo Erina, tijera, taladro, broca de 4mm de diámetro de metal y una de madera, dos portas, dos mosquitos. Hilo safil quik 2/0

-Objetivos del día: Evaluación del material necesario, así como del método del procedimiento.

1. Rasuramos el pelo de los conejos con una maquinilla.
2. Abordaje parapatelar interno, con luxación de la rótula a lateral con la rodilla flexionada, por lo que primero hay que localizar las estructuras (patela, tendón rotuliano y cuádriceps femoral). Se disecciona por planos utilizando un bisturí, tijera, y separadores. Una vez vista la rótula, se luxa

con facilidad, y aparece la tróclea femoral.



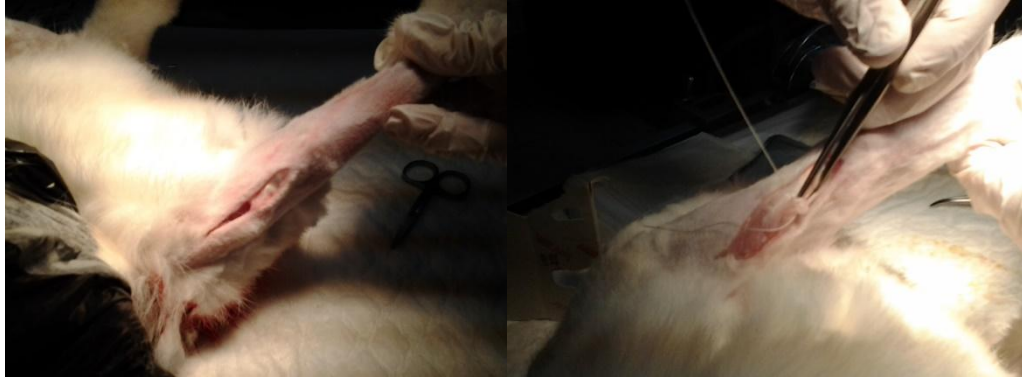
3. Vista la tróclea femoral, se procede a la realización del defecto. Primero se realizó una prueba marcando la superficie articular con la broca del 5 para madera, para realizar el defecto definitivo con la broca de metal del

5. Con un tope hecho con una anilla y tornillo, el cual decidimos sustituir en pruebas sucesivas. Medidas del defecto: 4mm de profundo x 4mm de diámetro.



4. Probamos a realizar la lesión en varias zonas de la tróclea, concluyendo que la zona más accesible y reproducible era la zona central del 1/3 medial troclear. Probamos a hacer varios defectos en cada tróclea, (hasta dos en cada una)

5. Una vez realizada la lesión, restituimos la posición original de la patela, y se sutura plano profundo con puntos colchoneros, para darle mayor estabilidad a la articulación, y para evitar posibles roturas de la sutura. El plano superficial (piel) se sutura con puntos normales. Hilo empleado: Safil quik 2/0



Sesión 2: Prueba concepto de defecto osteocondral con inyección de matriz y células madre en conejo vivo y posterior sacrificio del mismo.

Material:

- Conejo: hembra 4kg 8 meses.
- Anestesia: ketamina (25mg/kg iv) + Medetomidina (0,5 mg/kg iv), analgesia: butorfanol (0,1 mg/kg).
- Se rasuran ambas rodillas con maquinilla eléctrica.
- Tres broca de acero de 4mm, punzón, bisturí, gasas, porta, pinzas de disección, jeringa, aguja, taladro, maquinilla eléctrica, termómetro, matriz con células madre, dos separadores tipo erina (dos medios: medio A; 10^6 celulas/ml, medio B: 5×10^6 celulas/ml), al realizar la lesión de 4x4 mm se introducirán 50 μ l.

Descripción de las células madre mesenquimales procedentes de conejo:

Las células proceden del estroma de medula ósea, seleccionándolas después de realizar un aspirado medular y someterlo a un gradiente de densidad que separa la fracción mononucleada. La población así obtenida se somete a un proceso de adhesión en plástico incubándola en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado, bajo atmosfera de CO₂ a 37°C durante 7-10 días. Pasado ese tiempo las células adheridas comienzan a crecer de forma clonogénica hasta confluencia para ser luego tripsinizadas y sembradas en factorías de gran superficie y alta capacidad hasta obtener rendimientos altos en las dos semanas siguientes de cultivo. El producto final es comprobado en cuanto al fenotipo, obteniéndose una viabilidad >90%.

Descripción de la matriz: Los recombinámeros de tipo elastina utilizados en este experimento se obtienen por técnicas recombinantes mediante la bioproducción en la cepa BLR (DE3) de *Escherichia coli* y la posterior purificación del producto hasta obtener un liofilizado proteico con altos niveles de pureza (95-99%) y niveles de endotoxinas adecuados para su uso in vivo (unidades de endotoxinas < 1/mg). Posteriormente, las moléculas de los ELRs que componen la matriz se modifican químicamente para conseguir producir un hidrogel con entrecruzamiento químico.

Análisis del procedimiento:

1. Una vez anestesiado al conejo mediante anestesia general (vía intravenosa) con 100mg de ketamina y 2mg de medetomidina, y analgesiado con 0,4 mg de butorfanol se procede a la exposición del campo en camilla quirúrgica con rodilla en flexión.



2. Se utiliza abordaje descrito en la prueba anterior y se introduce en la rodilla derecha 50 μ l de la matriz A midiendo posteriormente la temperatura obtenemos 34.4 grados. En la rodilla izquierda introducimos matriz B estando la temperatura en la zona de la lesión a 35,8 grados.





3. Es importante destacar la reacción de transición inversa que sufre el polímero proteico que al entrar en contacto con un medio a mayor temperatura se gelifica en décimas de segundo. Tras introducir la matriz es importante tener en cuenta no limpiar la zona con gasas por riesgo a arrastrar parte de la misma. Así mismo concluimos también en esta prueba en la necesidad de introducir 10 μ l a mayores en cada defecto realizado debido a que al solidificarse la matriz pierde de volumen y en ese caso no llegaría a ocupar el defecto por completo.
4. Se eutanasia al conejo con 200 mg/ml de pentobarbital.

Sesión 3: Prueba concepto de defecto osteocondral con inyección de matriz y células madre en conejo vivo.

- Material:

Conejo hembra 4,75 kg , anestesia: 117,5 mg de ketamina y 2,37 mg de medetomidina (vía periférica en oreja izquierda permeable), se rasuran ambas patas.

Material quirúrgico: Compresas, bisturí, porta, separador de Erina, tijera de disección, pinza de disección, puntos de 3/0, broca de metal, taladro.

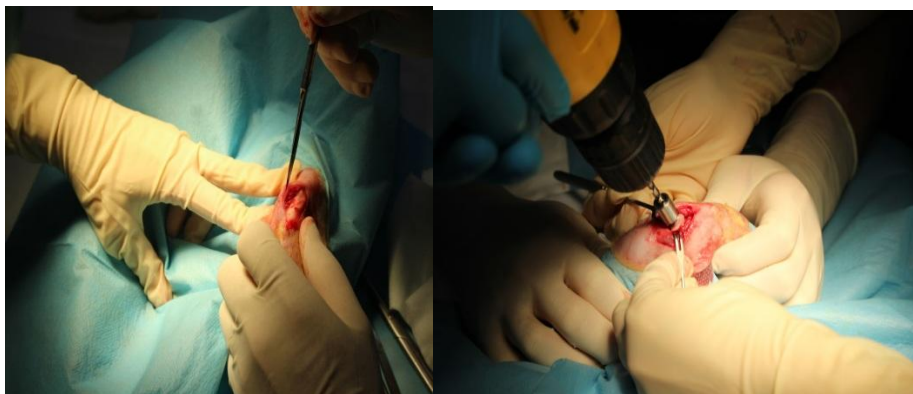


Análisis del procedimiento:

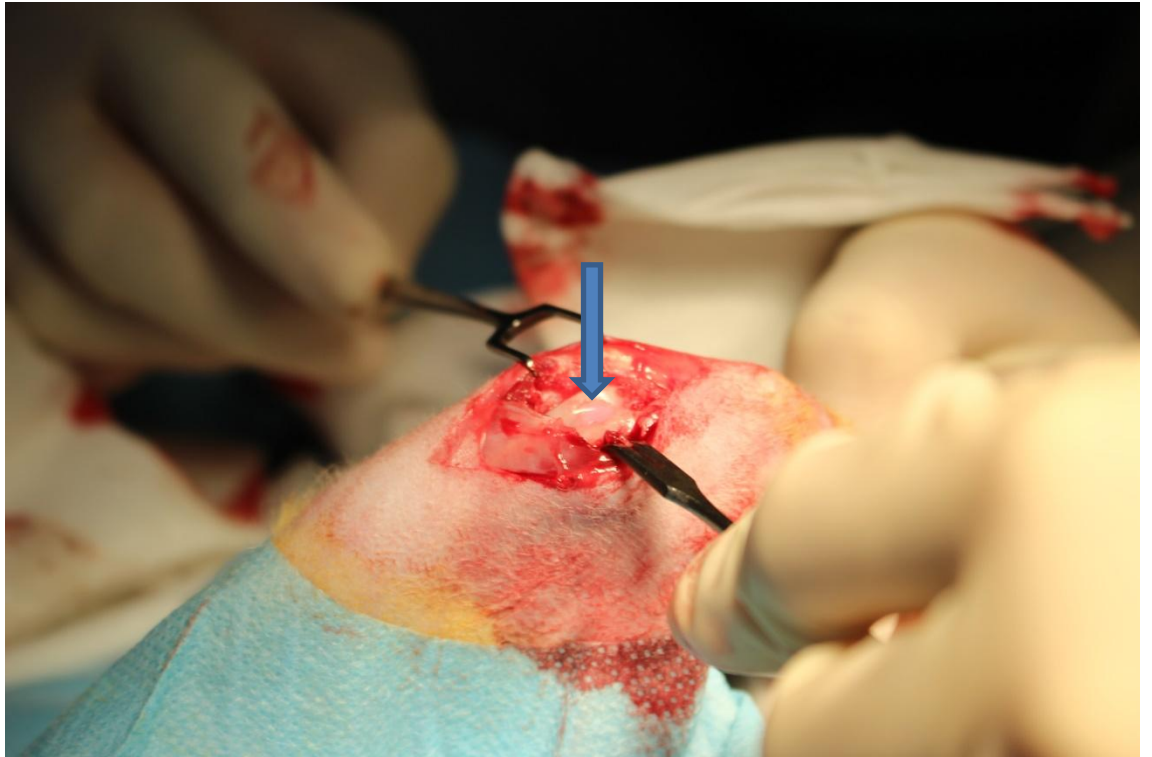
1. Lavado quirúrgico: pintar patas desde fuera sin estar lavado para sujetar la pata.



2. Abordaje quirúrgico: el mismo que los descritos en pruebas anteriores.



3. Introducción de la matriz: Tanto en la rodilla izquierda como en la derecha se introdujo la matriz A. La diferencia en esta prueba estuvo en que en la rodilla izquierda se introdujeron 60 μ l y en la derecha 65 μ l. Así mismo la temperatura en la rodilla derecha a 33,6 grados y la izquierda 32,7 grados. Esperamos 5 min desde la introducción de la matriz hasta proceder a cerrar la herida quirúrgica.



4. Se cierra con 4 puntos colchoneros en el plano profundo, y en el plano superficial 5 puntos sueltos.
5. Medidas postquirúrgicas: se desinfecta la zona de la herida quirúrgica con povidona yodada, se analgesia con butorfanol 0,5 mg (1mg/kg cada 12h intramuscular), y se introduce al conejo en una jaula pequeña para evitar movilización excesiva de la articulación operada, siendo los conejos vigilados cada 12 horas hasta 9 días, y cada 24 horas una vez pasados esos días habiendo retirado la sutura de la piel, hasta las 24 horas antes de la eutanasia.

Resultados

CONEJO	Conejo hembra adulta Nueva Zelanda Blanco (4/5 meses)
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ALOGÉNICAS	5 millones cél/ml = 480.000 cél/defecto Donante macho
MATRIZ DE POLÍMERO PROTEICO TERMOSENSIBLE	65µL/DEFECTO
ANESTESIA	Jeringa, aguja, esparadrapo para la sujeción de la vía. Inducción y mantenimiento anestésico: Ketamina (25mg/kg iv) + Medetomidina (0,5 mg/kg iv), Analgesia: butorfanol (0,1 mg/kg) Suero salino fisiológico Máquina de rasurado eléctrica
MATERIAL QUIRÚRGICO	Compresas Bisturí Porta Separadores Tijera de disección Pinza de disección Puntos de 3/0 Taladro Broca de metal

**TÉCNICA QUIRÚRGICA Y MEDIDAS
POSTQUIRÚRGICAS**

1. Preparación con povidona yodada primero una y luego la otra rodilla
2. Abordaje parapatelar interno, con luxación de la rótula a lateral con la rodilla flexionada, localizar estructuras (patela, tendón rotuliano y cuádriceps femoral). Disecar por planos utilizando un bisturí, tijera, y separadores. Una vez vista la rótula, se luxa con facilidad, y aparece la tróclea femoral.
3. Vista la tróclea femoral, proceder a la realización del defecto en el 1/3 medial de la misma.
4. Taladrar con broca de metal del número 5, utilizando un tope hecho con una anilla y tornillo
Medidas del defecto: 4mm de profundo x 4mm de diámetro
5. Sutura de plano profundo con puntos colchoneros, para darle mayor estabilidad a la articulación, y para evitar posibles roturas de la sutura.
6. El plano superficial (piel) se sutura con puntos normales.
Hilo empleado: Safil quik 2/0

	<p>7. Limpiar herida quirúrgica con povidona yodada .</p> <p>8. Introducir al conejo en una jaula pequeña para evitar movilización excesiva de la articulación operada.</p> <p>9. Vigilar cada 12h x 9 días hasta retirar sutura de la piel y luego cada 24 horas hasta 24 horas antes de la eutanasia.</p>
EVALUACIÓN DE RESULTADOS	<p>RMN a las 6 y a las 12 semanas</p> <p>Estudio histológico a las 12 semanas del experimento postmortem.</p>
EUTANASIA	<p>Pentobarbital 200 mg/kg a través de catéter endovenoso en la vena auricular marginal, logrando primero un estado de inconsciencia y anestesia, y provocando después depresión cardiorrespiratoria, y finalmente el cese de ambas funciones</p>

En cuanto al número de conejos a utilizar, se ha determinado estadísticamente hacer el estudio con una n=15, 30 rodillas en total, aleatorizado, y a doble ciego. En 14 rodillas se inyectará en el defecto 65µl de mezcla de células madre con matriz, en una concentración de 5 millones de células/ml, y en las otras 14 rodillas, se inyectarán 65µl de matriz de polímero termosensible. Se dejará una coneja control, en la que se realizará un defecto igual a los otros pero no se intentará reparar.

Discusión:

Hemos diseñado un modelo experimental, que creemos que pueda ser fácilmente reproducible y que facilite los estudios de tratamiento de lesiones focales osteocondrales con ingeniería tisular.

Los animales comúnmente utilizados en los estudios de reparación de cartílago articular son: Ratones, conejos, perros, cabras, cerdos y caballos. Existen ventajas y desventajas en cada modelo. Los modelos de animales pequeños, como los ratones y conejos, son coste-efectivos, fácilmente estabulables, y útiles para la realización de estudios pre-concepto. La disponibilidad de conejos transgénicos y ratones knock-out (modificados genéticamente) ofrecen ventajas para la realización de estudios in vivo, pero el pequeño tamaño de las articulaciones, su menor espesor de cartílago articular, y su elevado potencial de curación respecto a humanos, sobre todo el de los ratones, limitan el valor de estos modelos animales. Los modelos con animales grandes, con cartílago articular más grueso, permiten el estudio tanto de la reparación del espesor condral tanto parcial como total, así como la reparación osteocondral. Y aunque la reparación y regeneración de defectos articulares en modelos animales equinos, muestra más fiabilidad por ser más parecida a la situación clínica de los humanos, conllevan mayores dificultades logísticas, de financiación y consideraciones éticas⁵⁾. Y por ello, se elige al conejo como modelo animal en la realización de este estudio. Se emplea el conejo neozelandés, debido a sus características de crecimiento, ser un animal fértil y prolífico⁶⁾, y su relativamente fácil disponibilidad en centros de cría, así como su carácter albino que facilita el acceso a las vías circulatorias periféricas auriculares. Se utilizarán hembras jóvenes (4-5 meses de edad y de 3-3,5 kg). Debido a que este proyecto necesitará un tiempo de alojamiento largo, y el manejo de este sexo es menos conflictivo. Se identifican los animales por tatuaje auricular con un código numérico o con chip y se alojan en jaulas que deben ser adecuadas a la normativa vigente sobre el bienestar animal.

Las células madre mesenquimales son células pluripotenciales, que pueden diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares (incluyendo osteoblastos, condrocitos, miocitos, adipocitos y células beta de los islotes pancreáticos)

mediante la acción de varios miembros de la familia de los factores de crecimiento beta⁷⁾. Se piensa que las MSCs son una fuente de células para la medicina regenerativa. Un estudio ha mostrado que este tipo de células pueden sobrevivir y desarrollarse así como reparar en una forma viable de rodilla de cabra en una artritis simulada⁸⁾. Otro estudio sobre defectos grandes de cartílago con modelos de cerdo, mostró mejorías en la curación del cartílago en el grupo de la inyección articular de MSCs frente al grupo control⁹⁾. Es por esto que las MSCs tienen efectos positivos sobre la regeneración de cartílago en defectos osteocondrales de modelos animales.

Los procesos de recuperación de los defectos osteocondrales no son conocidos en detalle; pero si no son tratadas, las complicaciones acaban apareciendo con el tiempo^{10),11)}.

Aunque muchos métodos han sido desarrollados para el tratamiento de las lesiones condrales y osteocondrales, en ninguno de ellos a día de hoy se han observado resultados en la formación de cartílago normal.

Uno de los principales escollos en este estudio es la dificultad de la evaluación de los futuros resultados, debido a la limitación económica, que puede suponer la no realización de las pruebas de imagen mediante resonancia magnética nuclear a mitad del estudio (6 semanas post-experimento), así como el estudio de la histología del cartílago, por la limitación existente en cuanto a que es un proceso laborioso que ha de ser realizado por un histólogo, lo que requiere una presupuesto elevada.

Hemos de señalar además, la complejidad en cuanto a la organización del estudio, por la necesidad de coordinar a un gran número de personas e instituciones para la realización del mismo.

Conclusiones:

Hemos desarrollado un modelo experimental para el estudio del tratamiento de lesiones osteocondrales focales de rodilla con células madre mesenquimales alógenas fácilmente reproducible.

De la misma manera, hemos establecido el material quirúrgico necesario, así como la técnica quirúrgica más eficaz para el abordaje y exposición de la tróclea femoral para la realización de defecto y consiguiente tratamiento del mismo.

Por último hemos determinado el volumen de matriz de polímero a emplear, y la concentración de células en cada defecto.

Bibliografía:

- 1. Sung Soo Kim, MD, Min Soo Kang, MD, Kyu Yeol Lee, MD, Myung Jin Lee, MD.** *Therapeutic effects of mesenchymal stem cells and hyaluronic acid injection on osteochondral defects in rabbits' knees. KSRR. 2012; 24(3):164-172.*
- 2. Dres. German F. Falke y Anthony Atala.** *Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. Arch.argent.pediatr 2000;98(2):103-104*
- 3. Gerardo Martín González López, Dolores Javier Sánchez González, Carlos Armando Sosa Luna.** *Terapia celular con células madre y medicina regenerativa, México D.F. Alfil; 2009.*
- 4. The bone marrow foundation.** *Transplante autólogo de médula ósea o células precursoras, Nueva York. Cancer care; 2010.*
- 5. Constance R. Chu, M.D., Michal Szczodry, M.D., and Stephen Bruno, B.A.** *Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair. Tissue engineering: 2010; Volume 16, 230 (10):105-115*
- 6. Carlos Vaquero Puerta.** *Manual de experimentación animal. Valladolid: Universidad de Valladolid; 1993.*
- 7. Rudert M, Wilms U, Hoberg M, Wirth CJ.** *Cell-based treatment of osteochondral defects in the rabbit knee with natural and synthetic matrices:*

cellular seeding determines the outcome. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2005;125(10):598-608.

8. **Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M.** Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79(10):1439-51.

9. **Lee KB, Hui JH, Song IC, Ardany L, Lee EH.** Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects: a porcine model. *StemCells.*2007;25:2964-71.

10. **Greenwald RA.** Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. *Semin Arthritis Rheum.* 1991;(20):219-40.

11. **Aroen A, Loken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L.** Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med.* 2004;(32):211-5.