



UCA

Pontificia Universidad Católica Argentina
Santa María de los Buenos Aires

Facultad de Ciencias Médicas

Autor: Cecilia Pascual-Garrido, MD

Director: Arturo Makino, MD, PhD

**Trabajo de Tesis Para Optar al Título de
Doctor en Ciencias Biomédicas:**

**Reparación de Cartílago mediante el Trasplante de Células Stem
Mesenquimales (MSCs) incluidas en un Hidrogel de Condroitín Sulfato/PEG
para Tratamiento de Defectos Condrales**

ÁREA

ORTOPEDIA – MEDICINA REGENERATIVA

2018

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	4
TRABAJOS ORIGINALES PUBLICADOS O PRESENTADOS ASOCIADOS A LA TESIS	5
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Tejido cartilaginoso y cartílago articular	10
1.1.1. Tipos de tejido cartilaginoso	11
1.1.2. Lesiones condrales	13
1.1.3. Regeneración/Reparación del cartílago articular.....	14
1.2. Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos.....	18
1.2.1. Medicina Regenerativa.....	18
1.2.2. Ingeniería de Tejidos	20
1.2.3. Células troncales	21
1.2.4. Ingeniería de Tejidos para reparación de cartílago hialino.....	23
1.3. Biomateriales.....	28
1.3.1. Hidrogeles.....	30
1.3. Factores de crecimiento.....	33
1.4. 3D Bioprinting.....	35
1.5. PLANTEO DEL PROBLEMA.....	37
1.6. OBJETIVOS	38
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.1. Metodología In vitro.....	40
2.1.1. Fabricación del Hidrogel.....	40
2.1.2. Aislamiento y expansión de células MSC derivadas de médula ósea	42
2.1.3. Encapsulación de células	43
2.1.4. Ensayo Mecánico.....	44
2.1.5. Condrogénesis in vitro.....	44
2.2. Metodología In vivo	45
2.2.1. Cirugía en los animales, generación del defecto condral y Tratamiento	45
2.2.2. Evaluación del tejido de reparación a los 6 meses pos-cirugía.....	48
2.3. Diseño de la metodología en pacientes	49
2.3.1. Diseño del estudio.....	49
2.3.2. Población y muestra.....	50
2.3.3. Medidas de resultados	52
2.3.4. Análisis estadístico	54
3. RESULTADOS.....	55
3.1. Resultados In Vitro	55

3.1.1. Prueba mecánica	55
3.1.2. Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR)	56
3.1.3. Histología	56
3.2. Resultados In Vivo	57
3.2.1. Resultados Macroscópicos en Modelo Animal	57
3.2.2. Histología	58
3.3. Resultados de ensayo clínico en pacientes	63
3.3.1. Resultados primarios	63
3.3.2. Resultados secundarios	63
3.3.3. Satisfacción de los pacientes	66
3.3.4. Seguridad	67
3.3.5. Procedimientos subsiguientes y efectividad.....	67
4. DISCUSIÓN	69
5. BIBLIOGRAFÍA	79
Bibliografía	Error! Bookmark not defined.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al director de tesis, Dr. Arturo Makino, por la dedicación y apoyo brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas.

Asimismo, agradezco a mis colegas del departamento de Material Science and Engineering Program, University of Boulder, Regenerative Orthopedics Laboratory, University of Colorado y Orthopedic Research Center, Colorado State University.

Especial agradecimiento a la Dr. Stephanie Bryant, a la Dra Laurie Goodrich, Dra. Alicia Lorenti y la Dra Karin Payne. Su constante apoyo, colaboración y dedicación durante el desarrollo de mi tesis han sido clave para la culminación de mi tesis doctoral.

Asimismo quiero agradecer a la UCA por darme la oportunidad de realizar el doctorado. La universidad me ha brindado la oportunidad y el apoyo incondicional para poder culminar la tesis. En especial agradecimiento a German E Gonzalez, Daniel Cardinali, Daniel Vigo y Padre Revello.

Finalmente agradecer a mi familia y amigos que me han apoyado durante todo este proceso. Su apoyo incondicional fueron indispensables para poder culminar mi tesis.

TRABAJOS ORIGINALES PUBLICADOS O PRESENTADOS ASOCIADOS A LA TESIS

Publicaciones

1. Cole BJ, **Pascual-Garrido C**, Grumet RC. Surgical Management of Articular Cartilage Defects of the Knee. *Journal Bone Joint Surgery*. 2009 July;91(7):1778-1790.
2. **Pascual-Garrido C**, Slabaugh MA, L'Heureux DR, Friel NA, Cole BJ. Recommendations and Treatment Outcomes for Patellofemoral Articular Cartilage Defects with Autologous Chondrocyte Implantation: Prospective Evaluation at Average 4-Year Follow-up. *American Journal Sport Med*. 2009 Nov;37 Suppl 1:33S-41S.
3. Moran CJ, **Pascual-Garrido C**, Chubinskaya S, Potter HG, Warren RF, Cole BJ, Rodeo SA. Restoration of Articular Cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 2014 Feb 19;96(4):336-44.
4. **Pascual-Garrido C**, Daley E, Verma, NN, Cole BJ. A Comparison of the Outcomes for Cartilage Defects of the Knee Treated with Biologic Resurfacing versus Focal Metallic Implants. *Arthroscopy*. 2017 Feb;33(2):364-373.
5. Rodriguez-Fontan F, Chahla J, Piuuzzi NS, Payne K, Muschler GF, LaPrade RF, **Pascual-Garrido C**. Celulas Madre y Progenitora Para la Reparacion del Cartilage Articular. *Rev Latinoam, Cir Orthop*. 2016 April-June;1(2):66-76.
6. Rodriguez-Fontan, Piuuzzi NS, Chahla J, Payne K, LaPrade RF, Muschler GF, **Pascual-Garrido C**. Stem and Progenitor Cells for Cartilage Repair: Source, Safety, Evidence and Efficacy. *Operative Techniques in Sports Medicine*. 2017 March 25(1):25-33
7. Kraeutler MJ, Chahla J, LaPrade RF, **Pascual-Garrido C**. Biologic Options for Articular Cartilage Wear (Platelet-Rich Plasma, Stem Cells, Bone Marrow Aspirate Concentrate). *Clin Sports Med*. 2017 Jul;36(3):457-468.
8. Aisenberry EA, Tomasschke A, Kleinjan E, Muralidharan A, **Pascual-Garrido C**, McLeod RR, Ferguson VL, Bryant SJ. A Stereolithography-Based 3-D Printed Hybrid Scaffold for In Situ Cartilage Defect Repair. *Macromolecular Bioscience Journal*. 2017 December 21;doi: 10.1002/mabi.201700267. [Epub ahead of print]. PMID: 29266791
9. **Pascual-Garrido C**, Rodriguez-Fontan F, Aisenbrey E, Payne K, Chahla J, Goodrich L, Bryant S. Current and Novel Injectable Hydrogels to Treat Focal Chondral Lesions: Properties and Applicability. *Journal of Orthopaedic Research*. 2018 Jan;36(1):64-75. doi: 10.1002/jor.23760. Epub 2017 Nov 22. PMID: 28975658
10. **Pascual-Garrido C**, Aisenbrey EA, Rodriguez-Fontan F, Payne KA, Bryant SJ, Goodrich LR. Photopolymerizable Injectable Cartilage Hydrogel for the Treatment of Focal Chondral Lesions: A Proof of Concept Study in a Rabbit Animal Model. *American Journal of Sports Medicine*. In Review 2018.

Libros

1. Cole BJ, **Pascual-Garrido C**, Grumet RC. Overview and Indications for Articular Cartilage Restoration in Advanced Reconstruction of the Knee, Ed. Lieberman, Berry, Azar. Chapter 53. 2011
2. **Pascual-Garrido C**, Rodeo SA. Biology of Cartilage Regeneration in the Articular Lesions: Prevention and Treatment. McCarthy, Villar & Noble: Diagnosis and Surgical Treatment of Hip Disease. 2015.

3. Kraeutler MJ, Richards A, Chahla J, LaPrade RF, **Pascual-Garrido C**. Biologic Options for Articular Cartilage Wear. Edited by McCarty. Chapter 4. 2016.

Presentaciones

1. **Pascual-Garrido C**, Rodriguez-Fontan F, Bryant SJ, Aisenbrey EA, Chahla J, Payne KA, Goodrich LR. Mesenchymal Stem Cell (MSCs) Delivered in a Novel Hydrogel for the Treatment of Chondral Defects in a Rabbit Model. ORS 2017 Annual Meeting. San Diego, CA. March 19-22. Poster No. 2362.
2. **Pascual-Garrido C**, Rodriguez-Fontan F, Bryant SJ, Aisenbrey EA, Chahla J, Payne KA, Goodrich LR. Cartilage Repair with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Delivered in a Novel Chondroitin Sulfate/Polyethylene Glycol Hydrogel in a Rabbit Animal Model. AOSSM 2017 Annual Meeting Toronto, Canada. July 20-23. Paper 120.
3. **Pascual-Garrido C**, Rodriguez-Fontan F, Bryant SJ, Aisenbrey EA, Chahla J, Payne KA, Goodrich LR. Mesenchymal Stem Cell (MSCs) Delivered in a Novel Hydrogel for the Treatment of Chondral Defects in a Rabbit Model. SICOT. Cape Town, South Africa. November 30-December 2, 2017.

RESUMEN

Introducción: Las lesiones condrales focales y la artrosis afectan a una significativa cantidad de pacientes adultos jóvenes activos. Los tratamientos quirúrgicos disponibles para la reparación de defectos condrales focales sintomáticos mejoran la calidad de vida de pacientes intervenidos a mediano plazo; sin embargo, la progresión hacia la artrosis prematura se encuentra latente. La bioingeniería constituye un área para la regeneración de cartílago que potencialmente podría progresar en el terreno de tratamientos articulares, promoviendo regeneración y evitando degeneración. Las células madre e hidrogeles pueden proveer un tejido biológico de comportamiento dinámico-funcional equivalente que induce regeneración y reemplaza el tejido dañado. En la presente tesis, investigamos la capacidad condrogénica *in vitro* e *in vivo* de un de células madres entregadas en un novedoso hidrogel. Hypothesis: 1) determinar si las células madres entregadas en el hidrogel promueven condrogénesis *in vitro* 2) demostrar que es posible entregar el hidrogel en lesiones focales osteocondrales en un modelo animal de conejo y 3) determinar si el hidrogel con o sin células madres promueve condrogénesis en defectos osteocondrales en un modelo animal *in vivo*.

Metodos: Células madres fueron aisladas de médula ósea. Las células fueron aisladas, expandidas y encapsuladas en el hidrogel y cultivadas en medio condrogénico por 9 semanas. Módulos compresivos fueron evaluados en día 1, semana 3,6 y 9. Diferenciación condrogénica fue evaluada utilizando PCR, Safranina-O e inmunofluorescencia (IF). *In vivo*, una lesión de 3mm x 2mm osteocondral fue generada en la tibia de la rodilla en 10 conejos de manera bilateral. Se establecieron 3 grupos: A) hidrogel (n=5), B) hidrogel con células madres, C) control-defecto sin tratamiento (n=10). La reparación fue evaluada 6 meses post-intervención. **Resultados:** *In vitro*, condrogénesis y degradación del hidrogel fue confirmado. *In vivo*, el hidrogel fue entregado intraoperatoriamente sin dificultad. El grupo correspondiente al hidrogel

demonstró la mejor regeneración articular (MODS system) (A: 17.4 ± 4.7 , B: 13 ± 3 and C: 16.7 ± 2.9) ($P= 0.11$) y presento intensa coloracion para Safranina (Group A: $49.4\% \pm 20$, Group B: $25.8\% \pm 16.4$ and Group C: $36.9\% \pm 25.2$) ($P=0.27$). **Conclusion:** Este estudio demuestra, por primera vez, la habilidad de inocular el hydrogel con o sin celulas madres de manera introoperatoria. Asimismo, demuestra una capacidad condrogenica in vivo e in vitro induciendo la reparacion del cartilago articular.

1. INTRODUCCIÓN

Muchos pacientes en el mundo padecen defectos de cartílago y no existe aún una solución que permita reproducir fielmente la capacidad de carga y la durabilidad del cartílago articular nativo. A pesar de los importantes avances en las técnicas quirúrgicas, la regeneración del cartílago hialino sigue representando un importante e irresuelto desafío para los cirujanos ortopédicos. Enfrentar este desafío requerirá del desarrollo de nuevos enfoques y un cambio de paradigma (Sharma B et al, 2013).

El campo de la ortopedia se ha desarrollado notablemente gracias a la aparición de nuevos productos y técnicas quirúrgicas. A pesar de ello, las enfermedades e injurias en el sistema musculoesquelético continúan siendo un problema, que se incrementa con el envejecimiento de la población. Se están desarrollando numerosos proyectos tanto de investigación básica como de aplicación clínica para tratamiento de lesiones de rodilla, buscando la reparación/regeneración del cartílago dañado. Aunque existen resultados alentadores, éstos no se han traducido aún en terapéuticas concretas y reproducibles (Cole B et al, 2009).

Las lesiones condrales que se producen en pacientes jóvenes o activos representa un serio problema en la práctica ortopédica. Con frecuencia estos procesos conducen a la aparición de osteoartritis, con cambios degenerativos en la articulación que llevan a la aparición de dolor y pérdida de movilidad, disminuyendo significativamente la calidad de vida de los pacientes.

Este tipo de lesiones es particularmente problemático porque en muchos casos se extiende a través de dos tejidos bien diferentes: el cartílago hialino altamente adaptable y complaciente y el hueso subcondral rígido subyacente. Estos dos tejidos están conectados por una delgada interface, la cual es una región de transición, críticamente importante para la función de la articulación, ya que permite una eficiente transferencia de carga

entre ambos tejidos (Steinmetz N et al, 2015). Esta interface ha sido extensamente estudiada debido a la creciente demanda de nuevas terapias (Yang P et al, 2009).

1.1. Tejido cartilaginoso y cartilago articular

Las articulaciones, y particularmente la rodilla, representan un complejo sistema que comprende diversos tejidos, como ser ligamentos intra- y extra-articulares, tendones, músculos, cartílago, meniscos, cápsula y sinovio, que surgen durante el desarrollo y funcionan como una unidad integrada, que es lo que permite la movilidad articular (Loeser R et al, 2012).

El tejido cartilaginoso es una forma especializada de tejido conectivo, compuesto por células inmersas en un gel coloidal firme rico en agua. Esta matriz está formada por colágeno y glicoproteínas producidos por los condrocitos diferenciados. (Finn Geneser, 2000).

El entendimiento de la organización celular del cartílago explica la carencia de su potencial de reparación. Los componentes estructurales del cartílago articular incluyen los condrocitos, colágeno, proteoglicanos, proteínas no-colágeno y agua. Todos los tejidos intraarticulares están vascularizados e inervados de distinta manera, excepto el cartílago articular, el cual es carente de vascularización e inervación, debido en parte a sus requerimientos para funcionar en un ambiente con intensa carga biomecánica. La carencia de vascularización del cartílago es uno de los motivos que limita la regeneración espontánea (Shah M et al, 2007).

Después de la etapa fetal, los tejidos articulares continúan en la vida pos-natal y la pubertad con diversos pasos de maduración, mientras mantienen su funcionamiento coordinado. Una vez alcanzada la madurez esquelética, las articulaciones mantienen su integridad mediante la estimulación biomecánica y el aporte de factores biológicos, como nutrientes, reguladores de crecimiento y hormonas, gases, entre otros, provenientes del

líquido sinovial, que son los que nutren a las células por difusión. A su vez, las células son responsables de mantener la integridad de la matriz extracelular, que es crítica para el funcionamiento de la rodilla.

1.1.1. Tipos de tejido cartilaginoso

Existen tres tipos de tejido cartilaginoso: hialino, fibroso o elástico (Yang P et al, 2009). El cartílago hialino, de aspecto vidrioso azulado, es el más abundante y está compuesto principalmente por fibras de colágeno tipo II. Se encuentra en las superficies articulares de la mayoría de los huesos, y también en tráquea, laringe y nariz. Es un tejido conectivo denso, avascular, que le permite la movilidad a las superficies articulares, y se lo encuentra en todas las articulaciones.

El cartílago elástico es de color amarillo y su matriz está formada por colágeno tipo II y fibras elásticas ramificadas. Posee mayor elasticidad y flexibilidad que el cartílago hialino y se encuentra en superficies sometidas a deformación, como pabellón auricular, conductos auditivos externos, epiglotis y laringe.

Finalmente, el cartílago fibroso o fibrocartílago presenta características de tejido conectivo denso y cartílago hialino, y se encuentra en órganos que requieren sostén rígido y resistencia a la tensión, tales como discos intervertebrales, meniscos y elementos óseos con inserción a tendones y ligamentos (Finn Geneser, 2000).

Se pueden distinguir tres zonas en el cartílago: superficial, media y profunda. La zona superficial ocupa la superficie de la articulación, la zona profunda es la zona calcificada del cartílago, que conecta con el hueso subcondral. La zona media está entre ambas, posee mayor espesor y las fibras de colágeno adoptan una disposición con ángulos oblicuos respecto de la superficie articular y son de mayor diámetro que en la zona superficial. Hay menor número de fibras y agua que en la zona superficial. En esta zona la concentración de proteoglicanos es mayor y la de agua más baja que en las otras capas. (Ulrich-Vinther M et al, 2003; Poole A et al, 2001).

Desde el punto de vista bioquímico, el tejido de cartílago está formado por agua, condrocitos (1-10%), rodeado de una matriz extracelular especializada, consistente en proteínas estructurales y funcionales, como colágeno II, glicoproteínas y glicosaminoglicanos, como el agrecano (“aggrecan”), ensamblados en un microambiente con arquitectura 3D específica del tejido. En todas las áreas del tejido, las fibras de colágeno forman una matriz densa, altamente interconectada. Dentro de esta matriz, el agrecano, una molécula altamente glicosilada, con carga neta negativa, está unida en gran número a cadenas de ácido hialurónico, formando agregados de proteoglicanos, que aumentan la osmolaridad del tejido, provocando el influjo de agua. La distensión que resulta de este influjo es contrarrestada por la resistencia de la matriz de colágeno, generando una gran presión interna, lo cual le otorga al cartílago sus propiedades mecánicas únicas (Ulrich-Vinther M et al, 2003). El cartílago presenta una superficie lubricada con bajo estrés por fricción.

Mecánicamente, el cartílago articular humano es un *composite* de materiales con propiedades muy diferentes capaces de resistir cargas altamente compresivas. Cada zona en el cartílago exhibe un aspecto y organización característicos, tanto en lo que respecta a las células como a los componentes de la matriz extracelular (ME). La zona superficial se caracteriza por condrocitos con morfología aplanada y fibras de colágeno delgadas, paralelas a la superficie de la articulación. En esta zona la densidad celular es la mayor. En la zona media, los condrocitos son más redondeados y las fibras de colágeno tienen mayor diámetro y no son tan paralelas. En la zona profunda los condrocitos y las fibras están organizadas perpendicularmente a la superficie articular, con los condrocitos ordenados en columnas verticales. El diámetro de las fibras de colágeno es máximo en esta región, aunque el contenido de colágeno es el más bajo (Hunziker E, 1992).

A través de las tres zonas, la concentración de agrecano se incrementa a medida que se aumenta la profundidad del tejido (Muttigi M et al, 2016). Las proporciones diferenciales de la composición de la ME, así como el ordenamiento de sus componentes, influyen significativamente en las propiedades mecánicas de cada sección del tejido. Así, por ejemplo, la zona superficial presenta una fuerte tensión a lo largo de la alineación de las

fibras de colágeno, lo cual contribuye a la resistencia superficial del tejido. Por otro lado, la zona profunda del tejido tiene una rigidez de compresión un orden de magnitud mayor en relación a la zona superficial.

La zona profunda es la que tiene contacto con el hueso subcondral, y contiene el tejido cartilaginoso calcificado en su parte más profunda, antes de alcanzar el hueso subcondral. La interface entre ambos describe la interacción del cartílago calcificado y el hueso subcondral. Aún cuando el cartílago calcificado es un tejido mineralizado, su resistencia mecánica es menor que la del hueso subcondral que está por debajo.

Dada la complejidad de la biología y mecánica de esta interface, el gran desafío para obtener sustitutos mediante ingeniería de tejidos incluye desarrollar una superficie de baja fricción que se integre con el tejido de cartílago que lo rodea, asegurando una apropiada integración con dicho tejido, manteniendo las propiedades mecánicas del implante.

Las superficies articulares generalmente están recubiertas por cartílago hialino y, en casos excepcionales, por cartílago fibroso. Este tejido se denomina cartílago articular y sus funciones son contribuir a distribuir la sobrecarga de presión de las superficies articulares y permitir el desplazamiento de las superficies óseas reduciendo la fricción entre ellas. En articulaciones grandes de individuos jóvenes, este tipo de cartílago es liso, muy compresible y alcanza su espesor máximo. Por el contrario, en personas añosas es más delgado, menos liso, más duro y frágil (**Finn Geneser, 2000**).

1.1.2. Lesiones condrales

Las lesiones del cartílago articular por trauma, enfermedad o desórdenes genéticos rara vez se curan espontáneamente, dada la escasa capacidad de reparación/regeneración del cartílago (**Pascual-Garrido C et al, 2009**). Estas lesiones pueden presentar distinta gravedad y, según la clasificación Outerbridge, existen cuatro grados de daño condral. El Grado I

corresponde a una lesión donde el cartílago se muestra hinchado y más blando. El Grado II se caracteriza por fragmentación y fisura poco profunda del cartílago. En las lesiones de Grado III dichas fisuras son más profundas y se extienden hasta el hueso subcondral. Finalmente, en las lesiones de Grado IV se observa exposición del hueso subcondral (Outerbridge R, 1961).

Dependiendo del daño, estas lesiones pueden estar acompañadas por dolor, inmovilidad, rigidez de la articulación y peor calidad de vida. A largo plazo, sin una intervención adecuada y debido al limitado potencial regenerativo del cartílago, estos defectos pueden conducir a osteoartritis.

Han sido realizados diversos estudios de prevalencia, epidemiología y etiología. A modo de ejemplo, uno de ellos ha analizado entre 1000 y 25000 artroscopías de rodilla tomadas entre los años 1989 y 2004, y muestra que aproximadamente el 60% de los pacientes analizados padecen defectos condrales u osteocondrales con mayor incidencia de las lesiones de Grado II y III (Hjelle K et al, 2002; Widuchowski W et al, 2007; Widuchowski et al, 2008).

1.1.3. Regeneración/Reparación del cartílago articular

Los procedimientos de reconstrucción de cartílago pueden clasificarse como reparativos o regenerativos. El objetivo de las técnicas reparativas es reconstruir el defecto aliviando los síntomas, aunque la arquitectura del cartílago no necesariamente será restaurada. En cambio, las técnicas regenerativas intentan lograr la reconstrucción completa de la microarquitectura del cartílago, y el restablecimiento de todas sus funciones (Pascual-Garrido C et al, 2009).

1.1.3.1 Procedimientos reparativos

Los procedimientos reparativos se basan en la estimulación de médula ósea, a través de la penetración del hueso subcondral y exposición del hueso esponjoso vascular, a fin de lograr la liberación de células mesenquimales y sanguíneas con el objetivo de que ellas produzcan la reparación tisular. Dichos procedimientos incluyen las técnicas de perforación de la lesión, artroplastía de abrasión y microfractura (**Shah M et al, 2007**).

A fines de la década del 50 se describe la técnica de perforación, la cual implica la penetración del hueso subcondral en la zona del cartílago lesionado a fin de estimular estos procesos reparativos mencionados (**Muller B et al, 1999**). Posteriormente surge la técnica de artroplastía de abrasión donde parte del hueso subcondral lesionado es removido, dejando expuesto el tejido vascular (**Johnson L, 1986**). Ambos procedimientos fueron muy cuestionados debido al traumatismo originado en la zona de la lesión y a los malos resultados pos-operatorios obtenidos en modelos animales (**Bert J et al, 1989; Mitchell N et al, 1976**).

En 1997, Steadman y colaboradores introducen la técnica de microfractura, basada sobre los mismos principios que las anteriores pero sin remoción de hueso y menor riesgo de necrosis (**Steadman J et al, 1997**). Este procedimiento quirúrgico consiste en la remoción del cartílago calcificado, de manera tal que los bordes debridados sean perpendiculares, con el objeto de formar un “espacio contenedor” en el sitio de la lesión. Luego se realiza la perforación de la lámina subcondral para permitir el reclutamiento de células mesenquimales provenientes de la médula ósea en dicho espacio contenedor y, finalmente, la formación de un coágulo sanguíneo estable que rellena la lesión. Las células mesenquimales reclutadas pueden diferenciarse a fibrocondrocitos y contribuir a reparar la lesión mediante la formación de fibrocartílago (**Williams R et al, 2007**). Debe mencionarse que el fibrocartílago de reparación está constituido por distintas concentraciones de colágeno I, II y III, con características estructurales y mecánicas diferentes al cartílago hialino normal que recubre al tejido articular (**Frisbie D et al, 1999; Bae D et al, 2006**).

Esta técnica es frecuentemente utilizada para tratar pequeñas lesiones sintomáticas del cartílago articular de rodilla y, desde el punto de vista técnico, es simple y con costos

bajos respecto a otros tratamientos terapéuticos. Sin embargo, el éxito de la misma reside en el reclutamiento de células mesenquimales y en la estabilidad del coágulo sanguíneo que rellena el defecto condral. Y en los casos en los que los coágulos son inestables, es decir que se adhieren de forma parcial, o que rellenan sólo parcialmente la lesión, conducen a una reparación defectuosa (Frisbie D et al, 2003). Además, el reclutamiento de células mesenquimales es bastante baja y declina con la edad (Tran-Khanh N et al, 2005).

Diferentes trabajos retrospectivos, que informan la realización de tratamientos en atletas sometidos a alta exigencia, han demostrado que la técnica de microfractura muestra una mejoría clínica inicial, seguido de un deterioro posterior a largo plazo (Gobbi A et al, 2005; Mithoefer K et al, 2006; Mithoefer K et al, 2007). Por lo tanto, si bien es un procedimiento quirúrgico simple, utilizado como tratamiento de primera línea para lesiones condrales pequeñas de rodilla, los resultados no son satisfactorios a mediano/largo plazo.

1. 1. 3.2 Procedimientos regenerativos

Las técnicas regenerativas intentan lograr la reconstrucción del cartílago, y el restablecimiento de sus funciones bioquímicas, fisiológicas y biomecánicas, a través de la reconstrucción completa de la microarquitectura del mismo. Entre estas técnicas pueden mencionarse el trasplante osteocondral autólogo y el trasplante de aloinjerto osteocondral, como también las terapias celulares encuadradas dentro de la medicina regenerativa.

En 1995, Outerbridge y colaboradores describen por primera vez el trasplante osteocondral autólogo, también llamado plástica en mosaico osteocondral autóloga o mosaicoplastia (OATS) (Outerbridge H et al, 1995). Este procedimiento consiste en cortar, de la superficie periférica articular del cóndilo femoral que soporta menos peso, múltiples muestras osteocondrales autólogas, para trasplantarlas inmediatamente en el sitio de la lesión condral, donde son colocadas a presión, cubriendo el 90 a 100% de la superficie lesionada (Shah M et al, 2007).

Esta técnica puede ser realizada por artroscopía o artrotomía, y es adecuada para lesiones de 1 a 4 cm² y no más de 10 mm de profundidad. Es factible que el cartílago hialino trasplantado se mantenga viable, y dado que es autólogo no implica riesgo de transmisión de enfermedades ni de rechazo inmunológico (Gudas R et al, 2005; Shah M et al, 2007). Las limitaciones del OATS incluyen la escasa disponibilidad de injerto que puede obtenerse de la articulación, una alta probabilidad de morbilidad del sitio donante y la formación de hematomas pos-operatorios. Además, varios autores han destacado la importancia de la orientación espacial, espesor y propiedades mecánicas entre las zonas donantes y receptoras del cartílago, en la aparición de cambios degenerativos que limitan la integración del tejido y por ende la calidad de la reparación (Bedi A et al, 2010; Lane J et al, 2004; Rose T et al, 2005).

Otro procedimiento utilizado es el trasplante de aloinjerto osteocondral, que consiste en injertar, en el sitio de la lesión, tejido de cartílago hialino conteniendo el hueso subcondral subyacente, obtenido de donante cadavérico procesado y almacenado en bancos de huesos. El aloinjerto debe provenir de pacientes jóvenes y sanos, buscando que la calidad del tejido a trasplantar sea superior a las del paciente receptor. La viabilidad y funcionalidad de las células del tejido trasplantado es crucial para mantener la homeostasis dinámica de la matriz extracelular y garantizar la supervivencia a largo plazo del aloinjerto *in vivo*. En este sentido, los procedimientos de congelación y/o criopreservación que habitualmente son usados durante el procesamiento y/o almacenamiento del tejido pueden provocar efectos deletéreos sobre las células, disminuyendo su viabilidad (Bakay A et al, 1998; Bhatia S et al, 2012). Las limitaciones más importantes de este procedimiento son la escasa disponibilidad de donantes, la posibilidad de rechazo inmunológico, de infecciones o toxicidad (Outerbridge H et al, 1995; Bakay A et al, 1998; Gudas R et al, 2005; Shah M et al 2007; Bedi A et al, 2010). Estudios retrospectivos muestran buenos resultados cuando este procedimiento se practica con indicaciones apropiadas, no siendo exitosos en casos de artrosis primaria, lesiones bipolares de rodilla y en pacientes mayores de sesenta años (Ghazavi M et al, 1997).

Los pacientes añosos muestran una tendencia a sufrir lesiones condrales más extensas y signos tempranos de osteoartritis. Por otro lado, en pacientes menores de 50 años, los defectos focales contenidos, con perímetros articulares sanos, no se prestan a

procedimientos de artroplastia tradicional porque el riesgo de cirugía de revisión sigue siendo más alta. En esta población, como opción previa al reemplazo parcial o total, está siendo considerado en EEUU un novedoso procedimiento conocido como “resurfacing” o botones metálicos, que funcionaría como una transición hacia el reemplazo convencional de la articulación, con resultados similares a los procedimientos biológicos. Este procedimiento implica el implante de una prótesis focal o botón metálico que debe quedar unido al hueso del receptor, en un área donde el cartílago que rodea a la lesión no está dañado. Tanto los procedimientos biológicos como los botones metálicos buscan mantener el paradigma clínico de un tratamiento limitado al área del defecto, preservando el hueso, las superficies sanas del cartílago y los tejidos blandos, buscando la preservación y manejo de la artrosis y artritis de rodilla a largo plazo (Pascual Garrido C et al, 2017).

1.2. Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos

1.2.1. Medicina Regenerativa

El término medicina regenerativa fue usado por primera vez en 1992, en un artículo sobre administración hospitalaria de Leland Kaiser, quien mencionó una serie tecnologías que tendrían fuerte impacto hospitalario en el futuro. En ese artículo, el autor mencionaba esta disciplina como una nueva rama de la medicina que seguramente cambiaría el curso de enfermedades crónicas y en muchos casos regeneraría órganos en falla (Kaiser L, 1992; Lysaght M et al, 2009).

El uso más diseminado del término medicina regenerativa es atribuido a William Haseltine, un científico pionero en el conocimiento del genoma humano, quien reconoció la capacidad única de las células embrionarias de diferenciar en todos los tipos celulares del organismo humano, es decir, su pluripotencialidad, lo cual tendría aplicación en un nuevo tipo de terapéuticas. Refiriéndose a esta nueva clase de terapéuticas, este autor usó el término "medicina regenerativa" en la forma que actualmente se usa, como un enfoque terapéutico que emplea genes humanos, proteínas y células. El objetivo es recrear,

restaurar o proveer reemplazo mecánico para tejidos que han sido dañados por trauma, enfermedad o por el paso del tiempo, y ofrecen la perspectiva de curar enfermedades que hoy en día no pueden ser tratadas en forma efectiva, incluyendo aquéllas relacionadas con la edad (Haseltine W, 2004).

La medicina regenerativa fue definida a partir del conocimiento de las células troncales, sus potencialidades y su rol en la regeneración tisular, lo cual condujo a utilizar la capacidad propia de las células troncales para regenerar los órganos/tejidos propios dañados por diferentes enfermedades, mediante la estimulación de los mecanismos de cicatrización propios del cuerpo, restaurando la funcionalidad.

Si bien los enfoques terapéuticos de la medicina regenerativa surgieron a partir del uso de las células troncales (Riazi A et al, 2009), hoy en día este campo se ha ampliado para incluir todo tipo de células y/o sus productos. Dentro del campo de la medicina regenerativa se incluyen las terapias celulares (inyección de células troncales o progenitoras), la inducción de regeneración mediante moléculas biológicamente activas administrada solas o secretadas por células infundidas (terapias inmunomodulatorias), las terapias génicas y también el trasplante de órganos o tejidos desarrollados *in vitro* mediante técnicas de ingeniería de tejidos (Stoick-Cooper C et al, 2007; Muneoka K et al, 2008). Debe enfatizarse el carácter interdisciplinario de este nuevo campo de la medicina y la amplia variedad de tecnologías que pueden contribuir a obtener los objetivos que se buscan (Daar A et al, 2007).

En ortopedia, como en otras áreas, la medicina regenerativa aparece como una prometedora alternativa, y dentro de ella, el uso de células troncales mesenquimales para tratamiento de diversas enfermedades. Estas células fueron descritas por primera vez por Friedenstein en 1968, quien las obtuvo a partir de médula ósea (Friedenstein A et al, 1968). Su potencial osteocondrogénico *in vivo* fue demostrado en un modelo animal en 1990 (Nakahara H et al, 1990), y en 1994 estas células fueron usadas para reparar lesiones focales de cartílago articular, también en modelo animal (Wakitani S et al, 1994). Son células multipotenciales, lo cual les daría la posibilidad de permitir una activa regeneración de tejidos dañados (Murphy J et al, 2003). La administración local de células mesenquimales

a pacientes con osteoartritis podría potencialmente estimular la reparación del cartílago articular y limitar la progresión de la osteoartritis. Estudios recientes tanto en animales como en humanos han evaluado el efecto de inyecciones de células mesenquimales intra-articulares en rodilla, sobre la progresión a osteoartritis (**Kraeutler M et al, 2017 (a); Kraeutler M et al, 2017 (b)**).

1.2.2. Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos fue definida a fines del siglo XX como una disciplina que aplica los principios de las ciencias biológicas y la ingeniería, buscando entender la relación entre la estructura y la función en los tejidos, para desarrollar sustitutos capaces de restaurar, mejorar o mantener la función de tejidos dañados (**Langer R et al, 1993**).

La ingeniería de tejidos que, como ya se mencionó, se incluye dentro del campo de la medicina regenerativa, se apoya sobre dos grandes pilares: las células y los biomateriales, como herramientas necesarias para desarrollar un sustituto tisular funcional. Sin embargo, dichos pilares no pueden ser considerados aisladamente, sino formando parte de un microambiente que incluye todos los tipos celulares presentes, la matriz extracelular, las fuerzas que intervienen en ese microambiente, los factores bioactivos solubles secretados de forma autócrina, parácrina o endócrinamente, más el conjunto de interacciones entre todos estos actores. Las características de cada uno de los elementos de este complejo sistema, junto con sus interacciones, determinarán el éxito o fracaso del sustituto desarrollado por ingeniería de tejidos para una aplicación particular (**Shin H. 2007**). Pueden encontrarse numerosas aplicaciones de la ingeniería de tejidos en la bibliografía internacional. (**Vacanti J et al, 1997; Hellman K et al, 2007**).

El cultivo de epidermis ha sido la primera aplicación de la ingeniería de tejidos aún cuando dicha disciplina no había sido definida como tal. Rheinwald y Green desarrollaron por primera vez en 1975 una técnica de cultivo de queratinocitos que permitió obtener láminas epidérmicas estratificadas (**Rheinwald J et al, 1975 (a), Rheinwald J et al, 1975 (b)**).

Estas láminas pudieron ser utilizadas con propósitos terapéuticos sobre pacientes quemados a partir de 1981 (O'Connors N et al, 1981).

Gracias al entendimiento de la dinámica relación entre las células, la matriz extracelular y los factores bioactivos, la ingeniería de tejidos ha permitido nuevos enfoques en el campo de la cicatrización de heridas. Estas nuevas tecnologías, que combinan técnicas de cultivo celular con progresos en el desarrollo de biomateriales, han permitido obtener sustitutos cutáneosconteniendo tanto queratinocitos epidérmicos como fibroblasstos dérmicos (Lorenti A, 2012).

Además de esta aplicación en la cicatrización de heridas, la ingeniería de tejidos ha tenido aplicaciones en múltiples áreas de la medicina, como ser en el desarrollo de vasos y válvulas cardíacas (Majd H et al, 2009), corazón (Song J et al, 2011), hígado (Mazza G et al, 2015), uretra (Kanatani I et al, 2007), entre otros ejemplos.

También en el área de la traumatología el advenimiento de la ingeniería de tejidos ha iniciado un camino en la búsqueda de lograr la regeneraciónde diversos tejidos mediante la combinación de células con biomateriales y factores de crecimiento (Fedorovich N et al, 2012).Dentro de este campo de la medicina se pueden encontrar diversos ejemplos, que se suman a los mencionados anteriormente en relación a la medicina regenerativa, como la búsqueda de regeneración del cartílago para restablecimiento de la superficie articular funcional (Iwasa J et al, 2009; Bedi A et al, 2010), la regeneración ósea (Hejazi F et al, 2016;Zhang F et al, 2016), de tendones (Tong S et al, 2017), entre otros, usando células de diversos orígenes como también biomateriales.

1.2.3. Células troncales

Es necesario introducir el concepto de célula troncal en el contexto del proceso de regeneración. Las células troncales se definen por sus características funcionales. Éstas son:

- a. Indiferenciación: ausencia de marcadores de diferenciación y por ende de especialización y funcionalidad;
- b. Capacidad proliferativa: si bien en general están en estado de quiescencia, estas células tienen la posibilidad de reingresar al ciclo de división celular en forma prácticamente indefinida;
- c. Automantenimiento: capacidad de mantener su población en número relativamente estable, mediante división celular asimétrica;
- d. Capacidad de diferenciar a tipos celulares diversos;
- e. Capacidad para participar en la homeostasis y regeneración de los tejidos (Loeffler M et al, 1997; Zipori D, 2005; Morrison S et al, 2006; Jones D et al, 2008).

Existen distintos tipos de células troncales:

- a. Células troncales embrionarias: células pluripotenciales, derivadas del macizo celular interno del blastocisto, que en el humano es el estadio gestacional de 4-5 días (Nishikawa S et al, 2007);
- b. Células troncales embrionarias germinales: células pluripotenciales, derivadas de los esbozos gonadales del embrión temprano (Stem cells, 2001);
- c. Células troncales somáticas o del adulto: células en los distintos órganos o tejidos del individuo adulto. Son multipotenciales y con capacidad de originar los distintos tipos celulares especializados del individuo, manteniendo la homeostasis y participando en la regeneración posterior a un daño (Alison M et al, 2009).
- d. Células iPS (por sus siglas en inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*): células de pluripotencialidad inducida, derivadas de células adultas diferenciadas, muy similares a las células embrionarias, obtenidas por incorporación de cuatro factores de transcripción (factores de Yamanaka) en el genoma, sin participación de embriones ni procedimientos de transferencia nuclear (Takahashi K et al 2006; Takahashi K et al, 2007).

1.2.4. Ingeniería de Tejidos para reparación de cartílago hialino

La ingeniería de tejidos ha permitido enfocar la reconstrucción del cartílago mediante la asociación de células con biomateriales capaces de lograr estructuras de reemplazo/regeneración tisular. Con este objetivo, en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas sustentadas en el éxito de la regeneración celular logrado al cultivar *in vitro* distintos tipos celulares en medios apropiados, para amplificar y tener un número de células suficiente para implantar y producir la regeneración *in situ*. La regeneración se obtendrá mediante el trasplante directo de las células sobre la lesión, o bien de las células combinadas con matrices acelulares como soporte mecánico, y capaces de mantener la viabilidad, diferenciación y funcionalidad celular (Huang B et al, 2016).

1.2.4.1 Implante de células: condrocitos o células stem

Las aplicaciones clínicas de terapias basadas en células representan un gran desafío en la búsqueda de la reparación de defectos condrales. Se han intentado numerosos enfoques para desarrollar sustitutos mediante ingeniería de tejidos, siendo los primeros el implante de células solas, sin materiales, ya sea recién aisladas, como previamente cultivadas y amplificadas *in vitro* (Pittenger M et al, 1999; Johnstone B et al, 2013).

En este sentido, algunas líneas de investigación utilizan condrocitos derivados de muestras de cartílago sano, y otros usan células troncales, particularmente células mesenquimales derivadas de variadas fuentes, como médula ósea o tejido adiposo, como fue mencionado anteriormente (Jo C et al, 2014).

ACI: Implante de condrocitos autólogos

Uno de los enfoques en la búsqueda de regeneración del cartílago articular ha sido el implante de condrocitos autólogos (ACI, del inglés *Autologous Chondrocytes Implantation*), previamente amplificados *in vitro ex vivo*, que fue desarrollado y descrito por Brittberg y colaboradores en 1994 (Brittberg M et al, 1994; Cherubino P et al, 2003).

Esta técnica se aplica para lesiones condrales focales extensas, de grado III/IV en la clasificación Outerbridge. El procedimiento consiste en una evaluación artroscópica de la lesión condral, para determinar su tamaño y profundidad, y tomar una biopsia de cartílago de zona articular de no apoyo, a partir de la cual se aíslan los condrocitos autólogos. Estas células se cultivan y amplifican *in vitro*, y en una segunda etapa se implantan como suspensión (Shah M et al, 2007; Grande D et al, 1989; Cherubino P et al, 2003). El defecto condral es cubierto con injerto de periostio autólogo o con una membrana de colágeno tipo I/III de origen porcino dejando una cámara o bolsillo. En este espacio se inyecta el cultivo de condrocitos en suspensión, que luego se sella con fibrina (Peterson L et al, 2000; Micheli L et al, 2001; Ueno T et al, 2001; O'Driscoll S et al, 2001; Bentley G et al, 2003; Bartlett W et al, 2005 (a)).

La principal ventaja de esta técnica es la formación de cartílago hialino en mayor proporción que de fibrocartílago, lo cual conduce a mejores resultados a largo plazo (Peterson L et al, 2002). Por el contrario, una de sus grandes limitaciones es la posibilidad de que los condrocitos, al ser implantados en suspensión, no sólo no se distribuyan uniformemente, sino que se dispersen del sitio del implante (Sohn D et al, 2002; Kish G et al, 2004; Gooding C et al, 2006; Gikas P et al, 2008).

Esta tecnología ha producido resultados clínicos satisfactorios (satisfacción de los pacientes y examen clínico) en un seguimiento hecho durante un tiempo promedio de 13 años pos-implante (Pascual-Garrido C et al, 2009; Dell'Osso G et al, 2015).

MACI: Implante de condrocitos autólogos asociados a matriz

Ha sido demostrado que durante el cultivo *in vitro* de condrocitos en monocapa, estas células sufren un proceso de dediferenciación a un fenotipo fibroblastoide, lo cual coincide con la inducción de la expresión de colágeno tipo I y represión de la expresión de colágeno tipo II y otras proteínas específicas de cartílago hialino. Por el contrario, en otros estudios realizados cultivando condrocitos sobre matrices se demostró que las células estaban bien integradas a la matriz, con fenotipo y expresión de marcadores típicos de condrocitos diferenciados, como colágeno tipo II, condroitina-S y proteína S-100. (Grigolo B et al, 2002; Kaps C et al, 2004; Gigante A et al, 2007; Zheng M, et al, 2007). Estas características se podrían asociar con mayor capacidad de formación de cartílago hialino y por lo tanto mayor funcionalidad para la regeneración del defecto condral.

Con el objeto de superar las dificultades y limitaciones de la técnica de ACI, particularmente las ya mencionadas con la dediferenciación de estas células cuando son cultivadas *in vitro*, se desarrolló la técnica de implante de condrocitos autólogos asociados a matriz (MACI, del inglés: *Matrix-associated Autologous Chondrocytes Implantation*) (Schnabel M et al, 2002; Cherubino P et al, 2003). En este caso, los condrocitos autólogos son cultivados y amplificados *in vitro* sobre superficie plástica, y luego sobre una membrana biológica que finalmente es colocada sobre la lesión (Iwasa J et al, 2009; Zeifang F et al, 2010; Dunkin B et al, 2013).

Las matrices utilizadas en este procedimiento son biocompatibles y biodegradables, y sirven como sustrato para el cultivo de los condrocitos, permitiendo su diferenciación y maduración. Las membranas más usadas a nivel clínico son las de colágeno y las derivadas del ácido hialurónico (Iwasa J et al, 2009). Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las matrices tridimensionales favorecen la adhesión de los condrocitos y limitan la migración de proteínas inflamatorias al sitio de reparación (Nehrer S et al, 1998; Fuss M et al, 2000; Gigante A et al, 2003; Jones C et al, 2008).

Si bien las características de las células cultivadas sobre matrices se podrían asociar con mayor capacidad de formación de cartílago hialino y por lo tanto mayor funcionalidad para la regeneración del defecto condral, los resultados clínicos obtenidos usando los procedimientos ACI y MACI son similares (Bartlett W et al, 2005 (b); Manfredini

M et al, 2007; Pascual Garrido C, 2009; Browne J, et al. 2005; Zaslav K, et al 2009; Kon E, et al, 2009).

Células troncales

El uso de células troncales (en inglés *stem cells*) en medicina regenerativa ha despertado gran interés debido a la potencialidad de dichas células a diferenciarse hacia diferentes linajes. Las células de origen embrionario, capaces de diferenciarse hacia todos los tipos celulares de un individuo, representan una fuente ideal de células para la medicina regenerativa. Sin embargo, están asociadas a desafíos críticos, no solo desde el punto de vista científico, sino también ético, religioso y jurídico. Debido a esto se justifica la búsqueda de reservorios de células troncales a partir de tejidos posnatales. Ejemplos de éstos son la médula ósea, sangre periférica o vasos sanguíneos, tejido adiposo, tejidos placentarios, cordón umbilical, fluidos amnióticos, entre otros. Estas células troncales somáticas o del adulto aparecen como una opción clínica emergente para el tratamiento de enfermedades y/o lesiones tisulares debido fundamentalmente a su accesibilidad.

Las células troncales mesenquimales (MSCs), ya mencionadas, derivadas de la fracción nucleada de diversos tejidos, como médula ósea o de tejido adiposo entre otros, han sido investigadas extensamente en años recientes para su aplicación en distintas áreas de la medicina, como por ejemplo para la reparación de lesiones articulares (Corsi K et al, 2007; Kisiday J et al, 2008; Fortier L et al, 2010; Akkiraju H et al, 2015).

Las células mesenquimales, también conocidas como células estromales, son una población específica de tejido, de células troncales somáticas multipotentes no hematopoyéticas. Tienen propiedades de autorrenovación y de diferenciación *in vitro* hacia linajes mesenquimáticos, como osteogénico, condrogénico, neurogénico, miogénico y adipogénico, lo cual muestra como células muy prometedoras para ser usadas en aplicaciones clínicas para reparar/regenerar tejidos dañados. La posibilidad de

su uso a partir de tejidos autólogos genera una fuente segura de células para enfoques en medicina regenerativa (de Windt T et al, 2016).

Inicialmente se estableció la hipótesis de que las células progenitoras de médula ósea son células itinerantes, capaces de acudir a un órgano/tejido dañado y participar directa o indirectamente en el proceso de reparación. Su participación directa sería la diferenciación en células específicas, con neoformación de dicho tejido y reparación del daño/lesión, y la indirecta, mediante la producción de factores bioactivos de acción parácrina como respuesta a las interacciones entre las células progenitoras y el microambiente tisular.

Uno de los órganos sobre el que más se ha trabajado en este sentido es el corazón, en particular en la capacidad de células de médula ósea de migrar y “establecerse” (en inglés *homing*) en él luego de un infarto (Hofmann M et al, 2005). Los mecanismos que guían el *homing* de las células troncales en el miocardio no han sido completamente entendidos. En principio se considera que la lesión cardíaca sería condición necesaria para que se produzca la migración y el prendimiento de las células migrantes a largo plazo.

La capacidad de *homing* de células de médula ósea ha sido la base de la hipótesis para el implante pos-infarto de estas células, y su diferenciación hacia células funcionales de linaje cardiomiocítico (Orlic D et al, 2001; Kajstura J et al, 2005; Rota M et al, 2007). Sin embargo, esta afirmación, aceptada en los comienzos de este siglo, es hoy controvertida. Muchos investigadores piensan que el efecto de trasplante y permanencia de células trasplantadas es solo temporario, y depende fundamentalmente de los efectos parácrinos sobre las células residentes (Sheridan C, 2013).

Una de las estrategias más importantes para la medicina regenerativa/ingeniería de tejidos es proveer un microambiente capaz de nutrir, proteger y mantener la funcionalidad de las células, tal como lo hace la matriz extracelular (ECM) *in vivo*, que es clave en el desarrollo y regeneración de los tejidos. Las células interactúan con la ECM, mediante receptores específicos sobre la superficie de sus membranas. Las interacciones entre las células y la

ECM, así como las respuestas de las células a las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del microambiente, son los mecanismos que controlan la viabilidad, diferenciación, migración y proliferación celular, lo cual afectará la funcionalidad de las células y la remodelación del tejido.

Otros procedimientos regenerativos: Botones metálicos

El implante de botones metálicos (*focal metallic cartilage resurfacing*) ha surgido en los últimos tiempos como una transición entre los procedimientos regenerativos y la artroplastia primaria. Este tipo de dispositivo permite una reconstrucción de una superficie delimitada, preservando los tejidos sanos que rodean la lesión (Pascual-Garrido C et al, 2017).

1.3. Biomateriales

Como ya se mencionó, la ingeniería de tejidos ha demostrado ser potencialmente útil para lograr la regeneración del cartílago, que colaboraría en prevenir tanto lesiones condrales focales como también osteoartritis, mediante el desarrollo de equivalentes biológicos tisulares que reemplacen el tejido perdido o dañado.

El concepto básico de la ingeniería de tejidos es combinar células con biomateriales diseñados para crear estructuras tridimensionales (*scaffolds*), generando un microambiente que imite el ambiente tisular específico, promoviendo las interacciones célula-matriz extracelular y célula-célula. Este proceso conduciría a la diferenciación celular, y estimularía la regeneración del tejido nativo.

Para lograr este objetivo, los biomateriales para aplicación de la ingeniería de tejidos en ortopedia deberían ser capaces de integrarse con el tejido nativo, permitiendo la infiltración y proliferación celular, como también degradar a una tasa proporcional la formación de nuevo tejido, evitando causar respuesta inmunológica.

Las diversas características del material, como la topografía (alineación, simetría, diseño de superficie), las propiedades mecánicas, la presencia de factores de crecimiento, que se comportan como señales bioquímicas, y la composición química del material, juegan un papel muy importante en la dirección del destino y comportamiento celular (Subbiah R et al, 2015). Todos estos factores alteran el fenotipo y función de las células, como también las propiedades mecánicas durante el transcurso de la diferenciación celular. A modo de ejemplo puede mencionarse la capacidad de diferenciación de células mesenquimales hacia diferentes fenotipos, dependiendo de la rigidez del sustrato sobre el cual las células son sembradas (Raftery R et al, 2016).

En el caso de las células troncales, también ha sido probado que los cambios bioquímicos, biofísicos y biomecánicos durante el proceso de diferenciación también son influenciados por las características del material, con roles críticos de la ECM, el citoesqueleto de actina y las moléculas de adhesión focal. De este modo, la información integrada de una variedad de factores característicos de los materiales puede permitir entender y hasta en cierto modo predecir el comportamiento celular.

Múltiples materiales naturales y sintéticos han sido ensayados para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Sin embargo, cada tipo de tejido exige un análisis particular, en cuanto a la capacidad de adhesión o soporte de las células específicas y la organización y ensamblaje en un tejido funcional. Existe una importante cantidad de bibliografía relacionada con la aplicación de la ingeniería de tejidos en terapéuticas para enfermedades del cartílago articular en modelos animales. Sin embargo, una gran proporción de estos nuevos enfoques, que son exitosos en los modelos animales, no lo son cuando los mismos procedimientos se aplican en ensayos clínicos (Hay M et al, 2014). Por tal motivo, es necesario un meticuloso análisis de los resultados existentes. Este planteo riguroso es

imprescindible para guiar correctamente la búsqueda de materiales biomiméticos y bioactivos, capaces de conducir a terapéuticas más confiables y exitosas.

A medida que se desarrollen el entendimiento de la biología y la capacidad de la ingeniería de los biomateriales, podrán sintetizarse materiales biomédicos cada vez más sofisticados, diseñados con características químicas, físicas y biológicas que les permitan alcanzar objetivos terapéuticos específicos (Green J et al, 2016).

1.3.1. Hidrogeles

Los productos obtenidos por bioingeniería son herramientas prometedoras para la reparación del cartílago y el tratamiento de la osteoartritis. Entre ellos se encuentran, los hidrogeles inyectables, que se consideran particularmente ventajosos por la capacidad de los precursores de ser inyectados como una solución líquida que luego polimeriza *in vivo* para formar el hidrogel. Esta polimerización *in situ* mejora la adhesión y permite un mejor ajuste entre el hidrogel y el tejido nativo a su alrededor. Son materiales de origen sintético o natural, capaces de formar redes tridimensionales, que se caracterizan por su biocompatibilidad, adhesividad y biodegradabilidad (Vilela C et al, 2015).

Los recientes avances en la tecnología de *3D bioprinting* han permitido pensar en la posibilidad de ensamblar hidrogeles para la obtención de tejidos/órganos funcional y anatómicamente relevantes (Daly A et al, 2016; Ren X et al, 2016). También han sido usados hidrogeles inyectables como sistemas de *drug delivery*, permitiendo una liberación controlada y sostenida de drogas intra-articularmente por períodos de semanas o meses, para el tratamiento de enfermedades como osteoartritis o artritis reumatoidea (Bedouet L et al, 2013).

Los hidrogeles podrían ser diseñados para proveer un ambiente apropiado para que las células sinteticen y depositen nuevas moléculas de ME, al mismo tiempo que les otorguen

soporte mecánico para resistir las cargas fisiológicas a las que estarían expuestas (Akalp U et al, 2016).

Los hidrogeles son polímeros entrecruzados o reticulados, insolubles, que se hinchan en entornos acuosos. El alto contenido de agua de los hidrogeles puede ser modulado, para alcanzar valores similares al cartílago nativo, de alrededor del 80% de agua y aún superiores, lo cual facilita el rápido intercambio de nutrientes y sustancias de desecho hacia y desde las células embebidas en el hidrogel (Nicodemus G et al, 2008).

Los hidrogeles pueden ser clasificados como polímeros reticulados naturales o sintéticos, o una combinación de ambos (Griffith L et al, 2002). Los polímeros naturales tienen en general mayor biocompatibilidad y en algunos casos su similaridad bioquímica permite lograr que sean degradados por las enzimas secretadas por las células. Algunos ejemplos de polímeros naturales que se han usado para ingeniería de tejidos aplicada a cartílago incluyen colágeno, fibrina, alginato, hialuronan, seda y quitina (Spiller K et al, 2011).

Por otro lado, los polímeros sintéticos tienen la ventaja de que su síntesis puede ser controlada, permitiendo una mayor modulación sobre las propiedades macroscópicas y su capacidad de degradación. Algunos ejemplos que han sido usados son el poli (etilen glicol) (PEG) y poli (vinil alcohol) (PVA), entre otros. Hidrogeles formados a partir de polímeros sintéticos son diseñados para que tengan propiedades mecánicas y comportamiento ante la fricción, similares al cartílago articular (Li F et al, 2010; Villanueva I et al, 2008).

La combinación de polímeros sintéticos y naturales es un prometedor enfoque para crear hidrogeles biomiméticos, que pueden ser diseñados para imitar aspectos clave del ambiente nativo, pero modulando las propiedades mecánicas, químicas y de degradación de los hidrogeles (Bryant S et al 2005; Wang D et al, 2007; Varghese S et al, 2008; Smeriglio P et al, 2015; Barros D et al, 2015; Han F et al, 2015). En este sentido, un hidrogel ideal debería ser capaz de soportar las cargas de la articulación, degradarse gradualmente y transferir los estímulos de carga al tejido formado. Esto requiere poder modular la degradación del hidrogel junto con el crecimiento de ese nuevo tejido. La tasa de degradación depende

del grado de *crosslinking* (cuanto mayor es éste, menor es la degradación), y la elección de un reactivo degradable para producir el *crosslinking*, lo cual influye en la cinética de degradación. El desafío es que, para obtener una densidad de *crosslinking* suficientemente alta como para soportar la carga de la articulación, producirá una lenta degradación, y afectará negativamente la difusión de moléculas grandes, como factores de crecimiento y proteínas de la ECM sintetizadas *de novo*. En este sentido, moléculas de la ECM del cartílago, específicamente agregano y colágeno, son demasiado grandes como para ser transportadas a través del hidrogel reticulado, y por lo tanto, la degradación debe ocurrir antes de que el tejido macroscópico se forme (**Bryant S et al, 2002; Nicodemus G et al, 2011; Chung C et al, 2009**).

Mediante una cuidadosa modulación de las propiedades iniciales y la formulación del hidrogel es posible lograr una correcta y aceptable tasa de degradación al mismo tiempo que el crecimiento de nuevo tejido de cartílago. Esto ha sido factible usando hidrogeles susceptibles a la hidrólisis (es decir que puedan ser degradados por agua (**Bryant S et al, 2004; Roberts J et al, 2011**) y a enzimas secretadas por células encapsuladas (como ser metaloproteinasas y agreganasas) (**Bahney C, et al, 2011; Skaalure S et al, 2015**). Sin embargo, es importante mencionar que estos hidrogeles degradables que han logrado un crecimiento de tejido macroscópico tienen un módulo de compresión inicial que es de uno a dos órdenes de magnitud menor que el del cartílago. Esto implica que aún está pendiente el desafío de diseñar un hidrogel que simultáneamente soporte las cargas de la articulación y facilite el crecimiento del tejido (**Elisseeff J et al, 2005**).

Otra característica crítica del diseño de un hidrogel aceptable para el desarrollo de tejido cartilaginoso es obtener una integración óptima con el tejido circundante. Inicialmente, el hidrogel necesita adherirse a ese tejido, lo cual debe ser obtenido por polimerización *in situ* directamente en el defecto, y usar un adhesivo. La integración que ocurre resulta en un “puente” entre el tejido creado y la superficie del defecto, permitiendo a las células migrar desde el material o desde el tejido circundante (**Liebesny P et al, 2016**). Sin una adecuada integración, el hidrogel y el tejido creado son incapaces de transferir adecuadamente las cargas, y por lo tanto, se produce una discontinuidad entre el tejido circundante y el nuevo tejido formado con el hidrogel, llevando a una potencial falla del implante (**Haleem A et al, 2010**).

Como antecedente, se puede mencionar el desarrollo de un promisorio hidrogel basado en PEG (poly-ethylene glycol) entrecruzado (*crosslinked*), en el cual se introdujeron análogos de proteínas de ME, con el objeto de crear un hidrogel biomimético similar a cartílago (Aisenbrey E et al, 2016). En este caso, dos moléculas de ME de condroitin sulfato (ChS) y del tripéptido arginina-glicina-aspártico (RGD) fueron covalentemente incorporadas en el hidrogel (**Figura 1**). Por un lado, el condroitinsulfato es el principal glicosaminoglicano en el cartílago y crea un ambiente particular, que es hiperosmótico y promueve la síntesis de tejido (Urban J et al, 1989), especialmente bajo compresión dinámica (Villanueva I et al, 2010; Farnsworth N et al, 2014). Por otro lado, RGD, un tripéptido que favorece la adhesión celular provee un mecanismo para que las células puedan sentir la rigidez del sustrato y puedan actuar como mecanosensores de la compresión dinámica (Villanueva I et al, 2009). RGD ha demostrado soportar la condrogénesis (Salinas C et al, 2007; Liu S et al, 2010), mejorando la diferenciación a concentraciones bajas. Este sistema ha sido diseñado para ser *photoclickable*, es decir que los diferentes componentes (PEG, sulfato de condroitina, y RGD) son modificados con grupos químicos que, frente a la exposición a luz visible, reaccionan formando una red de polímero entrecruzado (**Figura 1**). Este hidrogel permite que las células puedan ser encapsuladas durante el proceso de formación del hidrogel, de modo que la combinación final se forme *in situ* dentro del sitio del defecto en el cuerpo (**Figuras 2 y 3**). Las ventajas de los hidrogeles *photoclickables* incluyen el control espacial y temporal durante su formación, la capacidad de polimerizar a pH y temperatura fisiológicos, y los tiempos cortos de polimerización que requieren (segundos a minutos) (Hoyle C et al, 2010).

1.3. Factores de crecimiento

Otra característica importante de los hidrogeles es la posibilidad de embeber en ellos células y factores de crecimiento con cierta facilidad (Elisseeff Jet al, 1999; Bryant S et al, 2002; Martens P et al, 2003; Sharma B et al, 2007; Sontjens S et al, 2006; Tatara A et al, 2016; Vo T et al, 2016).

Para muchos desarrollos de ingeniería de tejidos, los factores de crecimiento son señales críticas capaces de guiar la diferenciación y la maduración celular (Guang L et al, 2012; Wang Y et al 2015). Algunos miembros de la superfamilia de los factores de crecimiento transformante β (TGF- β 1/2/3 and BMPs) son conocidos como mediadores de la condrogénesis y osteogénesis. Algunos estudios han mostrado que la señalización producida por la superfamilia TGF- β es esencial para la esqueletogénesis. Aunque algunos estudios *in vitro* han logrado la diferenciación de las células mesenquimales sin factores de crecimiento, estos datos no han sido lo suficientemente categóricos. Además, para desarrollar tejidos complejos como los osteocondrales, mediante ingeniería de tejidos, es necesario un control *espacial* sobre la diferenciación. Por lo tanto, el uso de factores de crecimiento se considera crítico para los procesos involucrados en la diferenciación celular y la regeneración de tejidos.

Sin embargo, el agregado de factores de crecimiento no siempre es deseable ni fácilmente practicable, debido a la difusión de dichos factores hacia afuera del ambiente local, su baja estabilidad intrínseca en ambientes fisiológicos, y los requerimientos de altas concentraciones, lo cual puede generar severos efectos colaterales, incluyendo la formación de tumores. En este sentido, es necesario desarrollar estrategias alternativas para ubicar los factores de crecimiento en el sitio de interés, previniendo su diseminación, y también aumentar su potencia, lo cual permitiría su uso a menores concentraciones. Una estrategia en este sentido es la inmovilización de los factores de crecimiento en los *scaffold*, mediante la formación de uniones covalentes a través de la reacción de fracciones grupos funcionales en dicho andamio, con grupos funcionales aleatorios (como tioles y aminas primarias) en la superficie de la proteína. Estas estrategias están aún asociadas a inconvenientes, como ser lograr uniones controlables y sostenidas, evitar la inactivación de los factores de crecimiento y permitir el uso de concentraciones bajas para minimizar efectos no deseados.

Debe destacarse el desarrollo de un nuevo enfoque para introducir grupos azida en sitios específicos de una proteína usando la enzima ácido lipoico ligasa (LplA). LplA, que es específica para el sitio *GFEIDKVWYDLDA*, y que modifica enzimáticamente la lisina en ese péptido con la molécula 10-azidodecanoic acid. El péptido puede ser insertado en

cualquier punto del factor de crecimiento, y esta inserción no modifica el plegamiento de la proteína.

1.4. 3D Bioprinting

La búsqueda de tratamientos innovadores con aplicación en regeneración de tejidos es uno de los campos de la medicina moderna que tienden a lograr tejidos funcionales para traumas o patologías diversas.

Han sido mencionadas anteriormente algunas estrategias de ingeniería de tejidos que permiten generar sustitutos tisulares *in vitro*, con capacidad funcional mediante. Estas estrategias han evolucionado desde el enfoque inicial, el cultivo *in vitro* de células y su uso terapéutico como suspensión celular, y luego la siembra de células autólogas u homólogas cultivadas y amplificadas *in vitro*, sobre andamiajes o matrices tridimensionales.

La evolución mencionada es producto de la aceptación de que el microambiente tisular tiene un efecto fundamental e irremplazable sobre la funcionalidad de las células que se usarán para el desarrollo de sustitutos de tejidos. Y para lograr esta funcionalidad es necesario usar las células adecuadas, en el ambiente tridimensional que las células tienen *in vivo*, y el aporte de los factores solubles que actúan sobre el conjunto.

Una de las dificultades de este tipo de tecnologías está asociada a la complejidad de crear estructuras tisulares tridimensionales complejas y de espesor superior a 150µm, que permitan reproducir el comportamiento de las células *in vivo*. Para ello, es necesario lograr: a) la migración, adhesión y maduración celular en matrices preformadas, b) la ubicación precisa de los múltiples tipos celulares y factores de crecimiento en una arquitectura 3D específica; c) una vasculatura generada simultáneamente con la

construcción de la matriz celularizada, para la difusión de oxígeno en tejidos de gran espesor.

En los últimos años han surgido las novedosas tecnologías de bioimpresión (*3D bioprinting*), que permiten combinar la fabricación de estructuras 3D y la ubicación precisa de células y moléculas dentro de ellas. Esta tecnología ha emergido como promisoría e innovadora herramienta por su precisión, reproducibilidad y factibilidad de manipulación en áreas como ingeniería de tejidos, ensayo de drogas, análisis de sustancias, toxicología e investigación básica.

Existen diferentes tipos de tecnologías de impresión: inkjet, microextrusión y laser, con diferentes características, aplicaciones, ventajas y desventajas. En todos los casos las bioimpresoras combinan variados polímeros biodegradables y tipos celulares. Las dos primeras tecnologías son las más comúnmente utilizadas en Ingeniería de Tejidos, para el diseño y creación de estructuras que imiten la morfología y el microambiente tisular que las células tienen in vivo, modelizando el comportamiento natural de dichas células, sus interacciones y los procesos de diferenciación. Para esto, es necesario que la tecnología 3D Bioprinting sea capaz de solucionar puntos críticos, como la ubicación de las células en una estructura 3D bien definida, con biomateriales y factores solubles apropiados. Esto permitirá obtener sustitutos con morfología, arquitectura y microambiente similares al tejido nativo, proveyendo una nueva y valiosa herramienta a la ingeniería de tejidos.

La bioimpresora 3D es un sistema robótico que crea objetos de forma “*bottom-up*”, o sea imprimiendo lámina por lámina, de abajo hacia arriba, y luego uniéndolas mediante el “curado”, logrando la tridimensión. Las bioimpresoras controlan robóticamente la formación de cada lámina con materiales como hidrogeles y copolímeros, que sirve como soporte para la lámina siguiente, en lo que se conoce como estrategia de manufactura aditiva. Estos hidrogeles pueden incluir células vivas y el proceso permite el mantenimiento de su viabilidad.

1.5. PLANTEO DEL PROBLEMA

El bajo potencial de reparación del cartílago articular dado por sus características (avascular, aneural y alinfático) hace que el manejo de lesiones de cartílago de espesor total de cartílago articular en pacientes jóvenes o activos represente un serio problema en la práctica ortopédica. Dichas lesiones se acompañan en general por dolor, inmovilidad, rigidez de la articulación y peor calidad de vida, y a largo plazo conducen a osteoartritis, cuyo tratamiento habitual es el reemplazo total o parcial.

Como opción previa a dicho reemplazo, existe un procedimiento conocido como “resurfacing” (botones metálicos), que implica el implante de una prótesis focal o botón metálico que debe quedar unido al hueso del receptor, en un área donde el cartílago que rodea a la lesión no está dañado.

También existen otras basadas en los nuevos enfoques de la medicina regenerativa que intentan lograr la regeneración de la superficie articular funcional mediante la combinación de células, biomateriales y factores de crecimiento. El objetivo último de estos nuevos enfoques terapéuticos es mantener el paradigma clínico de un tratamiento limitado sólo al área del defecto, preservando el hueso, las superficies sanas del cartílago y los tejidos blandos.

El propósito que guía esta tesis se basa en la consideración de la gran cantidad de pacientes jóvenes y activos, en los cuales la gran decisión es en qué momento pasar de las terapias biológicas a la artroplastia, retrasando ésta todo lo posible, mediante el diseño de terapias biológicas innovadoras.

Este trabajo se basa, entonces, en el desarrollo de un sistema formado por un hidrogel inyectable capaz de polimerizar sus precursores *in vivo*, mejorando la adhesión y permitiendo un mejor ajuste entre el hidrogel y el tejido nativo a su alrededor. Este

hidrogel a su vez debe contener células troncales mesenquimales, derivadas de la fracción nucleada de médula ósea, para finalmente evaluar la actividad condrogénica de este sistema. Nuestra hipótesis es que el encapsulamiento de células MSC's en una combinación de un sistema basado en hidrogeles de PEG, al que se incorpora ChS como clave biológica, es una opción regenerativa superior a CHs/PEG sin células

1.6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el encapsulamiento de células MSC's en una combinación de un sistema basado en hidrogeles de PEG, al que se incorpora ChS como clave biológica, es una opción regenerativa superior a CHs/PEG sin células.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar si las MSCs encapsuladas en un hidrogel de condroitín sulfato/PEG (ChS/PEG) muestran actividad condrogénica aumentada *in vitro*, comparado con el hidrogel ChS/PEG sin células.
- b. Determinar si las MSCs derivadas de médula ósea encapsuladas en el hidrogel ChS/PEG producen una reparación superior del cartílago articular, comparada al hidrogel ChS/PEG sin células, en un modelo *in vivo* de injuria de cartílago en conejo adulto.
- c. Demostrar la prueba de concepto de la fotopolimerización *in vivo* del hidrogel en un modelo *in vivo* en conejos.
- d. Comparar los resultados de la aplicación de los botones metálicos focales con otros procedimientos biológicos, que incluyen debridamiento, microfractura, trasplante de autoinjerto osteocondral, de aloinjerto osteocondral e implante de condrocitos

autólogos en pacientes con lesiones femorocondrales de espesor total, de 35 años o mayores.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se describen a continuación los materiales y métodos relacionados con los procedimientos *In Vitro* e *In Vivo*

2.1. Metodología *In vitro*

2.1.1. Fabricación del Hidrogel

2.1.1.1. Síntesis del macrómero

Se sintetizó Poli(etilene glicol) (PEG) norbornene (8 brazos, 10kDa) a partir de PEG amina. Para ello, PEG multi-braza con aminas terminales (8 brazos, 10kDa) fue disuelto en dimetilformamida (DMF). Luego se hizo reaccionar con ácido 5-norbornene-2-carboxílico 4 M en exceso, en presencia de n, n-diisopropiletilamina (DIEA) y 2-((1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetrametil uranium hexafluorofosfato metanaminium (HATU) bajo purga de argón *overnight* a temperatura ambiente. El monómero PEG-norbornene de 8 brazos formado, se precipitó usando diethyl-ether frío, se filtró al vacío, y se purificó por diálisis. Se comprobó que la conjugación de norbornene a cada braza de PEG fue del 100%, mediante ^1H NMR.

2.1.1.2. Síntesis de Condroitin sulfato

Se sintetizó Condroitin sulfato tiolado (ChS) según el método descrito por Shu y col (Shu et al., 2002), mediante reacción de condroitin sulfato con carbodiimida dihidrazida tioácido. Para ello, el ChS fue disuelto en agua y agregado a ditiobis (dihidrazida

propanoico) (DTP) 2 M en exceso. El pH fue ajustado a 4,75 por adición de HCl 1 M. Se agregó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDCI) 2 M en exceso al ChS y DTP, y se dejó reaccionar *overnight* manteniendo el pH en 4.75. La reacción fue interrumpida por adición de NaOH 1M, aumentando el pH hasta 7. Se agregó dithiothreitol (DTT) 6.5 M en exceso en presencia de NaOH 1M, para incrementar el pH a 8.5, y se dejó reaccionar *overnight* para reducir los grupos tiol del DTP. La solución fue exhaustivamente dializada contra CIH diluido (0,3mM). Después de la diálisis, la solución fue centrifugada para eliminar toda partícula que hubiera quedado, y el sobrenadante fue liofilizado para recuperar el producto final. Usando HNMR, se determinó que la conjugación del ChS tiolado fue del 15%, lo cual significa que el 15% de las unidades repetitivas fueron conjugadas a un grupo tiol.

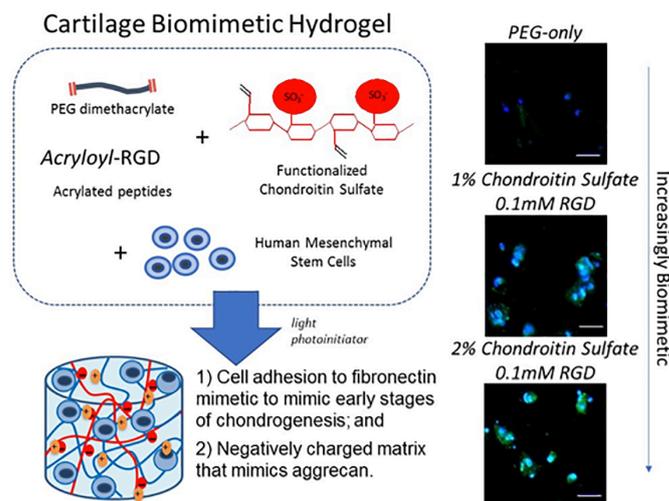
2.1.1.3. Fabricación de los Hidrogeles acelulares y celulares

Los hidrogeles acelulares fueron polimerizados *in situ* via fotopolimerización de la solución precursora esterilizada por filtración (0.22 μ m). Esta solución precursora consistía en: PEG-norbornene (8arm, 10kDa) (9 % p/v), ChS-thiol (1 % p/v), y CRGDS (0.1 mM) (GenScript, Piscataway, NJ, USA). El péptido *cross-linker* fue CVPLgSLYSGC 3.3 % p/v, (GenScript, Piscataway, NJ, USA), el cual es susceptible a las enzimas MMP 2 y MMP 9, y como fotoiniciador acilfosfinato de litio (LAP) (0.5 % p/v), en buffer fosfato (PBS, pH 7.4). Esto permite la formación de una red homogéneamente crosslinked.

Para hidrogeles celulares, las células MSCs fueron encapsuladas en los hidrogeles a una concentración de de solución precursora. Las células fueron encapsuladas en los hidrogeles biomiméticos degradables fotopolimerizables, consistentes de 9% (w/v) PEG (8 arm, 10kDa) norbornene, 1.4% (w/v) de un MMP2 péptido degradable crosslinker CVPLSLYSGC, 1% (w/v) ChS tiolado y 0.1mM CRGDS en PBS estéril con un inóculo de 3×10^6 células/ml de solución precursora, via fotopolimerización con luz de 352nm de longitud de onda, a 5 mW/cm² por 8 minutos. Los hidrogeles cargados fueron cultivados en medio de diferenciación condrogénica durante 9 semanas, con cambios de medio día

por medio. Fueron tomadas muestras a las semanas 3, 6 y 9, y la diferenciación fue analizada por qPCR e inmunohistoquímica (IHC). Las condiciones de preparación son citocompatibles, favoreciendo la encapsulación de las células.

En el esquema mostrado a continuación se describe el proceso de formación del hidrogel biomimético. Figura 1.



- 1) Adesión de células a fibronectina mimética para simular los estadios iniciales de condrogenesis 2) matriz negativa que simular aggrecan.

Figura 1: Se demuestra la composición del hidrogel. Asimismo, las figuras a la derecha muestran el incremento de condrogenesis al aumentar la concentración de condroitin sulfato

2.1.2. Aislamiento y expansión de células MSC derivadas de médula ósea

Las células mesenquimales derivadas de médula ósea de conejo (MSC) fueron aisladas a partir del húmero de un conejo New Zealand, blanco, macho, de 8 meses de edad. Siguiendo a la eutanasia del animal, los miembros superiores fueron disecados y los húmeros removidos. Los huesos fueron colocados en alcohol isopropílico 70% durante 5 segundos y luego lavados con buffer fosfato (PBS). Los extremos de cada húmero fueron abiertos y se dejó fluir tres veces el contenido con medio Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) en tubos cónicos de 50 ml. La médula ósea recogida de ambos húmeros

fue filtrada a través de un filtro de 70 μm para remover debris de hueso y sangre. Las células fueron centrifugadas a 200 g durante 5 minutos a 4°C para eliminar los componentes celulares de la sangre. El sobrenadante fue aspirado y las células resuspendidas en medio Alpha Minimum Essential Medium (α -MEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA), baja glucosa, conteniendo 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% Penicilina, estreptomycin y anfotericina A (PSA), con un inóculo de 0.25×10^6 cells/cm². Las células provenientes de los dos húmeros fueron plaqueadas en un frasco T-75, e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. El medio fue suplementado con factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (4ng/ml) para el mantenimiento y crecimiento y cambiado cada 3 días. Cuando las células alcanzaban una confluencia del 60% se subcultivaban mediante tratamiento con tripsina, sembrándolas con un inóculo de 1×10^3 cells/cm² hasta el pasaje 3-4, con el objeto de obtener 15–20 $\times 10^6$ MSCs/articulación a tratar. Las células BM-MSCs expandidas en cultivo fueron criopreservadas en 95% de suero autólogo con 5% dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, LLC, St. Louis, MO) en alícuotas de 1mL conteniendo 10×10^6 células cada una. Las células fueron criopreservadas hasta el día de realizar la cirugía. Las células correspondientes al grupo del hidrogel fueron incorporadas al mismo previamente a la inoculación en el defecto.

2.1.3. Encapsulación de células

Las MSCs fueron encapsuladas en el hidrogel biomimético degradable foto-polimerizable consistente de 9% (w/v) PEG (8 brazos, 10kDa) norbornene, 1.4% (w/v) del péptido *crosslinker* degradable de MMP2 (CVPLSLYSGC), 1% (w/v) ChS tiolado, y 0.1mM CRGDS en PBS estéril, a un inóculo de 50×10^6 células/ml de solución precursora via fotopolimerización con luz de 352 nm de longitud de onda a 5 mW/cm² durante 8 minutos. Los hidrogeles cargados con las células fueron cultivados en medio de diferenciación condrogénica durante 9 semanas, con cambios de medio cada dos días. A las semanas 3, 6 y 9 fueron tomadas muestras con el objeto de analizar el estado de diferenciación mediante las técnicas de qPCR e inmunohistoquímica (IHC).

2.1.4. Ensayo Mecánico

Se analizó el módulo compresivo de los hidrogeles después de 1 día (inicial), y a las semanas 3, 6 y 9 (n=3). Los hidrogeles fueron comprimidos a una tensión del 15%, a una velocidad de deformación de 0,1mm/min para obtener las curvas de deformación (MTS Synergie 100, 10N). El módulo compresivo fue determinado por la pendiente tangencial a la región lineal de la curva, entre el 10 y 15% de tensión.

2.1.5. Condrogénesis in vitro

Se evaluó la capacidad de condrogénesis de las células MSCs in vitro. Para ello, se comparó la capacidad condrogénica de células MSCs solas, células MSCs con hidrogel ChS/PEG, y el hidrogel ChS/PEG solo. Esta evaluación se realizó mediante el análisis histológico con tinción con Safranina O-Fast Green para detección de tejido de cartílago, cuantificación de glicosaminoglicanos (GAG) usando azul de dimetilmileno (DMMB), y la expresión de genes condrogénicos (Colágeno II, agrecano, Colágeno I, agreccanasa y Colágeno X) por análisis mediante qRT-PCR.

2.1.5.1. Reacción de Polimerasa cuantitativa (qPCR)

La expresión de genes fue analizada mediante qPCR para los marcadores condrogénicos: Sox9, agrecano y colágeno II, y los marcadores de hipertrofia Runx2 y colágeno X. Los hidrogeles (n=3) fueron lisados con TissueLyser (Qiagen, MD, USA) y el RNA fue extraído usando el kit MicroElute Total RNA (Omega bio-tek, GA, USA), según recomendaciones del fabricante. El RNA fue transcrito a cDNA con un kit de alta capacidad de transcripción reversa (Applied Biosystems, CA, USA), también siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Todos los datos de expresión de genes

fueron calculados mediante los valores de delta Cv, e informados como relativos al gen housekeeping gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y normalizada a los datos de 3 semanas.

2.1.5.2. Inmunohistoquímica y safranina O

Los hidrogeles cargados con células (n=3) fueron fijados en 4% paraformaldehido en PBS a 4°C, *overnight* (n=3). Después de una serie de pasos de deshidratación los constructos fueron embebidos en parafina y cortados (10µm). Los cortes fueron teñidos mediante inmunohistoquímica para presencia de PEG, colágenos II y X y con Safranin-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para detección de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs). Se realizaron pretratamientos enzimáticos con 2000 U/ml de hialuronidasa para PEG y colágeno II, y 1 mg/ml de proteasa seguida por 1 mg/ml de pepsina para colágeno X. Luego de la permeabilización de los constructos y el bloqueo, se trataron con los siguientes anticuerpos primarios, *overnight* at 4°C: 1:50 anti-PEG (cortesía de Steve Roffler), 1:50 anti-colágena II (Universidad de Iowa, Developmental Studies Hybridoma Bank), y 1:50 anti-colágeno X (Universidad de Iowa, Developmental Studies Hybridoma Bank) en solución de bloqueo 1% BSA. Las secciones fueron tratadas luego con los anticuerpos secundarios por 2h con AlexaFluor 488 goat anti-mouse o anti-rabbit IgG y contrateñidos con 4',6-Diamidina-2'-phenylindol dihydrochloride (DAPI) por 10 minutos a temperatura ambiente

2.2. Metodología In vivo

2.2.1. Cirugía en los animales, generación del defecto condral y Tratamiento

Se generaron defectos condrales bilaterales en las rodillas de todos los conejos en estudio. Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados en la University of Colorado

Anschutz Medical Campus. Los animales fueron tratados respetando las regulaciones de organismos internacionales para el manejo de animales.

Se formaron tres grupos de animales. (Figura 2)

Grupo 1: N=5

Rodilla Derecha: Defecto condral tratado con hydrogel ChS/PEG solo

Rodilla Izquierda: Defecto control sin tratamiento

Grupo 2: N=5

Rodilla Derecha: Defecto condral tratado con MSCs+hydrogel ChS/PEG

Rodilla Izquierda: Defecto control sin tratamiento

Grupo 3: control N=10

Sin tratamiento

En el siguiente esquema, se muestra el procedimiento descrito:

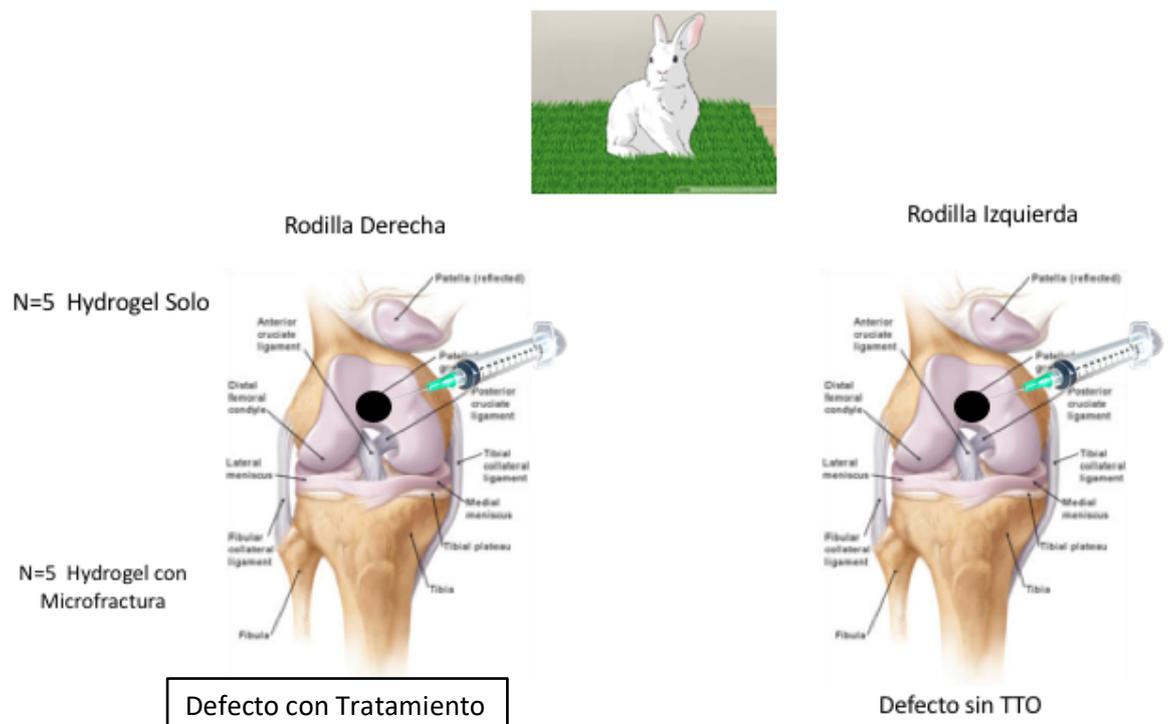


Figura 2 : Representacion de la realizacion del defecto condral en rodilla izquierda y derecha. La rodilla derecha recibio tratamiento. La rodilla izquierda de cada conejo fue utilizado como control intra-especie.

Para el procedimiento, se realizó una artrotomía bajo anestesia general inhalatoria con un abordaje medial-parapatelar a la articulación femoropatelar, y la patela fue luxada lateralmente. Se creó un defecto de tamaño crítico, de 3mm de diámetro, en la región central del surco troclear femoral, con una profundidad de 2mm.

Para llevar a cabo los tratamientos, aproximadamente 30-40 μ l de solución de macrómero ($3-4 \times 10^6$ MSCs por hidrogeles con MSCs) fueron inyectados en el defecto condral hasta llenarlo, dejándolo al ras con el tejido que rodea la lesión y fotopolimerizado *in situ* a 1000 mW cm^{-2} por 40 segundos.

Antes de la aplicación del tratamiento, el defecto fue cuidadosamente secado con CO_2 para favorecer la adhesión del hidrogel. Los defectos fueron llenados según los tratamientos correspondientes (n=5 MSCs + Hidrogeles; n=5 Hidrogeles solos) o no tratados (n=10) como se estableció en la asignación de los grupos. Al finalizar la cirugía, todos los conejos fueron mantenidos en el bioterio, con deambulaci3n con apoyo segun tolerancia. La eutanasia y el análisis histológico se realizaron a los 6 meses después de la cirugía. El esquema del procedimiento se muestra en la figura 1, donde A muestra la inyección *in situ* del precursor del hidrogel en cuarto oscuro, bajo luz roja; en B se indica la fotopolimerización del hidrogel *in situ*, utilizando luz azul visible de 405 nm de longitud de onda en cuarto oscuro; y en C se indica el defecto inoculado con células e hidrogel.

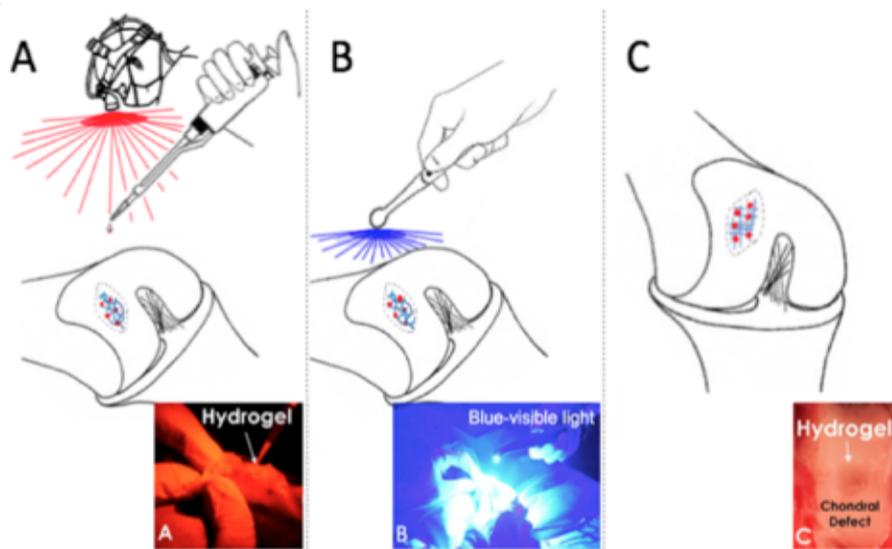


Figura 3. A) Inyección in situ del precursor del hidrogel en quirófano, en oscuridad, bajo luz roja. B) Foto-polimerización del hidrogel in situ usando luz azul-visible de 405-nm en quirófano oscuro. C) Defecto rellenado con el hidrogel polimerizado.

2.2.2. Evaluación del tejido de reparación a los 6 meses pos-cirugía

Seis meses después de la cirugía, los conejos fueron eutanizados por sobredosis de barbituratos. En el momento de la necropsia, se cortó en forma circular el área del defecto, y se dividió el tejido por la mitad. Una mitad del tejido de reparación, conteniendo tejido nativo circundante se fijó en formol-buffer para análisis histológico, y la otra mitad fue embebida en OCTy congelada para inmunohistoquímica.

La evaluación de los resultados se realizó mediante análisis macroscópico e histológico usando 2 scores:

- Score de O'Driscoll (MODS System) (O'Driscoll et al, 1986, O'Driscoll et al, 1988), que evalúa los siguientes parámetros: 1-morfología celular, 2-afinidad de la matriz por la safranina-O, 3-regularidad de la superficie, 4-integridad estructural, 5-profundidad, 6-uni3n al cartilago adyacente, 7-reconstrucci3n de hueso subcondral, 8-respuesta inflamatoria, 9- hipocelularidad, 10-porcentaje de condrocitos

formando *clusters*, 11-tipo de cambios degenerativos en el cartílago adyacente. Cada parámetro individual tiene el máximo dentro del rango 2 a 4. La valoración total va de 0 (ningún signo de reparación de cartílago) a 24 (regeneración completa). Para ensayar la unión al hueso subcondral, y con el objeto de mejorar la evaluación se utilizó un criterio, que fue el SBB (*Subchondral Bone Binding*), que se graduó de 0 a 3 dependiendo del porcentaje de unión (3: 100-76% de unión al hueso subcondral; 2: 75-50%; 1: 49-25%; y 0: <24%).

- Score de ICRS2 (International Cartilage Repair Society) (**Mainil-Varlet et al, 2010**), que evalúa los siguientes parámetros: 1-morfología del tejido, 2-tinción de matriz, 3-morfología celular, 4- porcentaje de condrocitos formando *clusters*, 5-arquitectura de la superficie, 6-integración basal, 7-formación de *tidemark*, 8-anormalidades de hueso subcondral/fibrosis medular, 9-inflamación, 10-calcificación/osificación anormal, 11-vascularización, 12-superficie, 13-evaluación de zona media y profunda, 14-evaluación general. Cada parámetro individual se mide en porcentaje de 0 a 100. La evaluación consiste de diferentes categorías que incluyen grado de reparación del defecto, integración con la zona borde y apariencia macroscópica. Los grados iban de 1 a 4 (1: cartílago normal; 2: casi normal; 3: anormal; y 4: severamente anormal). Tinción con Safranin-O: para la evaluación fueron seleccionados los cortes al azar por una persona que no participó del estudio, y cuantificados por contenido de proteoglicanos (PG) (teñidos de rojo) por tres observadores. El NIS-Elements AR (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) fue usado para este propósito demarcando el área del defecto y cuantificando el porcentaje teñido de rojo relacionado con el área total del defecto.

2.3. Diseño de la metodología en pacientes

2.3.1. Diseño del estudio

Se diseñó un estudio de cohorte comparativa, entre dos grupos: 32 pacientes en el grupo CAP (botones metálicos focales) y 30 pacientes en el grupo BIO, en el cual se incluyen pacientes tratados por debridamiento, microfractura, trasplante de autoinjerto

osteocondral, de aloinjerto osteocondral e implante de condrocitos autólogos. El punto final y los criterios de selección de pacientes para ambos grupos fueron los mismos.

2.3.2. Población y muestra

2.3.2.1. Criterios de elegibilidad

Ambos grupos (BIO y CAP) incluyeron pacientes con datos completos preoperatorios y finales, con un seguimiento de 2 años. Todos los pacientes cumplieron los criterios de inclusión y exclusión mostrados en la siguiente tabla. El grupo CAP se basó en un ensayo clínico de investigación Fase II. Todos los pacientes que necesitaron reemplazo de rodilla tradicional con anterioridad a cumplirse los 2 años no fueron seguidos después del procedimiento de revisión, y no fueron incluidos en el análisis. Sin embargo, ellos fueron incluidos en la evaluación de fracasos y cirugía de revisión. Todas las actividades fueron aprobadas por el comité de revisión institucional y todos los participantes dieron su consentimiento por escrito. Los datos de los pacientes fueron anonimizados para el propósito de este trabajo.

Tabla 1: Criterios de elegibilidad

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Seguimiento de 24 meses	Más de un defecto articular grado IV (ICRS) sobre el cóndilo femoral medial or lateral
Edad entre 35 y 60 años	Alineamiento de la articulación en varus o valgus superior a 7°, respecto del eje mecánico neutro en el miembro afectado
Defecto de superficie articular localizado en cóndilo femoral medial/lateral, de Grado IV (International Cartilage Repair Society)	Evidencia de desórdenes metabólicos que pudieran impedir o alterar la formación de hueso en cicatrización
Buena estabilidad de la articulación afectada, de grado 1 Lachman o	Evidencia de infecciones en sitios remotos, que pudieran diseminarse al sitio del implante

mendor, sin cambio de pivote de
inestabilidad anterior y sin traducción
posterior mayor que grado I

Déficit de motilidad pasiva medido
como carencia de extensión menor a
10°

Evidencia de artritis reumatoidea, destrucción masiva de la articulación,
artropatías infecciosa/cristal, o resorción de hueso visible en Rx

Evidencia de inestabilidad crónica, tejidos blandos deficientes, o
insuficiencia vascular o muscular

Historia de aloinjerto meniscal previa, o injerto osteocondral en falla, con
presencia de quistes, o reemplazo parcial de la articulación

Dolor o pérdida de función de la articulación no resuelta, de causa no
determinada

Defecto medial o lateral del cóndilo femoral no focal o muy grande
(superior a 20 mm)

Defecto medial o lateral de la superficie del cóndilo femoral no
localizado en forma relativamente central, de modo de que el implante se
extendería más allá del aspecto lateral o medial

Condiciones degenerativas o inflamatorias diseminadas, que producirían
que la mitigación del dolor como resultado del implante fuera no
significativa o dificultosa de medir

Daño significativo (definido como cambios superiores a grado II) de la
superficie articular opuesta al implante

Daño significativo (definido como cambios superiores a grado II) de la
superficie articular en otros compartimientos dentro de la articulación
afectada

Estructuras de soporte de tejido blando severamente comprometidos en la
articulación. Cóndilo femoral severamente degenerado o de morfología
irregular, donde la restauración de la superficie articular continua no es
posible, como displasia, fracturas mal unidas, osteocondrosis, o lesiones
no focales

2.3.2.2. Características demográficas

Las características de los pacientes incluidos en los grupos CAP y BIO se muestran en la siguiente
tabla:

Tabla 2: Características demográficas

	BIO (n = 30)	CAP (n = 32)	p
Edad (años)	44.6 ± 8.5 (35-64)	47.9 ± 8.3 (37-68)	0,7
Índice de masa corporal (kg/m2)	30.4 ± 7.8 (18.4-50.3)	26.7 ± 3.67 (19.0-33.5)	0,03*
Sexo femenino	40%	34%	0,65
Fumador	10%	25%	0,12
Rodilla izquierda involucrada	53%	67%	0,3
Tiempo de seguimiento (años)	2,6 ± 0,6 (2-4)	2,0 ± 0,0 (2-3)	<0,001 *

Valores expresados como media ± [desvío estándar o error estándar] y rango para las variables numéricas y frecuencia y porcentaje para las variables categóricas*Estadísticamente significativo, test de fisher para las comparaciones de variables categóricas y test de student para las comparaciones de variables numericas.

2.3.3. Medidas de resultados

2.3.3.1. Definición de resultado exitoso: Punto final primario

El protocolo para el grupo CAP determinó la definición de resultado exitoso para el procedimiento de cartílago focal. Los parámetros clínicos fueron combinados con la necesidad de subsiguientes intervenciones en el curso de 2 años. Para comparar efectivamente ambos grupos, el grupo BIO siguió el mismo criterio. El resultado éxito fue definido de acuerdo con parámetros previamente publicados, usando la mínima diferencia clínicamente importante respecto del valor basal. El resultado de los pacientes fue considerado exitoso si ellos mejoraron al menos 20% según los índices Western Ontario y McMaster Osteoarthritis Index (WOMAC) de dolor y función en la rodilla en estudio y no sufrieron ningún defecto subsiguiente o procedimiento de implante relacionado, durante el período de seguimiento de 2 años.

2.3.3.2. Comparación de efectividad secundaria

Los parámetros secundarios incluyeron WOMAC scores, el formulario SF-12, un formulario de satisfacción y de aparición de eventos adversos. Para cada interpretación y comparación, el WOMAC score para cada grupo fue convertido a scores normalizados en 100. En el grupo BIO, el WOMAC score fue derivado del registro del cuestionario de Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) Los ítems del WOMAC Likert están incluidos en las subescalas de KOOS de dolor, síntomas y actividades de la vida diaria. Los scores de Likert para cada dominio fueron contados y luego convertidos a 100, siendo 100 el mejor y 0 el peor, usando la siguiente fórmula:

$$100 - (\text{score real} \times 100) / \text{rango de score posible}$$

En el grupo CAP fue usado el cuestionario WOMAC y se calcularon los scores para cada dominio. Los resultados fueron luego convertidos a un score normalizado en 100, siendo 100 el mejor y 0 el peor, por la misma fórmula anterior. El libro de Ware y colaboradores fue usado para realizar los cálculos estandar para el formulario SF-12 (Ware J et al, 1995). Ambos componentes fueron usados en la comparación: el score de componente físico (PCS) y el de componente mental (MCS).

Un cuestionario de satisfacción fue presentado por el cirujano al final del período de seguimiento, realizado sobre la base de preguntas a los pacientes sobre su satisfacción respecto de la resolución de sus síntomas, como también su satisfacción general. También se preguntó a los cirujanos respecto de su satisfacción general con la cirugía. Todos los cuestionarios fueron basados sobre una escala de 10 = excellent, 8 = muy bueno, 6 = bueno, 4 = regular, y 2 = pobre.

2.3.3.3. Comparación de seguridad secundaria: efectos adversos

El diseño prospectivo en el grupo CAP proporcionó estrictos datos de eventos adversos mediante continuos intervalos de seguimiento y monitoreo de datos durante el curso de los 2 años de la investigación. Como estudio basado en registros, las reoperaciones y datos de eventos adversos para el grupo BIO fueron colectados de registros e historias clínicas. La comparación de seguridad

secundaria se basó en el registro de eventos adversos relacionados con la rodilla tratada, a los 24 meses de seguimiento.

2.3.4. Análisis estadístico

Ambos grupos fueron evaluados a tiempos similares: 3, 6, 12 y 24 meses. Sin embargo, el grupo BIO sólo completó los cuestionarios preoperatorios y a los 24 meses de seguimiento. Por lo tanto, sólo los datos basales y de los 2 años de seguimiento fueron usados para el análisis. Ambos grupos de datos fueron observados para comprobar que estaban normalmente distribuidos. El test de Fisher fue usado para analizar las diferencias entre los grupos en cuanto a la proporción de pacientes con al menos una reoperación. El modelo de riesgo proporcional de Cox para la comparación de la curva de supervivencia no pudo ser realizado dada la baja tasa de pacientes que fueron reoperados. Se realizó la comparación estadística usando el t-test para evaluar los resultados pre- y pos-operatorios para cada grupo y las mejorías entre los grupos. El punto final primario de resultado exitoso, así como la satisfacción fueron comparados entre cada grupo y el último seguimiento, usando el t-test. El valor p fue determinado como 0,05 a priori.

3. RESULTADOS

3.1. Resultados In Vitro

3.1.1. Prueba mecánica

El valor del módulo compresivo hallado fue 65kPa en el día 1, y descendió hasta aproximadamente un 30% después de 3 semanas, 15% después de 6 semanas y se mantuvo estable hasta las 9 semanas ($p < 0.01$). Esta caída del módulo desde la encapsulación hasta las 6 semanas representa la degradación enzimática de la MMP2 por las células encapsuladas. Sin embargo, la similaridad en el valor del módulo compresivo desde la semana 6 a la 9 puede deberse a la capacidad de las células de sintetizar su propia matriz extracelular, simultáneamente con la degradación del hidrogel, manteniendo estable la integridad del tejido generado (**Figura 4**).

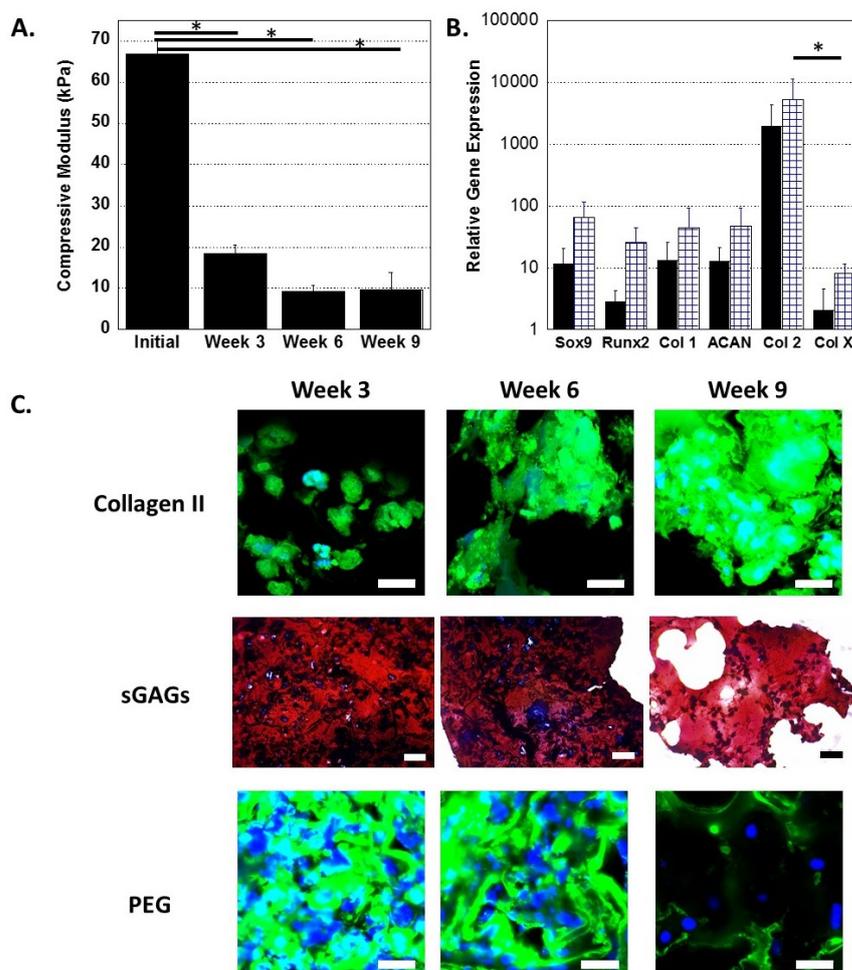


Figura 4. A) Módulo compresivo inicialmente (día 1) y a las semanas 3, 6 y 9 (n=3, las barras de error indican la desviación estandar, * indica $p<0.01$). B) qPCR de la expresión relativa de genes marcadores de diferenciación condrogénica e hipertróficos normalizados a la semana 3 (n=3, las barras de error indican la desviación estandar, * indica $p<0.01$). C.) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica e histología de colágeno II (verde), sGAGs (rojo), y PEG (verde) en las semanas 3, 6 y 9. En las imágenes de inmunohistoquímica de colágeno II y PEG, los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul), barras de la escala=20 μ m. Los núcleos en las imágenes histológicas de sGAGs (Safranina-O) fueron contrateñidos con Fastt Green (negro), barra de escala=100 μ m.

3.1.2. Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR)

La condrogénesis fue evaluada mediante qPCR e inmunohistoquímica para colágeno II, sox9 y agrecano, como marcadores de condrogénesis, y colágeno X y RunX2 como marcadores de hipertrofia. Los datos de expresión de genes están representados como la expresión normalizada de mRNA de las MSCs encapsuladas en la semana 9 en relación a los datos de la semana 3. Después de 6 y 9 semanas de cultivo, los marcadores de condrogénesis Sox9, agrecano y colágeno II fueron elevados, indicando la diferenciación condrogénica de las MSCs encapsuladas. Del mismo modo, los marcadores de hipertrofia Runx2 y colágeno X también fueron elevados a las 9 semanas, aunque la expresión del gen de colágeno II fue significativamente superior que la del colágeno X ($p<0.01$) (**Figura 2 B**). A nivel de proteínas, las MSCs encapsuladas expresaron colágeno II después de la semana 3, y a la semana 9 la producción de colágeno II fue prevalente en el hidrogel.

3.1.3. Histología

Las imágenes histológicas de GAGs teñidos por Safranina-O indican la presencia de GAGs a las 9 semanas (**Figura 2 C**). La tinción positiva en los tiempos más tempranos era esperable debido a la incorporación de ChS en la formulación del hidrogel. Sin embargo, en la semana 9 se mantuvo la tinción positiva, a pesar de la degradación del hidrogel, debido a la síntesis de GAGs. La inmunohistoquímica para PEG mostró una degradación significativa del hidrogel sintético a lo largo del periodo de estudio de las 9 semanas, indicando que las MSCs encapsuladas pueden degradar el péptido *crosslinker*

sensible a MMP2. Comparando las tinciones de colágeno II y PEG, se observa que la producción de la proteína Colágeno II fue proporcional a la reducción de la tinción positiva para PEG, y que en la semana 9 hubo una significativa predominancia de colágeno II sobre PEG. Estos resultados coinciden con los datos del módulo compresivo, indicando que la ECM producida por las MSCs encapsuladas mantenía la integridad del tejido, a medida que el hidrogel se degradaba.

3.2. Resultados In Vivo

3.2.1. Resultados Macroscópicos en Modelo Animal

Al momento de la eutanasia, se observó la reparación de todos los defectos. Macroscópicamente, no se observó reacción sinovial o inflamación. Comparados al control, los grupos de estudio mostraron un tejido reparado inferior con respecto a un tejido reparado casi normal. El score ICRS macroscópico promedio para los grupos fue: A (hidrogel solo): 10 ± 1.7 (casi normal); B (hidrogel + MSCs): 10 ± 1.4 (casi normal); y C (control): 11.3 ± 1.06 (normal) ($p=0.088$). Una rodilla que fue tratada con el hidrogel solo (conejo N°3) presentó una subluxación patelar lateral y resultó en un tejido tipo fibrocartílago macroscópicamente reactivo sobre el aspecto lateral del borde troclear. El defecto condral mostró tejido de reparación del cartílago anormal (**Figuras 5 y 6**).

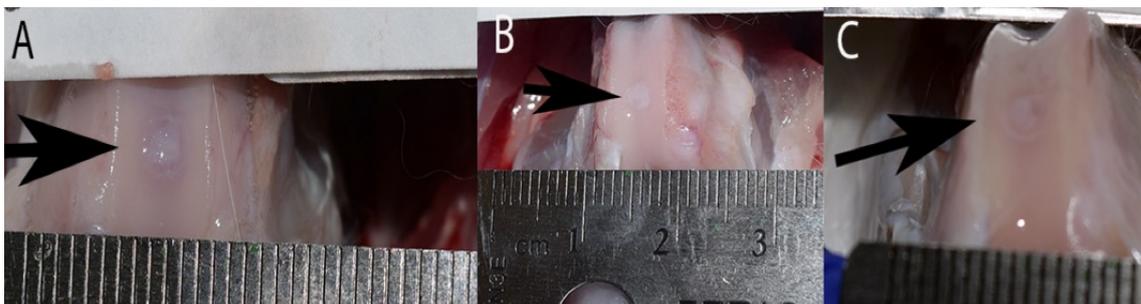


Figura 5: Disección macroscópica de las lesiones de cartílago reparado. A) Control; b) Hidrogel solo; C) Hidrogel y MSCs. Las flechas indican el defecto condral.

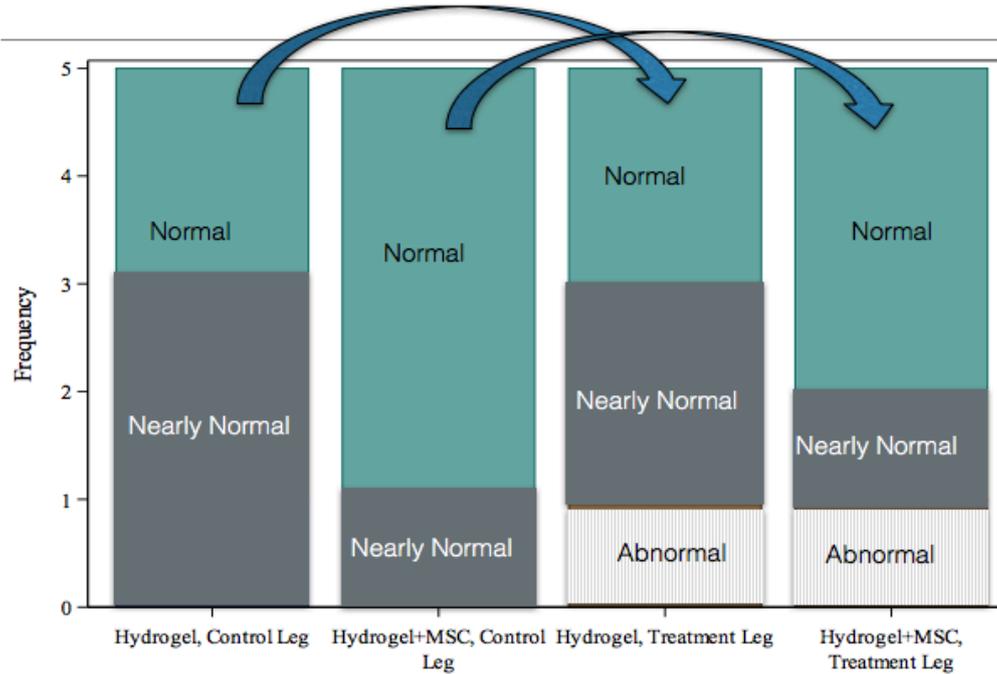


Figura 6: Esquema que compara macroscópicamente el control a su correspondiente tratamiento contralateral. Macroscópicamente, la adición del tratamiento ya sea hidrogel solo o hidrogel con MSCs redujo la cantidad de tejido normal ($p=0.41$). Cada flecha muestra el control comparado a la lesión correspondiente contralateral. En algunas muestras el tejido normal se redujo luego del tratamiento, observándose tejido anormal. Estos tejidos anormales nunca fueron evidentes en el grupo control.

3.2.2. Histología

Cuando se evaluó con el sistema ICRS II, el mejor resultado se observó en el grupo control seguido por el hidrogel solo (A: 56 ± 26.1 , B: 48 ± 25.8 , C: 70 ± 10.5) ($p= 0.324$). Cuando se comparó con el criterio de O’driscoll entre la lesión tratada y su control contralateral, el hidrogel solo tuvo el score más alto. Esto incluyó la tinción de Safranina O, mayor superficie, mayor unión al cartílago adyacente y reconstrucción de la placa subcondral ($p<0.05$) (Figuras 5, 6, 7, 8, 9). Si bien no se hallaron diferencias significativas dentro de los grupos, microscópicamente el hidrogel solo tuvo el score promedio total más alto con el sistema O’Driscoll (A: 17.4 ± 4.7 ; B: 13 ± 3 ; y C: 16.7 ± 2.9) ($p= 0.11$). (**Figura 7**)

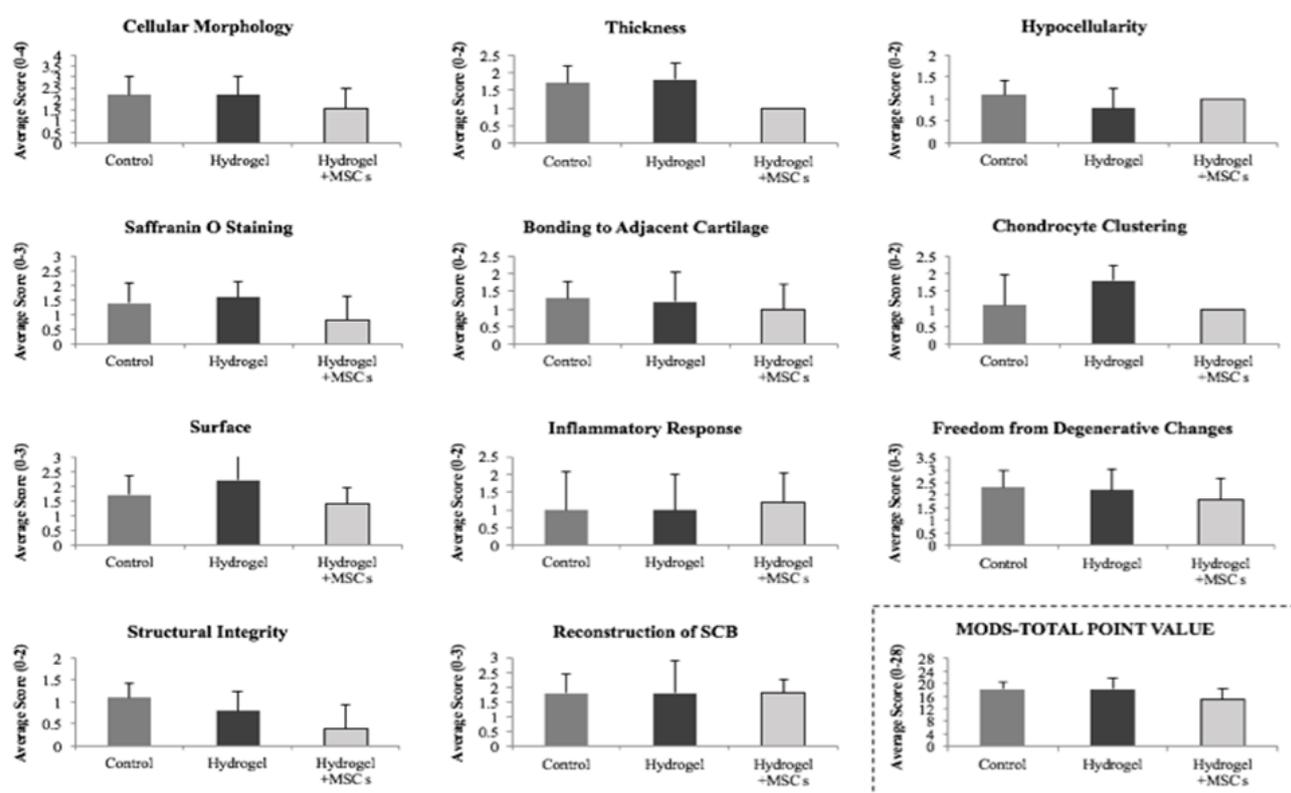


Figura 7: Resultados histológicos de los diferentes parámetros ensayados con el score de O'Driscoll para cada grupo.

Analizando por separado el criterio SBB (Subchondral Bone Binding), especialmente diseñado para este estudio, el grupo tratado con hidrogel más MSC mostró una tendencia a tener mayor integración, aunque las diferencias no fueron significativas: A: 0.8 ± 1.3 , B: 2.2 ± 0.84 and C: 1.5 ± 1.35 ($P=0.23$). Es de destacar que el SBB se vio comprometido en el Grupo A, con una unión de menos del 25% al hueso subcondral. El porcentaje de proteoglicanos (coloración roja) fue calculada a partir de preparados histológicos seleccionados al azar en cada grupo. Aunque no se encontraron diferencias significativas, el hidrogel solo mostró una mayor tinción de la matriz con Safranin-O (Grupo A: $49.4\% \pm 20$, Grupo B: $25.8\% \pm 16.4$ y Grupo C: $36.9\% \pm 25.2$) ($P=0.27$). Tres de los 5 defectos condrales tratados con hidrogel solo mostraron moderada tinción, mientras que otros dos mostraron mínima tinción. Uno de ellos pertenecía al animal que presentó la subluxación patelar.

El porcentaje de proteoglicanos (color rojo), calculado de cortes seleccionados al azar en cada grupo, aunque no mostró diferencias significativas, mostró una tendencia a mayor tinción con Safranina-O en el grupo hidrogel solo (Grupo A: $49.4\% \pm 20$, Grupo B: $25.8\% \pm 16.4$ y Grupo C: $36.9\% \pm 25.2$) ($P=0.27$). Tres de los 5 defectos condrales tratados con hidrogel solo mostraron

moderada tinción, mientras que dos mostraron tinción mínima. Uno de ellos pertenecía al animal que presentó subluxación patelar (Figuras 8, 9,10, 11,12).

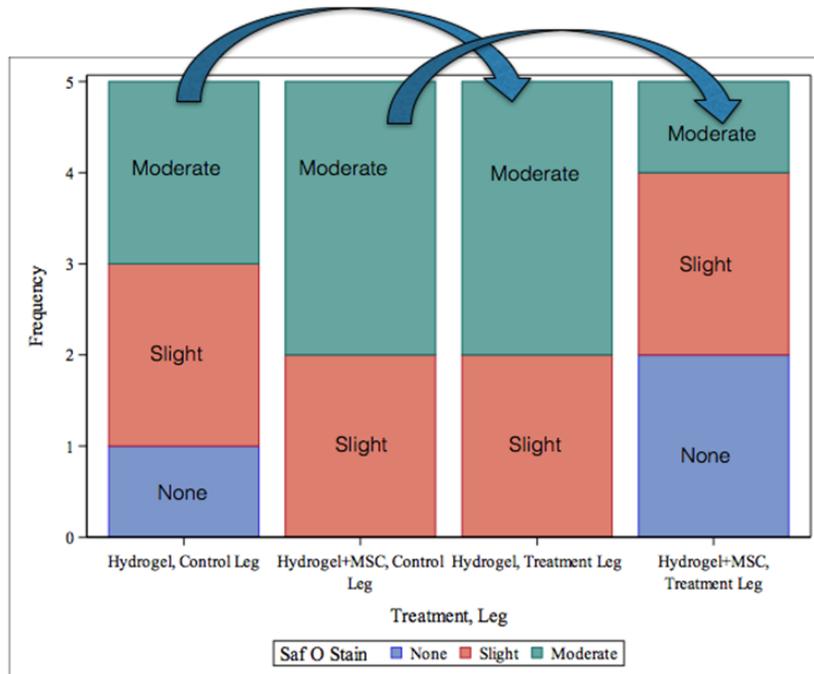


Figura 8: Esquema que compara el valor control a su correspondiente tratamiento contralateral. El tratamiento con hidrogel solo mostró mejor resultado de la tinción de Safranin O (Producción de PG) comparado a su correspondiente contralateral. Contrariamente, la adición de MSCs no mejoró la tinción de PG ($p=0.49$). Cada flecha muestra el control comparado a su tratamiento contralateral.

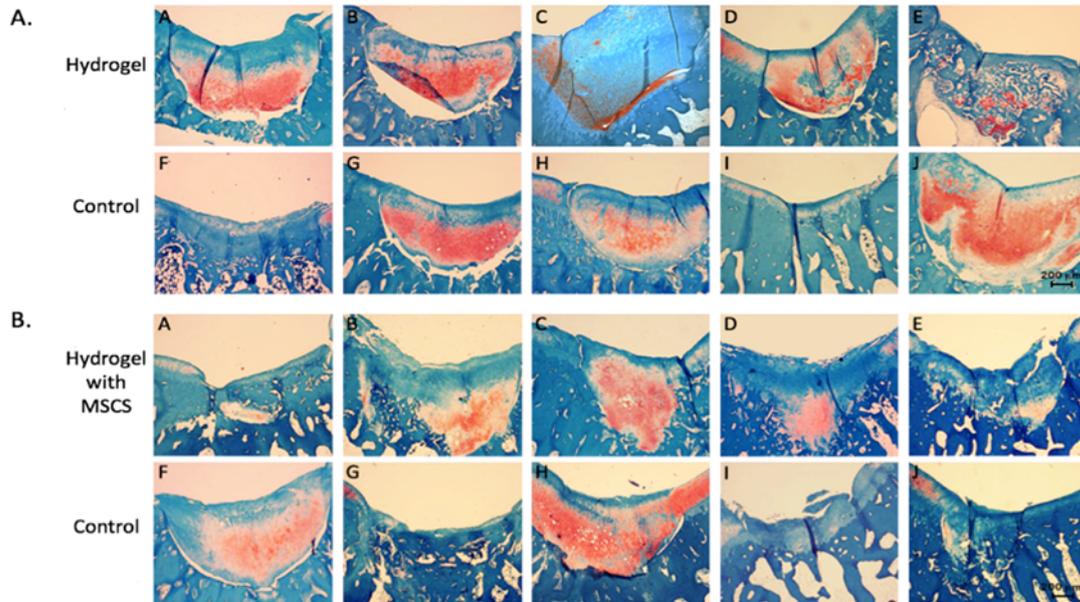


Figura 9: Tinción con Safranina O del grupo hydrogel solo: Grupo (A) y del grupo B: hidrogel + MSCs, con sus correspondientes controles contralaterales. La magnificación original 4x y la escala están representadas sobre las figuras. A) A, 48.6%; B, 54.7%; C, 34.7%; D, 80%; E, 28.9%; F, 11.4%; G, 53.7%; H, 48.7%; I, 11.8% y J, 68.3%. C, pertenece al conejo que experimentó la subluxación patelar. B) A, 17%; B, 24.4%; C, 54.1%; D, 20.4%; E, 12.9%; F, 55.9%; G, 11.9%; H, 72.5%; I, 16.3% y J, 18.6%. Nota: MSCs, células troncales mesenquimales.

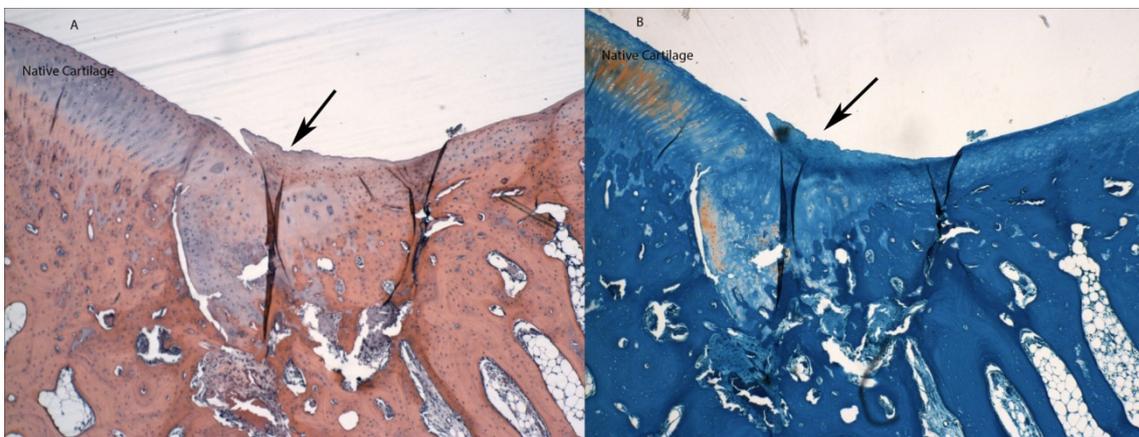


Figura 10: Histología de: A) Grupo control: La flecha muestra el defecto de cartilago con el fibrocartilago de reparación. B) Con tinción de Safranina-O se observa una ausencia de coloración naranja, sugiriendo la presencia de tejido fibroso.

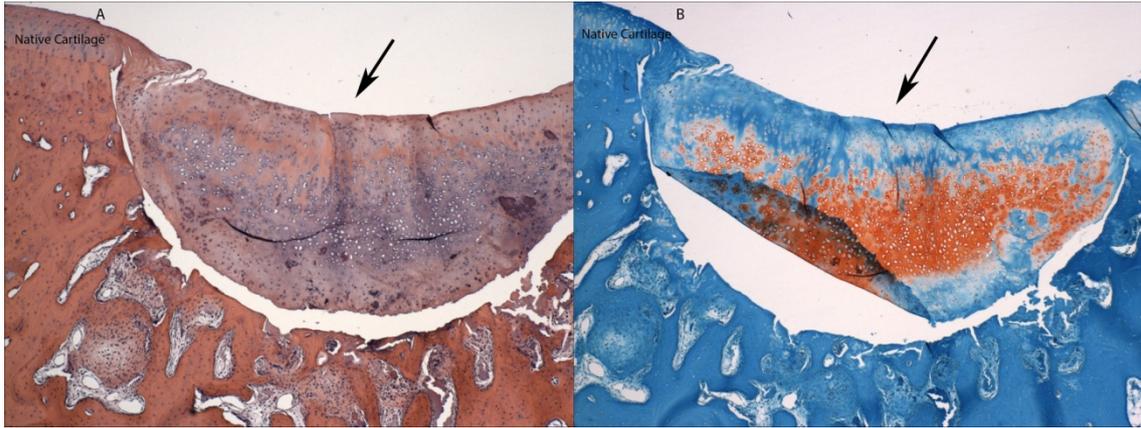


Figura 11: Histología del grupo hidrogel solo: A) H&E: Se observa la presencia de tejido reparado. B) La tinción positiva con Safranina-O sugiere la presencia de PG en el tejido reparado.

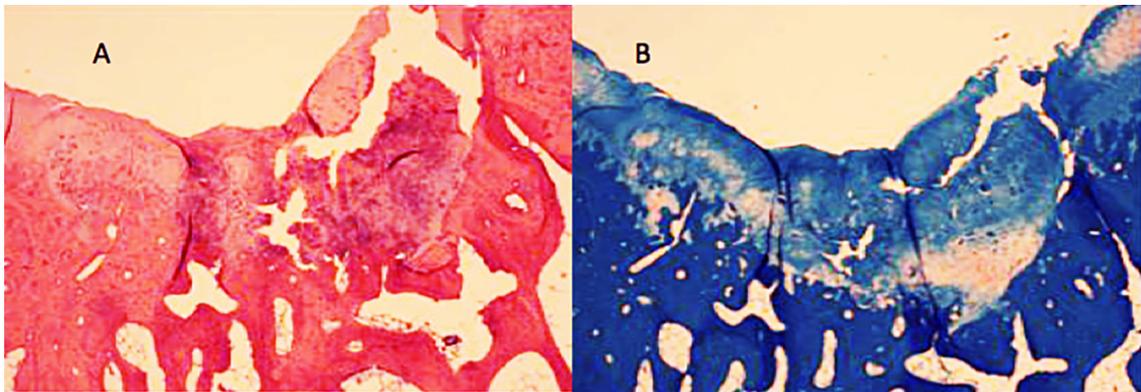


Figura 12: Histología del grupo de hidrogel con MSCs. A) H&E: se observa la presencia de fibrocartilago de reparación. B) No se observa tinción positiva con Safranina O.

La expresión de colágeno II, evaluada cualitativamente por inmunofluorescencia, mostró que el rango de expresión observado en los diferentes grupos fue variable (**Figura 12**). El colágeno II fue observado tanto en todos los grupos tratados como en los controles. La prevalencia del colágeno II en los grupos tratados y controles se mostró altamente variable de animal a animal. Se encontró colágeno a lo largo de la superficie del tejido reparado en la mayoría de los controles. En el grupo hidrogel, comparado a los controles, la presencia de colágeno II fue similar, o incluso mejor en tres casos. Un rango de expresión de colágeno II fue también hallado en aquellos tratados con hidrogel + MSCs. Cuando se comparaban a sus controles, solo dos mostraron expresión superior de colágeno II.

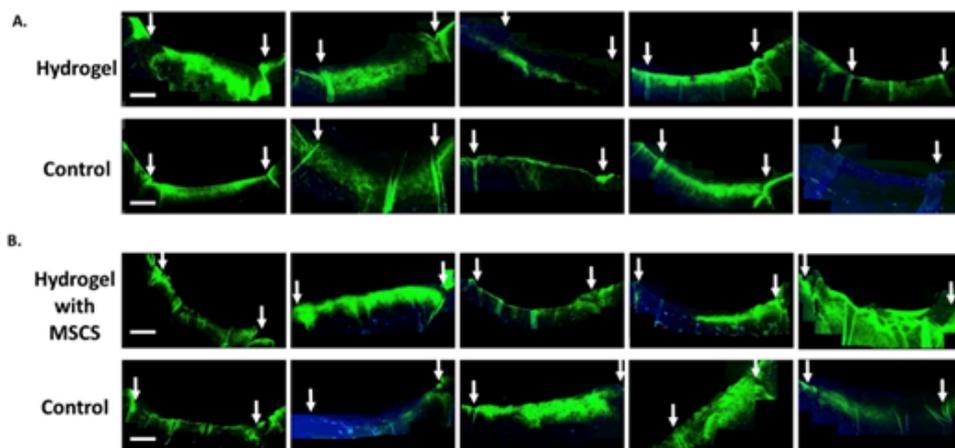


Figura 12: Imágenes de inmunofluorescencia para Colágeno II (verde) en defectos condrales indicados entre flechas blancas. A) Grupo tratado con hidrogel, y B) grupo tratado con hidrogel y MSCs, y sus correspondientes controles. Los núcleos están contrateñidos con DAPI (azul). Barra de escala= 500 μ m.

3.3. Resultados de ensayo clínico en pacientes

3.3.1. Resultados primarios

Sobre la base de la definición de resultado exitoso del estudio, el grupo CAP mostró un resultado exitoso significativamente superior comparado con el grupo BIO ($P < .001$). La tasa de resultado exitoso total para el grupo CAP fue 75% ($n = 24$ de 32), comparado con el 53% ($n = 16$ de 30) en el grupo BIO, en el cual el 47% (14 de 30) no alcanzó los criterios predefinidos de resultado exitoso: 3 pacientes sufrieron una revisión de la microfractura con un injerto osteocondral; 1 paciente fue convertido de un aloinjerto osteocondral a una artroplastia unicompartimental; 10 pacientes no mejoraron más de la marca del 20% respecto del dolor o función del score WOMAC.

En el grupo CAP, el 25% (8 de 32) no alcanzaron los criterios de resultado exitoso predefinidos: 1 paciente fue convertido a artroplastis unicompartimental, 1 paciente sufrió debridamiento periprotésico y 6 pacientes no mejoraron más de la marca del 20% respecto del dolor o función del score WOMAC.

3.3.2. Resultados secundarios

Los pacientes en ambos grupos mejoraron significativamente en todos los dominios del score WOMAC cuando se compararon los valores preoperatorios y posoperatorios dentro de cada grupo. En la tabla siguiente (A) corresponde al grupo BIO, de pacientes tratados con procedimientos biológicos y (B) al grupo CAP, de pacientes tratados con botones metálicos focales; WOMAC, Western Ontario and McMaster Osteoarthritis Index. En la tabla, los datos se muestran como media \pm desviación standard, (rango), intervalo de confianza del 95%.

Tabla 3: Womac pre and post operatoria en grupos bio y Cap.

Grupo BIO			
	BIO preoperatorio	BIO posoperatorio	p
Dolor	56.2 \pm 16.3	74.9 \pm 21.0	<.001
Rigidez	57.5 \pm 21.7	72.9 \pm 22.5	.009
Función	59.2 \pm 21.2	79.8 \pm 19.5	<.001
Total	58.5 \pm 19.0	78.2 \pm 19.3	.001
Grupo CAP			
	CAP Preoperatorio	CAP posoperatorio	p
Dolor	40.9 \pm 16.4	86.2 \pm 19.5	<.001
Rigidez	36.8 \pm 23.9	81.5 \pm 25.4	<.001
Función	42.8 \pm 22.9	87.0 \pm 18.0	<.001
Total	41.9 \pm 20.0	86.4 \pm 18.6	<.001

Datos expuestos como como media \pm desviación standard, intervalo de 95% de confianza. test Fisher.

Cuando se comparan los scores para cada dominio del score WOMAC, los pacientes en el grupo CAP tuvieron síntomas significativamente peores (menor score) al punto basal, comparados con

los pacientes en el grupo BIO. Al final del seguimiento, a pesar de que el grupo CAP tuvo mejores scores en todos los dominios, la diferencia entre los 2 grupos fue significativa sólo para el dominio de dolor del score WOMAC ($P = .03$). Los pacientes del grupo BIO sin un procedimiento previo tuvieron una mejoría promedio de 62,7 a 88,1 sobre el total del score WOMAC. Aquellos pacientes que tuvieron una cirugía previa mejoraron el score de 55,1 a 72,2. Los pacientes del grupo CAP sin un procedimiento previo mejoraron su score, en promedio, de 43,6 a 94,7; los pacientes con un procedimiento previo, mejoraron el score de 40,5 a 85,2 sobre el score total de WOMAC (**Figura 13**).

Por otro lado, los scores pre- and posoperatorios del formulario SF-12 dentro de ambos grupos, no mostraron mejorías significativas en el MCS; sin embargo, se encontró una diferencia significativa en el subscore PCS para ambos grupos, lo cual puede observarse en la siguiente tabla. En ella, se incluyen en (A) los datos para los pacientes el grupo BIO, tratados con procedimientos biológicos ($P = .002$) y en (B) los datos de pacientes del grupo CAP ($P < .001$), tratados con botones metálicos focales. En la tabla CI significa intervalo de confianza, MCS, el score de componente mental y PCS el score de componente físico.

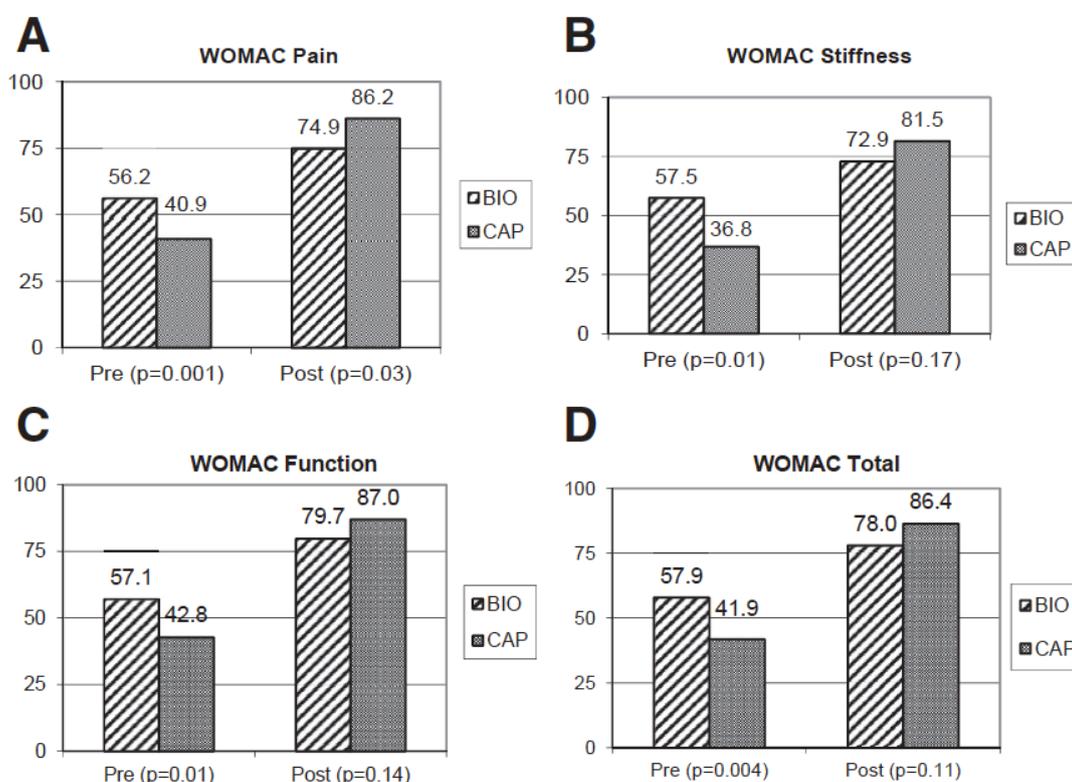


Figura 13: Barras representando los scores WOMAC totales y subscores comparando pacientes con terapias biológicas versus tratamiento de superficie con hemicap.

Cuando se compararon los scores pre y posoperatorios entre los 2 grupos, no se encontraron diferencias significativas en el subscore MCS (pre P = 0,4; pos P = 0,2); sin embargo, hubo una diferencia significativa en ambos scores para el subdominio PCS (pre P = 0,03; post P = 0,006).

3.3.3. Satisfacción de los pacientes

El perfil de satisfacción mostró resultados de muy buenos a excelentes en el grupo CAP, mientras que en el grupo BIO el perfil fue clasificado como bueno a muy bueno. En conjunto, se obtuvieron resultados buenos a excelentes para pacientes para quienes se obtuvieron tasas de resolución de sus síntomas del 66% en el grupo BIO y del 91% en el grupo CAP, buena a excelente satisfacción total en el 80% de los pacientes en el grupo BIO y 91% de los pacientes del grupo CAP, y buena a excelente satisfacción de los cirujanos fue obtenida en el 89% para el grupo BIO y 97% en el grupo CAP. Cuando estos resultados fueron comparados, el grupo CAP mostró resultados estadísticamente mejores para cada pregunta (P < .001).

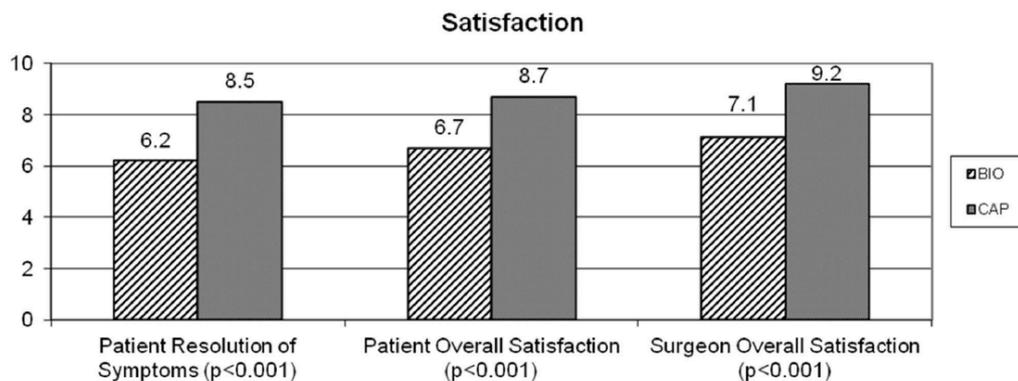


Figura 13: Barras comparando la satisfacción de pacientes tratados con terapias regenerativas versus hemicap en los dominios: resolución de síntomas, satisfacción del paciente, satisfacción del cirujano

3.3.4. Seguridad

3.3.4.1. Grupo BIO

De los 30 pacientes incluidos en este estudio en el grupo BIO, 16 (53.3%) mostraron un evento adverso, en todos los cuales se observó dolor persistente en la rodilla después del procedimiento inicial. Diez de los pacientes mostraron más de un evento adverso, que requirió múltiples tratamientos, que incluyeron manejos no operatorios como inyecciones de corticoides intra-articulares, medicación analgésica, bloqueo del nervio femoral y terapia física, así como también intervenciones quirúrgicas secundarias, tales como aloinjerto osteocondral y artroscopia diagnóstica. Un paciente tuvo un espasmo muscular reactivo tratado con medicación para el dolor. Un paciente presentó una tromboflebitis postoperatoria que no requirió anticoagulación.

3.3.4.1 Grupo CAP

De los 32 pacientes del grupo CAP, 21 (66%) sufrieron un evento adverso relacionado a la rodilla tratada. Seis pacientes evidenciaron más de un evento adverso. Sólo 3 de los 25 eventos fueron considerados posiblemente relacionados al dispositivo implantado: un drenaje del sitio de acceso se resolvió con medicación, uno se resolvió sin tratamiento, y un evento con dolor de la rodilla se resolvió con fisioterapia.

3.3.5. Procedimientos subsiguientes y efectividad

En total, 4 pacientes (13.3%) en el estudio BIO requirieron un procedimiento subsiguiente sobre el índice de la lesión y por ello fueron considerados como falla. De ellos, uno fue convertido a reemplazo de rodilla unicondilar y tres recibieron un aloinjerto osteocondral. La razón de todos los procedimientos subsiguientes fue dolor persistente de la rodilla.

En el grupo CAP, un paciente continuó con dolor de rodilla serio, lo cual condujo a la remoción del implante y conversión a UKR a los 6 meses después, y fue considerado falla del tratamiento. El paciente alcanzó el punto final en el estudio y no fueron colectados más datos a partir de ese

momento. Otro paciente fue sometido a debridamiento artroscópico anterior al implante y fue considerado falla del tratamiento debido a ser un procedimiento secundario relacionado al defecto.

4. DISCUSIÓN

La artritis de la articulación de la rodilla es una condición musculoesquelética debilitante y progresiva muy frecuente en la sociedad moderna. Si bien hay muchos factores que causan la degeneración artrítica de la rodilla, todos los defectos articulares focales y/o de espesor total del cóndilo femoral suelen provocar dolores intensos y persistentes y el deterioro funcional (**Pascual-Garrido C et al, 2017**). Cuanto mayor es la edad de los pacientes, mayor es la tendencia a sufrir lesiones condrales más extensas y signos tempranos de osteoartritis, conduciendo en general a la necesidad de indicar la artroplastia. Aún con defectos de tamaño limitado, los síntomas que presentan los pacientes son similares o coinciden con los de pacientes que necesitan ser sometidos a artroplastia. Las lesiones condrales focales son de alta prevalencia en la población adulta joven. Si estas lesiones se dejan sin tratar, en gran proporción progresarán a osteoartritis.

Tratamientos para la Reparacion Articular:

Los reemplazos parciales (reemplazo de la porción dañada de la rodilla, conservando las zonas no dañadas y los ligamentos) y totales de rodilla son los principales enfoques hoy en día para el tratamiento de estos pacientes (**Curl W et al, 1997; Widuchowski W et al, 2007**). Los tratamientos biológicos para lesiones condrales como debridamiento, abrasión, microfractura, auto- o aloinjerto osteocondral, y otras estrategias basadas en el uso de células han mostrado buenos resultados en pacientes jóvenes. Para pacientes de mayor edad los tratamientos biológicos tienen resultados menos satisfactorios, con recurrencia de los síntomas y en muchos casos poco alivio del dolor y deficiente mejoría funcional. Considerando los defectos focales contenidos, con tejido sano adyacente, los procedimientos tradicionales de artroplastia no son los más adecuados para su tratamiento, dado que el riesgo de cirugías de revisión es alto en dichos pacientes.

En esta población, el uso de terapéuticas como el uso de botones focales con preservación del tejido sano circundante, puede ser una opción de tratamiento adecuado, antes de considerar el reemplazo total de rodilla (**Pascual Garrido C et al, 2017**). Se ha mostrado en este trabajo que el uso de botones metálicos focales para tratamiento de lesiones condrales de cóndilo femoral resultó en resultados clínicos similares y aún superiores, cuando se compara con procedimientos biológicos como microfracture, trasplante osteocondral autólogo, debridamiento, implante de condrocitos autólogos o aloinjerto osteocondral, con mejores resultados clínicos y menor requerimiento de procedimientos subsiguientes.

El manejo de defectos articulares focales del cóndilo femoral de espesor total requiere un enfoque terapéutico altamente personalizado al perfil de cada paciente. La decisión quirúrgica puede variar de paciente a paciente a través del análisis de edad, tipo de defecto, historia quirúrgica, tamaño de lesión, superficie articular opuesta, función meniscal, alineamiento mecánico, inestabilidad de ligamentos, índice de masa corporal y expectativas de recuperación. Bedi y colaboradores han mostrado una revisión basada en la evidencia de diferentes métodos de tratamiento de defectos condrales de rodilla. Los autores han concluido que las técnicas de estimulación de la médula ósea y el trasplante de auto y aloinjertos proveen resultados favorables, aunque no carecen de complicaciones y desventajas (**Bedi A et al, 2010**).

La microfractura es la técnica más frecuentemente usada de estimulación de médula ósea. Steadman y colaboradores realizaron un seguimiento de largo plazo (11 años) de pacientes menores de 45 años con una mejoría significativa luego del procedimiento, aunque sólo el 32% estuvieron libres de dolor (**Steadman J et al, 2003**). El implante osteocondral alogénico es considerado un tratamiento de segunda línea para restauración de cartílago. Si bien el seguimiento clínico de estos pacientes mostró un score menor que el de microfractura, el implante osteocondral reflejó un mejoramiento funcional superior (**Gill T, 2000**).

Ingeniería de Tejidos

Existe una gran cantidad de literatura relacionada con la aplicación de técnicas de ingeniería de tejidos para tratamiento de cartílago articular en modelos animales. Sin embargo, surge del análisis de esa bibliografía que un gran porcentaje de esos nuevos enfoques, exitosos en dichos modelos animales, producen resultados menos satisfactorios cuando son llevados a ensayos clínicos (Hay M et al, 2014). Por lo tanto, es necesario un meticuloso análisis que permita guiar el desarrollo de nuevos desarrollos biomiméticos y bioactivos que conduzcan a aplicaciones clínicas más apropiadas y exitosas.

El objetivo de esta tesis fue ensayar una terapéutica desarrollada combinando células MSC's encapsuladas en hidrogeles de PEG, con ChS incorporado como clave biológica, en comparación con el mismo sistema sin células. Esta terapéutica se encuadra dentro de los enfoques biológicos o terapias regenerativas. En pacientes jóvenes, con alineación normal y sin historia quirúrgica se plantean este tipo de tratamientos biológicos inicialmente, en particular cuando pueden completarse las terapias de rehabilitación. El mismo paciente, con historia quirúrgica extensa de debridamiento, microfractura, ACI o aloinjerto, implica mayores desafíos cuando vuelve a tener síntomas o los procedimientos nos proveen adecuado alivio del dolor y/o mejoramiento

funcional. En estos casos, la artroplastia convencional no es lo más indicado, dado que se trata de un paciente joven y con una patología continua pero aislada (Chahla J et, 2016).

En este camino, pueden mencionarse las terapéuticas biológicas y los botones metálicos focales, que están enfocados en la búsqueda de nuevos paradigmas de tratamientos limitados al área del defecto, preservando el hueso, las superficies sanas del cartílago y tejidos blandos, con el objeto último de evitar en el largo plazo el manejo de la artrosis y artritis de rodilla. En este sentido, esta tesis estuvo orientada a la búsqueda de un nuevo tratamiento utilizando células troncales mesenquimales obtenidas de la fracción nucleada de la médula ósea, encapsuladas en un novedoso material, como es el hidrogel inyectable capaz de polimerizar sus precursores in vivo, mejorando la adhesión y permitiendo un mejor ajuste entre el hidrogel y el tejido nativo a su alrededor.

Recordemos que los hidrogeles, son polímeros entrecruzados (*crosslinked*) insolubles, que se hinchan en ambientes acuosos. El alto contenido de agua puede ser modificable, siendo factible alcanzar valores similares al cartílago nativo (alrededor de 80% de agua y aún superiores). Esto facilita el rápido intercambio de nutrientes y metabolitos desde y hacia las células embebidas en el hidrogel (Nicodemus G et al, 2008). Los hidrogeles pueden ser clasificados en dos grandes grupos: polímeros naturales o sintéticos, o una combinación de ambos; degradables y no degradables. Se incluyen dentro de los polímeros naturales los basados en polisacáridos (alginato, quitosán, celulosa, amilosa, dextran, glicosaminoglicanos, agarosa, quitina), proteínas (colágeno, gelatina, fibrina, elastina, seda, actina, miosina, soya), o proteonucleótidos RNA, DNA). Se caracterizan por su biocompatibilidad y en algunos casos su similaridad bioquímica con el cartílago nativo y la factibilidad de ser degradados por enzimas secretadas por las células. Los degradables por enzimas incluyen glicosaminoglicanos, colágeno, quitosán, gelatina, fibrina, elastina, actina, miosina, RNA y DNA, mientras que los no degradables incluyen alginato, celulosa, amilosa, dextran, agarosa, quitina, seda y soya. Por otro lado, favorece a los polímeros sintéticos la posibilidad de cambios en su fabricación, permitiendo lograr mayor control sobre sus propiedades macroscópicas y comportamiento en la degradación. Algunos ejemplos de polímeros sintéticos que han sido usados en ingeniería de tejidos de cartílago incluyen, entre otros, poli(etileno glicol) (PEG), poli(vinil alcohol) (PVA), poli(ácido láctico) (PLA) y polidioxanona (PDS). Los hidrogeles obtenidos a partir de polímeros sintéticos son diseñados para que tengan propiedades mecánicas similares (módulo compresivo) y comportamiento friccional al cartílago articular.

En esta tesis, se utilizó uno de los polímeros sintéticos mencionados, el Poli(etilene glicol) (PEG) que se conjugó con aminas terminales, para obtener Poli(etilene glicol) (PEG) norbornene (8 brazos, 10kDa). Por otro lado, la combinación de polímeros naturales y sintéticos ha surgido como un primario enfoque para crear hidrogeles biomiméticos, combinando el potencial condrogénico ajustable de ambos componentes. Estos hidrogeles biomiméticos pueden ser diseñados para imitar aspectos clave del ambiente nativo, al mismo tiempo que se pueden ajustar en forma precisa las propiedades mecánicas y químicas del hidrogel (**Bryant S et al, 2004**).

Otra propiedad muy importante que debe ser tomada en cuenta, es la degradación del hidrogel, lo cual es crítico para el proceso de síntesis de la ECM durante el crecimiento del cartílago. Esta degradación puede ocurrir a través de dos mecanismos predominantes: may occur through two predominant mechanisms: una degradación masiva, por ejemplo una hidrólisis, lo cual redundaría en una degradación uniforme del “crosslink”, y/o una degradación local, por ejemplo, mediante enzimas. Los polímeros sintéticos pueden diseñarse para que se degraden de una u otra forma (**Jeuken R et al, 2016**). Un hidrogel ideal debería soportar las cargas de la articulación, degradarse gradualmente y transferir el estímulo de la carga articular al tejido de neoformación. Por eso, es muy importante ajustar la degradación del hidrogel con dicho nuevo tejido. La tasa de degradación depende del grado de entrecruzamiento (cuanto mayor es el entrecruzamiento más lenta es la degradación) y de la elección del linker degradable, el cual influye en la cinética de degradación y el coeficiente de difusión del soluto (**Hadjiev N et al, 2015**). El desafío es que se requiere una alta densidad de entrecruzamiento para soportar la carga articular, pero con baja tasa de degradación, y que esto afecte negativamente la difusión de moléculas grandes, incluyendo factores de crecimiento y moléculas de la matriz extracelular recientemente formadas. Es de destacar que, en el cartílago, dichas moléculas, específicamente agregano y colágeno, son demasiado grandes como para ser transportadas a través del hidrogel entrecruzado, y como resultado, la degradación debe ocurrir antes de que el tejido macroscópico se forme (**Nicodemus G et al, 2011**). Mediante un ajuste cuidadoso de la formulación y propiedades iniciales del hidrogel es posible lograr la regulación de la degradación y el crecimiento del nuevo tejido. Clínicamente, la mayoría de las lesiones de cartílago sintomáticas son osteocondrales, e involucran tanto el cartílago como las capas superiores del hueso. Para superar estas complejas situaciones han sido creados hidrogeles multi-capas. Los hidrogeles bicapa son los enfoques más simples, en los cuales las dos capas tienen la misma estructura química, y varían propiedades como estructura del poro y/o claves bioquímicas o incorporación de factores de crecimiento (**Steinmetz N et al, 2015**). Para ello, se utilizó Poli(etilene glicol) (PEG) norbornene (8 brazos, 10kDa) fabricado a partir de PEG conjugándolo con aminas terminales. Por otro lado, se sintetizó condroitín sulfato. Ambas

soluciones precursoras fueron tratadas con un cross-linker (CVPLgSLYSGC), obteniéndose el hidrogel por polimerización producida por fotoiniciación.

Otro gran desafío para el desarrollo de sustitutos de cartílago es el diseño de scaffolds con propiedades mecánicas adecuadas como para restaurar la función condrogénica inicial, mientras simultáneamente se controlan los cambios temporales en la estructura del gel para facilitar la formación de un tejido. La incorporación de células en un hidrogel es uno de los procesos más críticos para lograr la regeneración. Las células pueden infiltrar el “scaffold” o pueden agregarse exógenamente sobre el mismo (Steinmetz N et al, 2015). Una fuente potencial de células son las células troncales mesenquimales (MSC) dada su potencialidad para ser diferenciadas hacia linajes condrogénico u osteogénico, e inoculadas en cada lámina específica con el objeto de reproducir más adecuadamente el cartílago articular y el hueso subcondral. Las células endógenas pueden migrar en hidrogeles que tengan factores quimiotácticos capaces de promover la migración desde la médula ósea y tejido sinovial, lo cual está facilitado por la expresión en las células de esos tejidos de múltiples receptores de citoquinas como CXCR1, CXCR2, CXCR4, and CCR2. (Ringe J et al, 2007). Ha sido demostrada la capacidad de embeber células y factores de crecimiento en hidrogeles sintéticos “photocrosslinked” basados en PEG (Bryant S et al, 2004). Estos autores encapsularon condrocitos en estos geles, observando la producción de un tejido cartilaginoso rico en glicosaminoglicanos y colágeno, lo cual fue observado mediante métodos bioquímicos e histológicos. La incorporación de células en hidrogeles puede ser realizada por diversos métodos. Uno de ellos es la siembra de las células sobre estructuras porosas prefabricadas, o bien que las células sean incorporadas durante la formación de dicha estructura (Pascual Garrido C et al, 2017 b).

Se han sido investigado varios tipos celulares para la reparación del cartílago. Entre ellos los condrocitos, las MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo, y las células pluripotentes inducidas. En general, la mayoría de los problemas asociados al uso de células está relacionada a la dificultad para mantener el fenotipo condrogénico de las células que se utilizan. En este sentido, los hidrogeles han sido diseñados para mantener esa propiedad fundamental, cual es el fenotipo condrogénico. Así, por ejemplo, Buschmann y colaboradores et al (Hoemann C et al, 2005) estudiaron un hidrogel basado en quitosan gelificado que no sólo se adhería al área afectada, sino que también retenía el fenotipo y el potencial condrogénico. Mientras que Schneider y colaboradores probaron que condrocitos bovinos encapsulados en un hidrogel fotopolimerizable de PEG mantenían su fenotipo y sintetizaban un amplio repertorio de proteínas específicas de ECM de cartílago (colágenos II, VI, IX, XI, agregano y biglican), la cual se incrementa con el

tiempo. Más aún, los condrocitos embebidos en hidrogeles 3D cargados con ChS y PEG, se comportaban en forma diferente si la carga era dinámica o no. Sin carga la proliferación celular y la síntesis de proteoglicanos se veían muy reducidas, mientras que el colágeno no se vio afectado.

En esta tesis, se desarrolló el método de obtención de las células mesenquimales para ser luego amplificadas y encapsuladas en el hidrogel, evaluándose el módulo compresivo de los hidrogeles a distintos tiempos, desde el día 1 hasta la semana 9. Los hidrogeles fueron comprimidos a una tensión del 15%, a una velocidad de deformación de 0,1mm/min para obtener las curvas de deformación (MTS Synergie 100, 10N). El módulo compresivo fue determinado por la pendiente tangencial a la región lineal de la curva, entre el 10 y 15% de tensión. El valor del módulo compresivo hallado fue 65kPa en el día 1, y descendió hasta aproximadamente un 30% después de 3 semanas, 15% después de 6 semanas y se mantuvo estable hasta las 9 semanas ($p < 0.01$). Esta caída del módulo desde la encapsulación hasta las 6 semanas representa la degradación enzimática de la MMP2 por las células encapsuladas. Sin embargo, la similaridad en el valor del módulo compresivo desde la semana 6 a la 9 puede deberse a la capacidad de las células de sintetizar su propia matriz extracelular, simultáneamente con la degradación del hidrogel, manteniendo estable la integridad del tejido generado (Figura 1 A).

Además, se evaluó la capacidad condrogénica de las MSC's in vitro, de células MSCs solas, células MSCs con hidrogel ChS/PEG, y el hidrogel ChS/PEG solo. Dicha evaluación se realizó mediante qPCR e inmunohistoquímica para colágeno II, sox9 y agrecano, como marcadores de condrogénesis, y colágeno X y RunX2 como marcadores de hipertrofia. Después de 6 y 9 semanas de cultivo, se observó la diferenciación condrogénica de las MSCs encapsuladas, mediante la presencia de elevados niveles de los marcadores de condrogénesis Sox9, agrecano y colágeno II. También fueron altos los marcadores de hipertrofia Runx2 y colágeno X a las 9 semanas, aunque la expresión del gen de colágeno II fue significativamente superior que la del colágeno X ($p < 0.01$) (Figura 1 B). A nivel de proteínas, después de la semana 3, las MSCs encapsuladas expresaron colágeno II, y a la semana 9 la producción de colágeno II fue prevalente en el hidrogel. La tinción positiva para Safranina-O indican la presencia de GAGs a las 9 semanas (Figura 1 C). La tinción positiva en los tiempos más tempranos era esperable debido a la incorporación de ChS en la formulación del hidrogel. Sin embargo, en la semana 9 se mantuvo la tinción positiva, a pesar de la degradación del hidrogel, debido a la síntesis de GAGs. Se observó una degradación significativa del hidrogel sintético a lo largo del periodo de estudio de las 9 semanas indicando que las MSCs encapsuladas pueden degradar el péptido crosslinker sensible a MMP2.

Comparando las tinciones de colágeno II y PEG, se observa que la producción de la proteína Colágeno II fue proporcional a la reducción de la tinción positiva para PEG, y que en la semana 9 hubo una significativa predominancia de colágeno II sobre PEG. Estos resultados coinciden con los datos del módulo compresivo, indicando que la ECM producida por las MSCs encapsuladas mantenía la integridad del tejido, a medida que el hidrogel se degradaba.

Otro proceso crítico para llegar a la cicatrización del cartílago es obtener una integración óptima entre los hidrogeles y el tejido circundante, para lo cual es imprescindible que los hidrogeles se adhieran a la superficie articular adyacente como también al hueso subcondral. Si esta integración no es la adecuada, el hidrogel implantado se perderá o se fracturará como consecuencia del movimiento diario de la articulación. La integración o adhesión a un cartílago hospedador puede formarse entre las moléculas del tejido entrecruzado en el cartílago y las cadenas de polímeros, o por la formación de enlaces químicos con el cartílago local durante la gelificación *in situ*. Dependiendo de la química de los monómeros que forman el hidrogel, pueden ocurrir reacciones no específicas entre los monómeros en polimerización y las moléculas de tejidos (**Nuttelman C et al, 2008**).

El sistema de hidrogeles basado en PEG crosslinked en el cual se incluyen análogos de matriz extracelular como condroitín sulfato (ChS) y el tripéptido RGD, con el objeto de crear un hidrogel biomimético (**Liu S et al, 2010**) se muestra como promisorio. El condroitín sulfato es el principal glicosaminoglicano en el cartílago, que crea un ambiente hiperosmótico particular, y promueve la síntesis de tejido, especialmente bajo compresión dinámica (**Bilic J et al, 2012**).

El sistema ha sido desarrollado para ser fotopolimerizable en virtud de lo cual los diferentes componentes (PEG, ChS, y RGD) son modificados con grupos que pueden entrecruzarse, y luego de la exposición a la luz reaccionan para formar una red de polímero entrecruzado. Además, este polímero permite a las células ser encapsuladas durante el proceso de formación del hidrogel, con lo cual la combinación final se forma *in situ* dentro del defecto en el cuerpo. Las ventajas de este hidrogel fotopolimerizable incluyen el control espacial y temporal durante la formación del hidrogel, la capacidad de polimerizar a temperatura y pH fisiológicos, y la polimerización rápida, en segundos o minutos. Además, este hidrogel puede ser expandido mediante la creación de constructos multicapa inyectables por fotopolimerización secuencial de láminas *in situ*. Por lo tanto diferentes secciones del cartilago articular pueden ser reproducidos.

Otro gran desafío para el desarrollo de sustitutos de cartílago es el diseño de scaffolds con propiedades mecánicas adecuadas como para restaurar la función condrogénica inicial, mientras simultáneamente se controlan los cambios temporales en la estructura del gel para facilitar la formación de un tejido. La incorporación de células en un hidrogel es uno de los procesos más críticos para lograr la regeneración. Las células pueden infiltrar el “scaffold” o pueden agregarse exógenamente sobre el mismo (**Steinmetz N et al, 2015**). Una fuente potencial de células son las células troncales mesenquimales (MSC) dada su potencialidad para ser diferenciadas hacia linajes condrogénico u osteogénico, e inoculadas en cada lámina específica con el objeto de reproducir más adecuadamente el cartílago articular y el hueso subcondral. Las células endógenas pueden migrar en hidrogeles que tengan factores quimiotácticos capaces de promover la migración desde la médula ósea y tejido sinovial, lo cual está facilitado por la expresión en las células de esos tejidos de múltiples receptores de citoquinas como CXCR1, CXCR2, CXCR4, and CCR2. (**Ringe J et al, 2007**).

Se ha demostrado la capacidad de embeber células y factores de crecimiento en hidrogeles sintéticos “photocrosslinked” basados en PEG (**Bryant S et al, 2004**). Estos autores encapsularon condrocitos en estos geles, observando la producción de un tejido cartilaginoso rico en glicosaminoglicanos y colágeno, lo cual fue observado mediante métodos bioquímicos e histológicos.

La incorporación de células en hidrogeles puede ser realizada por diversos métodos. Uno de ellos es la siembra de las células sobre estructuras porosas prefabricadas, o bien que las células sean incorporadas durante la formación de dicha estructura (**Pascual Garrido C et al, 2017 b**). Se han investigado varios tipos celulares para la reparación del cartílago. Entre ellos los condrocitos, las MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo, y las células pluripotentes inducidas. En general, la mayoría de los problemas asociados al uso de células está relacionada a la dificultad para mantener el fenotipo condrogénico de las células que se utilizan. En este sentido, los hidrogeles han sido diseñados para mantener esa propiedad fundamental, cual es el fenotipo condrogénico. Así, por ejemplo, Buschmann y colaboradores et al (**Hoemann C et al, 2005**) estudiaron un hidrogel basado en quitosan gelificado que no sólo se adhería al área afectada, sino que también retenía el fenotipo y el potencial condrogénico. Mientras que Schneider y colaboradores probaron que condrocitos bovinos encapsulados en un hidrogel fotopolimerizable de PEG mantenían su fenotipo y sintetizaban un amplio repertorio de proteínas específicas de ECM de cartílago (colágenos II, VI, IX, XI, agregano y biglican), la cual se incrementa con el tiempo. Más aún, los condrocitos embebidos en hidrogeles 3D cargados con ChS y PEG, se

comportaban en forma diferente si la carga era dinámica o no. Sin carga la proliferación celular y la síntesis de proteoglicanos se veían muy reducidas, mientras que el colágeno no se vio afectado.

En esta tesis, se desarrolló el método de obtención de las células mesenquimales para ser luego amplificadas y encapsuladas en el hidrogel, evaluándose el módulo compresivo de los hidrogeles a distintos tiempos, desde el día 1 hasta la semana 9. Los hidrogeles fueron comprimidos a una tensión del 15%, a una velocidad de deformación de 0,1mm/min para obtener las curvas de deformación (MTS Synergie 100, 10N). El módulo compresivo fue determinado por la pendiente tangencial a la región lineal de la curva, entre el 10 y 15% de tensión. El valor del módulo compresivo hallado fue 65kPa en el día 1, y descendió hasta aproximadamente un 30% después de 3 semanas, 15% después de 6 semanas y se mantuvo estable hasta las 9 semanas ($p < 0.01$). Esta caída del módulo desde la encapsulación hasta las 6 semanas representa la degradación enzimática de la MMP2 por las células encapsuladas. Sin embargo, la similaridad en el valor del módulo compresivo desde la semana 6 a la 9 puede deberse a la capacidad de las células de sintetizar su propia matriz extracelular, simultáneamente con la degradación del hidrogel, manteniendo estable la integridad del tejido generado (Figura 1 A).

Además, se evaluó la capacidad condrogénica de las MSC's in vitro, de células MSCs solas, células MSCs con hidrogel ChS/PEG, y el hidrogel ChS/PEG solo. Dicha evaluación se realizó mediante qPCR e inmunohistoquímica para colágeno II, sox9 y agrecano, como marcadores de condrogénesis, y colágeno X y RunX2 como marcadores de hipertrofia. Después de 6 y 9 semanas de cultivo, se observó la diferenciación condrogénica de las MSCs encapsuladas, mediante la presencia de elevados niveles de los marcadores de condrogénesis Sox9, agrecano y colágeno II. También fueron altos los marcadores de hipertrofia Runx2 y colágeno X a las 9 semanas, aunque la expresión del gen de colágeno II fue significativamente superior que la del colágeno X ($p < 0.01$) (Figura 1 B). A nivel de proteínas, después de la semana 3, las MSCs encapsuladas expresaron colágeno II, y a la semana 9 la producción de colágeno II fue prevalente en el hidrogel. La tinción positiva para Safranina-O indican la presencia de GAGs a las 9 semanas (Figura 1 C). La tinción positiva en los tiempos más tempranos era esperable debido a la incorporación de ChS en la formulación del hidrogel. Sin embargo, en la semana 9 se mantuvo la tinción positiva, a pesar de la degradación del hidrogel, debido a la síntesis de GAGs. Se observó una degradación significativa del hidrogel sintético a lo largo del periodo de estudio de las 9 semanas indicando que las MSCs encapsuladas pueden degradar el péptido crosslinker sensible a MMP2. Comparando las tinciones de colágeno II y PEG, se observa que la producción de la proteína

Colágeno II fue proporcional a la reducción de la tinción positiva para PEG, y que en la semana 9 hubo una significativa predominancia de colágeno II sobre PEG. Estos resultados coinciden con los datos del módulo compresivo, indicando que la ECM producida por las MSCs encapsuladas mantenía la integridad del tejido, a medida que el hidrogel se degradaba.

Otro proceso crítico para llegar a la cicatrización del cartílago es obtener una integración óptima entre los hidrogeles y el tejido circundante, para lo cual es imprescindible que los hidrogeles se adhieran a la superficie articular adyacente como también al hueso subcondral. Si esta integración no es la adecuada, el hidrogel implantado se perderá o se fracturará como consecuencia del movimiento diario de la articulación. La integración o adhesión a un cartílago hospedador puede formarse entre las moléculas del tejido entrecruzado en el cartílago y las cadenas de polímeros, o por la formación de enlaces químicos con el cartílago local durante la gelificación in situ. Dependiendo de la química de los monómeros que forman el hidrogel, pueden ocurrir reacciones no específicas entre los monómeros en polimerización y las moléculas de tejidos (**Nuttelman C et al, 2008**).

El sistema de hidrogeles basado en PEG crosslinked en el cual se incluyen análogos de matriz extracelular como condroitín sulfato (ChS) y el tripéptido RGD, con el objeto de crear un hidrogel biomimético (**Liu S et al, 2010**) se muestra como promisorio. El condroitín sulfato es el principal glicosaminoglicano en el cartílago, que crea un ambiente hiperosmótico particular, y promueve la síntesis de tejido, especialmente bajo compresión dinámica (**Bilic J et al, 2012**). El sistema ha sido desarrollado para ser fotopolimerizable en virtud de lo cual los diferentes componentes (PEG, ChS, y RGD) son modificados con grupos que pueden entrecruzarse, y luego de la exposición a la luz reaccionan para formar una red de polímero entrecruzado. Además, este polímero permite a las células ser encapsuladas durante el proceso de formación del hidrogel, con lo cual la combinación final se forma in situ dentro del defecto en el cuerpo. Las ventajas de este hidrogel fotopolimerizable incluyen el control espacial y temporal durante la formación del hidrogel, la capacidad de polimerizar a temperatura y pH fisiológicos, y la polimerización rápida, en segundos o minutos. Además, este hidrogel puede ser expandido mediante la creación de constructos multicapa inyectables por fotopolimerización secuencial de láminas in situ. Por lo tanto diferentes secciones del cartilago articular pueden ser reproducidos.

5. BIBLIOGRAFÍA

Aisenbrey E, Bryant S. Mechanical loading inhibits hypertrophy in chondrogenically differentiating hMSCs within a biomimetic hydrogel. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2016; 4: 3562-3574.

Akalp U, Bryant S, Vernerey F. Tuning tissue growth with scaffold degradation in enzyme-sensitive hydrogels: a mathematical model. *Soft Matter*. 2016; 12: 7505-7520.

Akkiraju H, Nohe A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *J Dev Biol*. 2015; 3: 177-192.

Alison M, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol* 2009; 217: 144–160.

Amer L, Holtzinger A, Keller G, Mahoney M, Bryant S. Enzymatically degradable poly (ethylene glycol) hydrogels for the 3D culture and release of human embryonic stem cell derived pancreatic precursor cell aggregates. *Acta Biomater* 2015; 22: 103-110.

Bae D, Yoon K, Song S. Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. *Arthroscopy* 2006; 22:367-374.

Bahney C, Hsu C, Yoo J, West J, Johnstone B. A bioresponsive hydrogel tuned to chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Faseb j*. 2011; 25: 1486-1496.

Bakay A, Csonge L, Papp G, Fekete L. Osteochondral resurfacing of the knee joint with allograft. Clinical analysis of 33 cases. *Int.Orthop*. 1998;22: 277-281.

Barros D, Amaral I, Pego A. Biomimetic synthetic self-assembled hydrogels for cell transplantation. *Curr Top Med Chem*. 2015; 15: 1209-1226.

Bartlett W, Gooding C, Carrington R, Skinner J, Briggs T, Bentley G. (a) Autologous chondrocyte implantation at the knee using a bilayer collagen membrane with bone graft. A preliminary report. *J.Bone Joint Surg.Br*. 2005; 87:330-332.

Bartlett W, Skinner J, Gooding C, Carrington R, Flanagan A, Briggs T, Bentley G. (b) Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J.Bone Joint Surg.Br*. 2005; 87: 640-645.

Bedi A, Feeley B, Williams R. Management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2010; 92: 994-1009.

Bedouet L, Pascale F, Moine L, Wassef M, Ghegediban S, Nguyen V, Bonneau M, Labarre D, Laurent A. Intra-articular fate of degradable poly(ethyleneglycol)-hydrogel microspheres as carriers for sustained drug delivery. *Int J Pharm.* 2013; 456:536-544.

Bedi A, Feeley B, Williams R. Management of articular cartilage defects in the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2010; 92: 994-1009.

Bentley G, Biant L, Carrington R, Akmal M, Goldberg A, Williams A, Skinner J, Pringle J. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 2003; 85:223-230.

Bhatia S, Bell R, Frank R, Rodeo S, Bach B Jr, Cole B, Chubinskaya S, Wang V, Verma N. Bony incorporation of soft tissue anterior cruciate ligament grafts in an animal model: autograft versus allograft with low-dose gamma irradiation. *Am J Sports Med* 2012; 40: 1789-1798.

Bilic J, Izpisua Belmonte J. Concise review: induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart? *Stem Cells.* 2012; 30: 33–41.

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; 331: 889-895.

Browne J, Anderson A, Arciero R, Mandelbaum B, Moseley J Jr, Micheli L, Fu F, Erggelet C. Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation at 5 years in US subjects. *Clin.Orthop.Relat Res.*2005; 436: 237-245.

Bryant S, Anseth K. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res.* 2002; 59: 63-72.

Bryant S, Bender R, Durand K, Anseth K. Encapsulating chondrocytes in degrading PEG hydrogels with high modulus: engineering gel structural changes to facilitate cartilaginous tissue production. *Biotechnol Bioeng* 2004; 86: 747-755.

Bryant S, Arthur J, Anseth K. Incorporation of tissue-specific molecules alters chondrocyte metabolism and gene expression in photocrosslinked hydrogels. *Acta Biomater* 2005; 1: 243-252.

Burnsed O, Schwartz Z, Marchand KO, Hyzy S, Olivares-Navarrete R, Boyan B. Hydrogels derived from cartilage matrices promote induction of human mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation. *Acta Biomater.* 2016; 43: 139-149.

Chahla J, Piuzzi N, Mitchell J, Dean C, Pascual-Garrido C, LaPrade R, Muschler G. Intra-Articular Cellular Therapy for Osteoarthritis and Focal Cartilage Defects of the Knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2016; 98: 1511-1521.

Cherubino P, Grassi F, Bulgheroni P, Ronga P. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane. A preliminary report. *Journal of Orthopaedic Surgery* 2003; 11: 10-15.

Chung C, Beecham M, Mauck RL, Burdick JA. The influence of degradation characteristics of hyaluronic acid hydrogels on in vitro neocartilage formation by mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2009; 30:4287-4296.

Cole B, Pascual-Garrido C, Grumet R. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. *J Bone Joint Surg Am* 2009; 91: 1778-1790.

Corsi K, Schwarz E, Mooney D, Huard J. Regenerative medicine in orthopaedic surgery. *J Orthop Res* 2007; 25: 1261-1268.

Curl W, Krome J, Gordon S, Rushing J, Smith B, Poehling G. Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 1997; 13: 456-460.

Daar A, Greenwood H. A proposed definition of regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2007; 1: 179-184.

Daly AC, Critchley SE, Rencsok EM, Kelly DJ. A comparison of different bioinks for 3D bioprinting of fibrocartilage and hyaline cartilage. *Biofabrication.* 2016; 8:045002.

de Windt T, Vonk L, Slaper-Cortenbach I, Van den Broek M, Nizak R, van Rijen M, de Weger R, Dhert W, Saris D. Allogeneic mesenchymal stem cells stimulate cartilage regeneration and are safe for single-stage cartilage repair in humans upon mixture with recycled autologous chondrons. *Stem Cells* 2016 Aug 10. doi: 10.1002/stem.2475.

Dell'Osso G, Ghilardi M, Bottai V, Bugelli G, Guido G, Giannotti S. Up-to-date Review and Cases Report on Chondral Defects of Knee Treated by ACI Technique: Clinical-instrumental and Histological Results. *Surg Technol Int.* 2015; 26: 317-323.

Dunkin B, Lattermann C. New and Emerging Techniques in Cartilage Repair: MACI. *Oper Tech Sports Med.* 2013; 21: 100-107.

Elisseeff J, Anseth K, Sims D, McIntosh W, Randolph M, Yaremchuk M, Langer R. Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 104: 1014-1022.

Elisseeff J, Puleo C, Yang F, Sharma B. Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. *Orthod Craniofac Res.* 2005; 8: 150-161.

Farnsworth N, Mead B, Antunez L, Palmer A, Bryant S. 2014. Ionic osmolytes and intracellular calcium regulate tissue production in chondrocytes cultured in a 3D charged hydrogel. *Matrix Biol.* 40:17-26.

Fedorovich N, Schuurman W, Wijnberg H, Prins H, van Weeren R, Malda J, Alblas J, Dhert W. Biofabrication of Osteochondral Tissue Equivalents by Printing Topologically Defined, Cell-Laden Hydrogel Scaffolds. *Tissue Engineering* 2012; 18 (Part C): 33-44.

Finn Geneser. 2000. Tejido Esquelético, p. 263-297. In *Editorial Médica Panamericana (ed.), Histología Sobre Bases Biomoleculares.* España.

Fortier L, Potter H, Rickey E, Schnabel L, Foo L, Chong L, et al. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *J Bone Joint Surg Am* 2010; 92: 1927-1937.

Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A, Frolova G. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230-247.

Frisbie D, Trotter G, Powers B, Rodkey W, Steadman J, Howard R, Park R, McIlwraith C. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet.Surg.* 1999; 28:242-255.

Frisbie D, Oxford J, Southwood L, Trotter G, Rodkey W, Steadman J, Goodnight J, McIlwraith C. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin.Orthop.Relat Res.* 2003; 407; 215-227.

Fuss M, Ehlers E, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture

conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Ann.Anat.* 2000; 182:303-310.

Ghazavi M, Pritzker K, Davis A, Gross A. Fresh osteochondral allografts for post-traumatic osteochondral defects of the knee. *J.Bone Joint Surg.Br.* 1997; 79: 1008-1013.

Gigante A, Bevilacqua C, Cappella M, Manzotti S, Greco F. Engineered articular cartilage: influence of the scaffold on cell phenotype and proliferation. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 2003; 14:713-716.

Gigante A, Bevilacqua C, Ricevuto A, Mattioli-Belmonte M, Greco F. Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery. *Knee.Surg.Sports Traumatol.Arthrosc.* 2007; 15: 88-92.

Gikas P, Aston W, Briggs T. Autologous chondrocyte implantation: where do we stand now? *J.Orthop.Sci.* 2008; 13: 283-292.

Gill T. The treatment of articular cartilage defects using microfracture and debridement. *Am J Knee Surg* 2000; 13: 33-40.

Gobbi A, Nunag P, Malinowski K. Treatment of full thickness chondral lesions of the knee with microfracture in a group of athletes. *Knee.Surg.Sports Traumatol.Arthrosc.* 2005; 13:213-221.

Gooding C, Bartlett W, Bentley G, Skinner J, Carrington R, Flanagan A. A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered. *Knee.* 2006; 13: 203-210.

Grande D, Pitman M, Peterson L, Menche D, Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res.* 1989; 7: 208-218.

Green J, Elisseeff J. Mimicking biological functionality with polymers for biomedical applications. *Nature.* 2016; 540: 386-394.

Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science.*2002; 295: 1009-1014.

Grigolo B, Lisignoli G, Piacentini A, Fiorini M, Gobbi P, Mazzotti G, Duca M, Pavesio A, Facchini A. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based

biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* 2002; 23:1187-1195.

Guang L, Boskey A, Zhu W. Regulatory role of stromal cell-derived factor-1 in bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenic differentiation in vitro. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44: 1825-33.

Gudas R, Kalesinskas R, Kimtys V, Stankevicius E, Toliulis V, Bernotavicius G, Smailys 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; 21:1066-1075.

Hadjiev N, Amsden B. An assessment of the ability of the obstruction-scaling model to estimate solute diffusion coefficients in hydrogels. *J Control Release Elsevier B.V* 2015; 199: 10-16.

Haleem A, Singergy A, Sabry D, Atta H, Rashed L, Chu C, El Shewy M, Azzam A, Abdel Aziz M. The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. *Cartilage.* 2010; 1: 253-261.

Han F, Yang X, Zhao J, Zhao Y, Yuan X. Photocrosslinked layered gelatin-chitosan hydrogel with graded compositions for osteochondral defect repair. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26: 160.

Haseltine W. The Emergence of Regenerative Medicine: A New Field and a New Society. *Journal of Regenerative Medicine* 2004; 2: 17-23.

Hay M, Thomas D, Craighead J, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol.* 2014; 32:40-51.

Hejazi F, Mirzadeh H. Roll-designed 3D nanofibrous scaffold suitable for the regeneration of load bearing bone defects. *Prog Biomater.* 2016; 5: 199-211.

Hellman K, Nerem R. Advancing Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Engineering* 2007; 13: 2823-2824.

Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 2002;18:730-734.

Hoemann C, Sun J, Legaré A, et al. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthr Cartil.* 2005; 13: 318–329.

- Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*. 2005; 111: 2198-2202.
- Hoyle C, Bowman C. Thiol-ene click chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010; 49: 1540-1573.
- Huang B, Hu J, Athanasiou K. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials*. 2016; 98: 1-22.
- Hunziker E. Articular cartilage structure in humans and experimental animals. In: Kuettner, K.E., Schleyerbach, R., Peyron, J.G., and Hascall, V.C., eds. *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York: Raven Press, 1992, pp. 183-199.
- Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009; 17: 561–577.
- Jeuken R, Roth A, Peters R, et al. Polymers in cartilage defect repair of the knee: current status and future prospects. *Polymers*. 2016; 8: 219.
- Jo C, Lee Y, Shin W, Kim H, Chai J, Jeong E, Kim J, Shim H, Shin J, Shin I, Ra J, Oh S, Yoon K. Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial. *Stem Cells* 2014; 32: 1254–1266.
- Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge G, Eglin D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauck R, Semino C, Stoddart M. Tissue engineering for articular cartilage repair –the state of the art. *Eur Cell Mater*. 2013; 25: 248-267.
- Jones C, Willers C, Keogh A, Smolinski D, Fick D, Yates, Kirk T, Zheng M. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation in sheep: objective assessments including confocal arthroscopy. *J.Orthop.Res*. 2008;26:292-303.
- Jones D, Wagers A. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9: 11-21.
- Johnson L. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 1986;2:54-69.
- Kaiser L. The future of multihospital systems. *Topics in Health Care Financing* 1992; 18: 32–45.
- Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, Nurzynska D, Kasahara H, Zias E, Bonafe M, Nadal-ginard B, Torella D, Nascimbene A, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Anversa

P. Marrow Cells Differentiate in Cardiac Cell Lineages After Infarction Independently of Cell Fusion. *Circ Res* 2005; 96: 127-137.

Kanatani I, Kanematsu A, Inatsugu Y, Imamura M, Negoro H, Ito N, Yamamoto S, Tabata Y, Ikada Y, Ogawa O. Fabrication of an Optimal Urethral Graft Using Collagen-Sponge Tubes Reinforced with Copoly(L-Lactide/e-Caprolactone). *Tissue Engineering* 2007; 13: 2933-2940.

Kaps C, Fuchs S, Endres M, Vetterlein S, Krenn V, Perka C, Sittinger M. Molecular characterization of tissue-engineered articular chondrocyte transplants based on resorbable polymer fleece. *Orthopade* 2004; 33: 76-85.

Kish G, Hangody L. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 2004; 86: 619-620.

Kisiday J, Kopesky P, Evans C, Grodzinsky A, McIlwraith C, Frisbie D. Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J Orthop Res* 2008; 26: 322-331.

Kon E, Gobbi A, Filardo G, Delcogliano M, Zaffagnini S, Marcacci M. Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years. *Am J Sports Med* 2009; 37:33-41.

Kraeutler M, Mitchell J, Chahla J, McCarty E, Pascual-Garrido C. Intra-articular Implantation of Mesenchymal Stem Cells, Part 1: A Review of the Literature for Prevention of Postmeniscectomy Osteoarthritis. *Orthop J Sports Med.* 2017; 5:2325967116680815. doi: 10.1177/2325967116680815 (a).

Kraeutler M, Mitchell J, Chahla J, McCarty E, Pascual-Garrido C. Intra-articular Implantation of Mesenchymal Stem Cells, Part 1: A Review of the Literature for Meniscal Regeneration. *Orthop J Sports Med.* 2017; 5: 2325967116680814. doi: 10.1177/2325967116680814 (b).

Lane J, Massie J, Ball S, Amiel M, Chen A, Bae W, Sah R, Amiel D. Follow-up of osteochondral plug transfers in a goat model: a 6-month study. *Am J Sports Med.* 2004; 32: 1440-1450.

Langer R, Vacanti J. *Tissue Engineering. Science.* 1993; 260 (5110): 920-926.

Lee C, Burnsed O, Raghuram V, Kalisvaart J, Boyan B, Schwartz Z. Adipose stem cells can secrete angiogenic factors that inhibit hyaline cartilage regeneration. *Stem Cell Research & Therapy* 2012, 3: 35-48.

Li F, Su Y, Wang J, Wu G, Wang C. Influence of dynamic load on friction behavior of human articular cartilage, stainless steel and polyvinyl alcohol hydrogel as artificial cartilage. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21: 147-154.

Liebesny P, Byun S, Hung H, Pancoast J, Mroszczyk K, Young W, Lee R, Frisbie D, Kisiday J, Grodzinsky A. Growth Factor-Mediated Migration of Bone Marrow Progenitor Cells for Accelerated Scaffold Recruitment. *Tissue Eng Part A.* 2016; 22:917-927.

Lin CC. Recent advances in crosslinking chemistry of biomimetic poly(ethylene glycol) hydrogels. *RSC Adv.* 2015; 5 (50): 39844-39858.

Linsley C, Wu B, Tawil B. Mesenchymal stem cell growth on and mechanical properties of fibrin-based biomimetic bone scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2016 Jul 23. doi: 10.1002/jbm.a.35840.

Liu S, Tian Q, Wang L, Hedrick J, Hui J, Yang Y, Ee P. Injectable Biodegradable Poly(ethylene glycol)/RGD Peptide Hybrid Hydrogels for in vitro Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells. *Macromol Rapid Commun.* 2010; 31:1148-1154.

Loeffler M, Potten C. Stem cells and cellular pedigree. In *Stem Cells*. Ed CS Potten, 1997. Pg 1-28.

Loeser R, Goldring S, Scanzello C, Goldring M. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis and Rheumatism* 2012; 64: 1697-1707.

Lorenti A. Wound Healing: From Epidermis Culture to Tissue Engineering. *CellBio* 2012; 1: 17-29.

Lysaght M, Crager J. Origins. *Tissue Engineering* 2009. Part a; 15: 1449-1450.

Mainil-Varlet P, Van Damme B, Nesic D, Knutsen G, Kandel R, Roberts S. A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. *Am. J. Sports Med.* 2010; 38: 880-890.

Majd H, Wipff P, Buscemi L, Bueno M, Vonwil D, Quinn T, Hinz B. A Novel Method of Dynamic Culture Surface Expansion Improves Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Phenotype. *Stem Cells* 2009; 27: 200-209.

Manfredini M, Zerbinati F, Gildone A, Faccini R. Autologous chondrocyte implantation: a comparison between an open periosteal-covered and an arthroscopic matrix-guided technique. *Acta Orthop.Belg.* 2007; 73: 207-218.

Martens P, Bryant S, Anseth K. Tailoring the degradation of hydrogels formed from multivinyl poly(ethylene glycol) and poly(vinyl alcohol) macromers for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules.* 2003; 4: 283-292.

Mazza G, Rombouts K, Hall R, Urbani L, Luong T, Al-Akkad W, Longato L, Brown D, Maghsoudlou P, Dhillon A, Fuller B, Davidson B, Moore K, Dhar D, De Coppi P, Malago M, Pinzani M. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Scientific Reports* 2015, 5:13079, DOI: 10.1038/srep13079.

Micheli L, Browne J, Erggelet C, Fu F, Mandelbaum B, Moseley J, Zurakowski D. Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experience and minimum 3-year follow-up. *Clin.J.Sport Med.* 2001; 11:223-228.

Miller R, Grodzinsky A, Vanderploeg E, Lee C, Ferris D, Barrett M, et al. Effect of self-assembling peptide, chondrogenic factors, and bone marrow-derived stromal cells on osteochondral repair. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 1608-1619.

Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J.Bone Joint Surg.Am.* 1976; 58:230-233.

Mithoefer K, Williams R, Warren R, Wickiewicz T, Marx R. High-impact athletics after knee articular cartilage repair: a prospective evaluation of the microfracture technique. *Am.J.Sports Med.* 2006; 34:1413-1418.

Mithoefer K, Scopp J, Mandelbaum B. Articular cartilage repair in athletes. *Instr.Course Lect.* 2007; 56:457-468.

Morrison S, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006; 441: 1068-1074.

Muller B, Kohn D. Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method. *Orthopade* 1999; 28:4-10.

Muneoka K, Allan C, Yang X, Lee J, Han M. Mammalian regeneration and regenerative medicine. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today* 2008; 84: 265–280.

Murphy J, Fink D, Hunziker E, Barry F. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 3464-347.

Muttigi M, Han I, Park HK, Park H, Lee S. Matrilin-3 Role in Cartilage Development and Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2016; 17:590-600.

Nakahara H, Bruder S, Haynesworth S, Holecek J, Baber M, Goldberg V, Caplan A. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 1990; 11: 181-188.

Nehrer S, Breinan H, Ramappa A, Hsu H, Minas T, Shortkroff S, Sledge C, Yannas I, Spector M. Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 1998; 19:2313-2328.

Nicodemus G, Bryant S. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008; 14: 149-165.

Nicodemus G, Skaalure S, Bryant S. Gel structure has an impact on pericellular and extracellular matrix deposition, which subsequently alters metabolic activities in chondrocyte-laden PEG hydrogels. *Acta Biomater.* 2011; 7: 492-504.

Nishikawa S, Jakt L, Era T. Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8: 502-507.

Nuttelman C, Rice M, Rydholm A, et al. Macromolecular monomers for the synthesis of hydrogel niches and their application in cell encapsulation and tissue engineering. *Prog Polym Sci.* 2008; 33: 167-179.

O'Connors N, Green H. Grafting of Burns with Cultured Epithelium from Autologous Epidermal Cells. *Lancet* 1981; 317: 75-78.

O'Driscoll S, Keeley F, Salter R. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1986; 68: 1017-1035.

O'Driscoll S, Keeley F, Salter R. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1988; 70: 595-606.

O'Driscoll S, Fitzsimmons J. The role of periosteum in cartilage repair. *Clin.Orthop.Relat Res.*2001; 391 (Suppl): S190-S207.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson S, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine D, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410, 701–705.

Outerbridge R. The etiology of chondromalacia patellae. *J.Bone Joint Surg.Br.* 1961;43-B:752-757.

Outerbridge H, Outerbridge A, Outerbridge R. The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. *J.Bone Joint Surg.Am.* 1995;77:65-72.

Pascual-Garrido C, Slabaugh M, L'Heureux D, Friel N, Cole B. Recommendations and treatment outcomes for patellofemoral articular cartilage defects with autologous chondrocyte implantation: prospective evaluation at average 4-year follow-up. *Am J Sports Med* 2009; 37 Suppl 1: 33s-41s.

Pascual-Garrido C, Daley E, Verma N, Cole B. (a) A comparison of the outcomes for cartilage defects of the knee treated with biologic resurfacing versus focal metallic implants. *Arthroscopy.* 2017; 33: 364-373.

Pascual-Garrido C, Rodriguez-Fontan F, Aisenbrey E, Payne K, Chahla J, Goodrich L, Bryant S. (b) Current and Novel Injectable Hydrogels to Treat Focal Chondral Lesions: Properties and Applicability. *Journal of Orthopedic Research.* 2017; doi: 10.1002/jor.23760.

Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin.Orthop.Relat Res.* 2000; 374: 212-234.

Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund E, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am.J.Sports Med.* 2002; 30: 2-12.

Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.

Poole A, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001; 391 Suppl, S26-S33.

Raftery R, Woods B, Marques A, Moreira-Silva J, Silva T, Cryan S, Reis R, O'Brien F. Multifunctional Biomaterials from the Sea: Assessing the effects of Chitosan incorporation into

Collagen Scaffolds on Mechanical and Biological Functionality. *Acta Biomater* 2016; 43: 160-169.

Ren X, Wang F, Chen C, Gong X, Yin L, Yang L. Engineering zonal cartilage through bioprinting collagen type II hydrogel constructs with biomimetic chondrocyte density gradient. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016;17:301.

Rheinwald J, Green H (a). Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* 1975; 6: 317-330.

Rheinwald J, Green H (b). Serial cultivation of strains of epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-344.

Riazi A, Kwon S, Stanford W. Stem cell sources for regenerative medicine. *Methods in Molecular Biology* 2009; 482: 55–90.

Ringe J, Strassburg S, Neumann K, et al. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 2007; 101: 135-146.

Roberts J, Nicodemus G, Greenwald E, Bryant S. Degradation improves tissue formation in (un)loaded chondrocyte-laden hydrogels. *Clin Orthop Relat Res.* 2011; 469: 2725-2734.

Roberts J, Bryant S. Comparison of photopolymerizable thiol-ene PEG and acrylate-based PEG hydrogels for cartilage development. *Biomaterials* 2013, 34: 9969-9979.

Rose T, Craatz S, Hepp P, Raczynski C, Weiss J, Josten C, Lill H. The autologous osteochondral transplantation of the knee: clinical results, radiographic findings and histological aspects. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 2005; 125: 628-637.

Rota M, Kajstura J, Hosoda T, Bearzi C, Vitale S, Esposito G, Iaffaldano G, Padin-Iruegas ME, Gonzalez A, Rizzi R, Small N, Muraski J, Alvarez R, Chen X, Urbanek K, Bolli R, Houser SR, Leri A, Sussman MA, Anversa P. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:17783-17788.

Salinas C, Cole B, Kasko A, Anseth K. Chondrogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells photoencapsulated within poly(ethylene glycol)-arginine-glycine-aspartic acid-serine thiol-methacrylate mixed-mode networks. *Tissue Eng.*2007; 13:1025-1034.

Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002; 10: 62-70.

Schneider M, Barnes C, Bryant S. Characterization of the chondrocyte secretome in photoclickable poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biotechnol Bioeng*. 2017; 114: 9–10.

Shah M, Kaplan K, Meislin R, Bosco J. Articular Cartilage Restoration of the Knee. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 2007; 65 (1): 51-60.

Sharma B, Williams C, Khan M, Manson P, Elisseeff J. In vivo chondrogenesis of mesenchymal stem cells in a photopolymerized hydrogel. *Plast Reconstr Surg*. 2007; 119:112-120.

Sharma B, Fermanian S, Gibson M, Unterman S, Herzka D, Cascio B, Coburn J, Hui A, Marcus N, Gold G, Elisseeff J. Human Cartilage Repair with a Photoreactive Adhesive-Hydrogel Composite. *Science Translational Medicine* 2013; 5: 167ra6. doi: 10.1126.

Sheridan C. Cardiac stem cell therapies inch toward clinical litmus test. *Nature Biotechnology* 2013; 31: 5-6.

Skaalure S, Chu S, Bryant S. An enzyme-sensitive PEG hydrogel based on aggrecan catabolism for cartilage tissue engineering. *Adv Healthc Mater*. 2015; 4:420-431.

Smeriglio P, Lai J, Yang F, Bhutani N. 3D Hydrogel Scaffolds for Articular Chondrocyte Culture and Cartilage Generation. *J Vis Exp*. 2015.XXX.

Shin H. Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 2007; 28: 126-133.

Sohn D, Lottman L, Lum L, Kim S, Pedowitz R, Coutts R, Sah R. Effect of gravity on localization of chondrocytes implanted in cartilage defects. *Clin.Orthop.Relat Res*. 2002; 394: 254-262.

Song J, Ott H. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med* 2011; 17: 424-432.

Sontjens S, Nettles D, Carnahan M, Setton L, Grinstaff M. Biodendrimer-based hydrogel scaffolds for cartilage tissue repair. *Biomacromolecules*. 2006; 7: 310-316.

Spiller K, Maher S, Lowman A. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011; 17:281-299.

Sridhar B, Brock J, Silver J, Leight J, Randolph MA, Anseth K. Development of a cellularly degradable PEG hydrogel to promote articular cartilage extracellular matrix deposition. *Adv Healthc Mater.* 2015; 4 (5): 702-713.

Steadman J, Rodkey W, Singleton S, Briggs K. Microfracture technique for full full-thickness condral defects: Technique and clinical results. *Oper Tech Orthop.* 1997; 7: 300-304.

Steadman J, Briggs K, Rodrigo J, Kocher M, Gill T, Rodkey W. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee. *Arthroscopy* 2003; 19:477-484.

Steinmetz N, Bryant S. Chondroitin sulfate and dynamic loading alter chondrogenesis of human MSCs in PEG hydrogels. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109: 2671-2682.

Steinmetz N, Aisenbrey E, Westbrook K, Qi H, Bryant S. Mechanical loading regulates human MSC differentiation in a multi-layer hydrogel for osteochondral tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2015; 21: 142-153.

Stem cells: Scientific progress and future research directions. Department of Health and Human Services, June 2001. <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>.

Stoick-Cooper C, Moon R, Weidinger G. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes & Development* 2007; 21: 1292–1315.

Subbiah R, Suhaeri M, Hwang M, Kim W, Park K. Investigation of the changes of biophysical/mechanical characteristics of differentiating preosteoblasts in vitro. *Biomaterials Research* 2015; 19: 24-31.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126, 663–676.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors, *Cell* 2007; 131: 1-12.

Tatara A, Mikos A. Tissue Engineering in Orthopaedics. *J Bone Joint Surg Am.* 2016; 98: 1132-1139.

Tong S, Wang Z, Lim P, Wang W, Thian E. Uniformly-dispersed nanohydroxapatite-reinforced poly(ϵ -caprolactone) composite films for tendon tissue engineering application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;70:1149-1155.

Tran-Khanh N, Hoemann C, McKee M, Henderson J, Buschmann M. Aged bovine chondrocytes display a diminished capacity to produce a collagen-rich, mechanically functional cartilage extracellular matrix. *J.Orthop.Res.* 2005; 23: 1354-1362.

Ueno T, Kagawa T, Mizukawa N, Nakamura H, Sugahara T, Yamamoto T. Cellular origin of endochondral ossification from grafted periosteum. *Anat.Rec.* 2001; 264: 348-357.

Ulrich-Vinther M, Maloney M, Schwarz E, Rosier R, O'Keefe R. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg* 2003; 11: 421-430.

Urban J, Bayliss M. Regulation of proteoglycan synthesis rate in cartilage in vitro: influence of extracellular ionic composition. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 992:59-65.

Vacanti J, Vacanti Ch. The challenge of tissue engineering. In *Principles of Tissue Engineering*. Ed. Robert Lanza, Robert Langer and William L Chick. Academic Press 1997. Pp 1-6.

Varghese S, Hwang N, Canver A, Theprungsirikul P, Lin D, Elisseeff J. Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol.* 2008; 27: 12-21.

Vilela C, Correia C, Oliveira J, Sousa R, Espregueira-Mendes J, Reis R. Cartilage Repair Using Hydrogels: A Critical Review of in Vivo Experimental Designs. *ACS Biomaterials Science & Engineering.* 2015;1:726-739.

Villanueva I, Hauschulz D, Mejc D, Bryant S. Static and dynamic compressive strains influence nitric oxide production and chondrocyte bioactivity when encapsulated in PEG hydrogels of different crosslinking densities. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 16: 909-918.

Villanueva I, Weigel CA, Bryant SJ. Cell-matrix interactions and dynamic mechanical loading influence chondrocyte gene expression and bioactivity in PEG-RGD hydrogels. *Acta Biomater.* 2009; 5: 2832-2846.

Villanueva I, Gladem SK, Kessler J, Bryant SJ. Dynamic loading stimulates chondrocyte biosynthesis when encapsulated in charged hydrogels prepared from poly(ethylene glycol) and chondroitin sulfate. *Matrix Biol.* 2010; 29: 51-62.

Vo T, Shah S, Lu S, Tatar A, Lee E, Roh T, Tabata Y, Mikos A. Injectable dual-gelling cell-laden composite hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2016; 83: 1-11.

Wakitani S, Goto T, Pineda S, Young R, Mansour J, Caplan A, Goldberg V. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1994; 76: 579-592.

Wang D, Varghese S, Sharma B, Strehin I, Fermanian S, Gorham J, Fairbrother D, Cascio B, Elisseeff J. Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. *Nat Mater.* 2007; 6: 385-392.

Wang Y, Zhu G, Li N, Song J, Wang L, Shi X. Small molecules and their controlled release that induce the osteogenic/chondrogenic commitment of stem cells. *Biotechnol Adv.* 2015; 33:1626-1640.

Williams R, Harnly H. Microfracture: indications, technique, and results. *Instr. Course Lect.* 2007; 56: 419-428.

Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee* 2007; 14: 177-182.

Widuchowski W, Lukasik P, Kwiatkowski G, Faltus R, Szyluk K, Widuchowski J, Koczy B. Isolated full thickness chondral injuries. Prevalance and outcome of treatment. A retrospective study of 5233 knee arthroscopies. *Acta Chir Orthop.Traumatol.Cech.* 2008; 75:382-386.

Yang P, Temenoff J. Engineering Orthopedic Tissue Interfaces. *Tissue Engineering: Part B.* 2009; 15: 127-141.

Zaslav K, Cole B, Brewster R, DeBerardino T, Farr J, Fowler P, Nissen C. A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am.J Sports Med* 2009; 37:42-55.

Zhang F, Song Q, Huang X, Li F, Wang K, Tang Y, Hou C, Shen H. A Novel High Mechanical Property PLGA Composite Matrix Loaded with Nanodiamond-Phospholipid Compound for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016; 8: 1087-1097.

Zeifang F, Oberle D, Nierhoff C, Richter W, Moradi B, Schmitt H. Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *Am.J.Sports Med.* 2010; 38:924-933.

Zhang J, Wang J, Zhang H, Lin J, Ge Z, Zou X. Macroporous interpenetrating network of polyethylene glycol (PEG) and gelatin for cartilage regeneration. *Biomed Mater.* 2016; 11 (3): 035014. doi: 10.1088/1748-6041/11/3/035014.

Zheng M, Willers C, Kirilak L, Yates P, Xu J, Wood D, Shimmin A. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment. *Tissue Eng* 2007; 13:737-746.

Zhu M, Feng Q, Sun Y, Li G, Bian L. Effect of cartilaginous matrix components on the chondrogenesis and hypertrophy of mesenchymal stem cells in hyaluronic acid hydrogels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016; doi: 10.1002/jbm.b.33760.

Zipori D. The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional. *Stem Cells* 2005; 23: 719–726.

