

TOMA DE POSESIÓN COMO ACADÉMICO DE HONOR

26 años de rejuvenecimiento de articulaciones con cultivo de condrocitos*

Pedro Guillén García
Académico de Honor de la Real Academia
pedroguillen612@gmail.com

1.- RESUMEN

El cartílago hialino de las articulaciones tras una lesión presenta una casi nula capacidad para autorrepararse y entonces provoca osteoartritis (artrosis) que acaban en reemplazo de la articulación.

Para tratar el daño articular se han desarrollado varios tratamientos, incluida la terapia celular. La mejor opción para tratar el daño articular focal es la Implantación de Condrocitos Autólogos, ICA (ACI en inglés -Autologous Chondrocytes Implantation) y con ello se rejuvenece la articulación y lo aplicamos en 152 pacientes. En este artículo pretendemos mostrar una revisión narrativa que señale la evolución y mejoras de nuestra técnica de implantación de condrocitos. La técnica del cultivo de condrocitos autólogos la mejoramos con la implantación sobre membrana, Membrane Autologous Chondrocytes (MACI) y con este proceder operamos 174 pacientes. Logramos mejores resultados que el MACI con la aplicación de alta densidad celular utilizando una membrana de colágeno como transportador (HD-ACI -Alta densidad del ACI-). La técnica MACI originaba un tejido resultante blando y poco rico en células y con el procedimiento de alta densidad (HD-ACI), en el que implantamos 5 millones de condrocitos por cm², nos proporcionó un tejido más duro y con mayor riqueza celular. Este procedimiento se demostró en modo animal por nosotros, en ovejas.

Una vez demostrado en rodilla y tobillo su gran eficacia -hasta 90% de curaciones- pasamos su aplicación a cadera y muñeca.

* Sesión Solemne de toma de posesión como Académico de Honor del Dr. D. Pedro Guillén García celebrada el 18-10-2023.

Para las articulaciones la alta densidad de condrocitos -HD-ACI- representa una solución potencial para rejuvenecer articulaciones con defectos articulares agudos y significa un paso importante en la Medicina Regenerativa y Terapia Celular. Desde 1996 que implantamos el primer cultivo de condrocitos autólogos hemos tratado 810 enfermos.

2.- INTRODUCCIÓN

El Cartílago Articular (CA) es un tejido conectivo especializado que recubre los extremos de los huesos de las articulaciones¹. El cartílago contiene un solo tipo de célula, el condrocito que está enterrado en una muy densa matriz extracelular que contiene agua, colágeno (sobre todo el tipo II), agrecano, ácido hialurónico y otros componentes [1, 2]. El cartílago hialino es un tejido que no contiene nervios, ni vasos, ni linfáticos, lo que le hace ser un tejido privilegiado desde el punto inmunológico³. Su composición y características especiales confieren al CA sus propiedades muy especiales: es responsable de la baja fricción entre las superficies articulares óseas de la articulación y también es capaz de proporcionar la absorción de cargas durante el movimiento [3, 4].

Además, el CA no se autorepara, la lesión condral crece y crece hasta destruir la articulación, ocasionando una artrosis que precisa una prótesis [4].

3.-+ EL CARTÍLAGO, NUESTRA VISIÓN DE ESTE TEJIDO

Hemos visto el cartílago en todas sus edades, desde la época embrionaria hasta la vejez y también en la adolescencia (figuras 1a y 1b).

Le hemos visto cambiar de color del blanco-brillante de la época embrionaria hasta el marrón claro de la vejez, pasando por la adolescencia, donde muestra su mejor aspecto.

Le hemos visto y he tocado con diferente dureza, desde el blando y casi desplazable sobre el hueso subyacente de la época fetal hasta el duro, pétreo e insignificante de grosor de la edad avanzada.

Le hemos visto limpio y hermoso del adolescente y en otras ocasiones cubierto de cristales solo en superficie por la gota y en otros con cristales en todo el espesor del cartílago como en la condrocalcinosis (cristales de pirofosfato cálcico).

Como comento más arriba ese hermoso proyecto creador que es el cuerpo humano, que he estudiado en profundidad en sus distintas etapas embrionaria-fetal-adolescente-adulta-vejejo-, por mor del tiempo presenta deterioros biológicos tan evidentes que cambia aquella

imagen de estructura plena de esperanzas a ésta otra llena de frustraciones y desengaños que representa el ser humano en la edad avanzada.

La primera causa de deterioro y muerte en el hombre es el tiempo no las 3 “Ces” (corazón, cáncer, carretera) como se comentó siempre. Sí, todos los tejidos pierden su mejor función con el tiempo y el deterioro funcional se acentúa cuando reciben traumatismos o enfermedades.

Los embriólogos y anatómicos describimos cuatro fases de la formación articular (figura 2):

1. Determinación y condensación del blastema articular. Condrificación.
2. Fase interzonas
3. Fase de cavitación
4. Fase de Remodelación fetal

La cavidad única articular de la rodilla se observa a partir de especímenes de 35 mm y es la consecuencia de la fusión de 5 primitivas cavidades: dos femoro-meniscales, dos menisco-tibiales y una femoro-patelar.

La nutrición del cartílago articular sigue siendo tema discutido y está compuesto por tres elementos, la célula (condrocito) que representa el componente esencial, las fibrillas o fibras de colágeno y la matriz extracelular, que dependen del condrocito por entero ya que a él deben su existencia y sus propiedades fisicoquímicas. En nuestro laboratorio hemos visto a los condrocitos cultivados producir la matriz extracelular y quedar enterrados por ella y no establecer los condrocitos contacto entre sí. La síntesis de colágeno tipo II, los proteoglicanos, las proteínas no colágenas específicas y su configuración esférica, diferencia al condrocito de otras células.

Relatar algunos detalles de la biología articular es esencial para mejor conocer la función de cada uno de sus componentes. Aseguramos que la embriología es fundamento y pilar conceptual de la biología del desarrollo y que además ha originado un frondoso árbol de conocimientos para intentar satisfacer la curiosidad humana en relación con sus principios “quien vea las cosas desde su comienzo tendrá de ellas la mejor y más perfecta imagen”, comento Aristóteles (384-322 a de J) en su libro sobre embriología.

La articulación está bañada por el líquido sinovial que es un dializado del plasma al que se añade ácido hialurónico que le confiere viscosidad y propiedades como lubricante.

El líquido sinovial es pobre en células y carece de fibrinógeno por lo que no se coagula. La rodilla, la articulación sinovial más grande, contiene menos de 3cc de líquido sinovial en condiciones normales.

–El juego articular mantiene con buena salud el cartílago articular y por ende de todas las articulaciones.

La articulación que no desempeña sus normales funciones de movimiento y carga, su cartílago se hace más vulnerable y se lesiona más precozmente que el cartílago que soporta carga y movilidad.

El metabolismo anaeróbico de las células del cartílago articular de variedad hialina, puede persistir en la falta de oxígeno.

Para mantener la salud del cartílago, que es tanto como decir integridad, dureza, plasticidad y color, es necesaria una regular, equilibrada e intermitente compresión entre los extremos articulares. Al recibir la carga el cartílago se deforma y al ceder la carga se recupera.

Los condrocitos presentan distinta forma, tamaño y casi seguro función según ocupe espacios superficiales o profundos. Y más, creemos que no es igual el cartílago de Cadera- parece el más sensible al desgaste-, Rodilla y Tobillo, que es el más resistente y el que menos se lesiona aun soportando la misma carga e impacto que rodilla y cadera y además la artrosis de tobillo se tolera mejor que sus dos grandes articulaciones proximales. Pensamos que el cartílago del tobillo tolera mejor el trauma, carga y lesión cartilaginosa, y cuando en 1996 realizamos un ACI del cuadrante superoexterno del astrágalo postgrave esguince, el cartílago lo tomamos del propio astrágalo –y así llevamos realizadas más de 75 casos- para de este modo, colocar en la lesión cartilaginosa las mismas células –condrocitos- una vez cultivadas y multiplicadas.

En nuestro hospital con 810 casos de implantes de condrocitos autólogos, de las 3 grandes articulaciones del miembro inferior, -rodilla, tobillo y cadera, por orden del número de casos de cada articulación- tenemos el convencimiento que los resultados en tobillo son mejores que en rodilla y en cadera y sobre este tema lo comentaremos en los resultados.

4.- EL HUESO EN LA HISTORIA DEL HOMBRE

El hueso mal consolidado como el cúbito de la figura 5a guarda en su resultado la memoria estuchada –o en estuche- de la ciencia médica que recibió. Este hueso consolidó que es el fin esencial de una fractura, pero como lo hizo con deformidad y acortamiento aprendieron las siguientes civilizaciones que, había además de los procedimientos aplicados que reducir la fractura.

Pues en la naturaleza humana, no hay ni premios ni castigos, existen sólo consecuencias.

El esqueleto (óseo) es el único resto del “homo sapiens” que guarda en su estructura y composición los datos suficientes para informarnos de cómo fue su evolución a lo largo de la historia e incluso si sufrió patologías (figura 5b).

En la Edad de Piedra las tribus de cazadores y pescadores se ven retrasadas por los cojos tras sufrir caídas con fracturas que no son capaces de mantener el ritmo de trashumancia importante en aquella época. Se ha comprobado en huesos con fracturas curadas que tipo de inmovilización recibieron como tratamiento.

El tratamiento que recibía dependía del siglo en que ocurría ya que la medicina es una disciplina nacida del “homo sapiens” y por ello ha estado siempre unida a la misma evolución que ha caracterizado a nuestra especie a lo largo de la historia.

La medicina actúa sometida en la naturaleza y vive presa de todas sus leyes o normas.

5.- LA CÉLULA COMO MEDICAMENTO

Soy médico y nada humano me es ajeno.

Tras el estudio del desarrollo en embriones y fetos y también en la disección en cadáveres me sentí atraído por todos los sistemas u órganos que componen el cuerpo humano, aunque destacaran las parcelas del aparato locomotor y la investigación sobre células y tejidos sin olvidar un afán innovador. Es como si dentro de mí sintiera que habitaban distintas personas que fueran capaces de hacer por instinto o por impulso varias cosas conectadas. **Eran mi yo, el otro y el de más allá.** Por tanto, estudiaba la patología del aparato locomotor, luego lo colocaba ante mí en su época de desarrollo y después me disponía a mejorar su función. Si, conocer la función normal del tejido y cuando enfermo o viejo, reconducirlo.

Como vamos a hablar sobre “la célula como medicamento” y para ello se precisa cultivar células, justo es referirnos a **Wilhelm Roux** que en 1805 observó que las células embrionarias de pollo aisladas podían ser mantenidas vivas en una solución salina. Posteriormente, en 1910 **Alexis Carrel** (1873-1944) francés, cirujano y biólogo Premio Nobel, en 1952 demostró que distintas células y tejidos podían crecer durante periodos largos de tiempo en medios de cultivo, siempre que estos se cambiaran con frecuencia para poder así nutrir a las células de manera regular.

Harry Eagle (1905-1992) biólogo nacido en Nueva York, describió el “medio esencial mínimo de Eagle” que facilitó conocer cómo se reproducen las células humanas de los mamíferos. Observó que las células en cultivo tenían una serie de necesidades nutricionales mínimas y

esenciales y lo demostró al hacer proliferar células en medio de cultivo compuesto por una mezcla química de vitaminas, coenzimas y aminoácidos, suplementado con suero animal.

Nuestra tesis doctoral en la Universidad Complutense de Madrid (UCM), dirigida por el Prof. D. Juan Jiménez Collado, y basándonos en la excelente embrioteca (Prof. Orts Llorca y Juan Jiménez Collado) 1988, estudiamos embriones de pollo correspondientes a huevos incubados en estufa a 38°C en los estadíos 12 y 14 de Hamilton-Hamburger en dónde no había esbozo de miembros, y otro grupo en estadíos 18 a 20 ya con esbozos de miembros y tomamos el material del esbozo, lo trasplantamos a la cavidad celómica del pollo previo desagregados y re-agregados celulares. El resultado fue que el material celular que procedía del área presuntiva de miembros desarrollados libres en la cavidad celómica da origen a estructura típica de miembros en estadíos precoces diferenciativos. Habíamos logrado a partir de las células de los esbozos de embriones en estadíos de 18 a 20, una estructura con formaciones musculares y cartilaginosas similares a las del receptor y en su proximidad había fibras nerviosas, lo que sugiere la dependencia neural. Así logramos con aquel grupo de células en la cavidad celómica un evidente tejido cartilaginoso. Por tanto, es el tejido cartilaginoso el primer tejido en antigüedad del aparato locomotor (figura 6).

Después de esta breve introducción sobre los cultivos de la célula para de ella obtener tejidos y órganos, nos vamos a referir al condrocito, única célula del Cartílago Hialino Articular (CHA), tejido esencial en las articulaciones. (figura 7)

6.- FORMACIÓN ARTICULAR Y GROSOS CARTÍLAGO ARTICULAR

En el presente trabajo pretendemos mostrar que tras una lesión aguda de cartílago articular si aplicamos en el defecto creado un cultivo de condrocitos autólogos la articulación sigue manteniendo las grandes prestaciones biomecánicas que venía prestando. Es decir, hemos rejuvenecido la articulación.

Ya hemos mostrado como se forma una articulación y lo expresamos en la figura 2. Esta articulación presenta en sus extremos óseos un recubrimiento con CA, tejido avascular, aneural y a linfático que además presenta una muy baja actividad metabólica; además solo tiene un tipo de célula, el condrocito y la superficie es deslizante y resistente a la compresión y el cizallamiento

Hasta el año 75 del siglo pasado las lesiones del menisco de la rodilla se resolvían con la extirpación total del menisco según idea heredada de insignes cirujanos.

Así J. Sutton, cirujano inglés publicó en 1785.[5] que los “meniscos son vestigios embrionarios afuncionales”, se tradujo como inservible y también Smille mantuvo esta idea en la primera mitad del S.XX e innumerables cirujanos realizaron meniscectomía total, meniscocidios, comentamos nosotros, y los pacientes evolucionaron años después a grandes lesiones de cartílago y artrosis.

Como demostración de este proceder, nosotros tenemos una meniscoteca con más de 120 meniscos en metacrilato transparente, que nos permite ver la lesión meniscal por sus dos caras. Además, el bloque de metacrilato lleva un cartel con el número de historia y otros datos del paciente y con ello pretendíamos -como así fue- que la lesión del menisco nos anunciara el síntoma que sentía el paciente, es decir, relacionar el tipo de rotura con un síntoma y así resultó (figura 8).

Nuestra meniscoteca de 1975 a 1982 es muy visitada por distinguidos ortopedas de todo el mundo.

La preservación de la articulación con cultivos autólogos de condrocitos sólo lo hemos realizado en cuatro articulaciones (rodilla, tobillo, cadera y muñeca) de las 360 que disfruta el hombre (figura 9).

Como mostramos en la Fig.10 el cartílago lo hemos estudiado en casi todos sus aspectos del blanco y brillante de la época fetal al color marrón a veces de la tercera edad.

El cartílago resiste muchos pasos del hombre sin lesionarse como vemos en la figura 11.

También mostramos el distinto grosor del cartílago en la cabeza femoral, rótula y rodilla en la figura 12.

El grosor del CA es mayor en jóvenes que en ancianos; en las grandes articulaciones es mayor en las zonas de fricción o estrés o cizallamiento y también es más grueso en las articulaciones de mala coaptación o menos congruentes (rótula) (figura 13).

La inmovilización articular decrece la síntesis de la matriz extra-articular y adelgaza en CA.

El grosor en los cartílagos según un estudio nuestro es como sigue:

Cadera 3-5 mm

Rodilla 2-6 mm

Rótula 5-7 mm

Tobillo 1-1.7 mm

También el cartílago es más grueso en el hombre que en la mujer. En la persona muy musculada aumenta el grosor del cartílago y en las personas de alto IMC (Índice de Masa Corporal) es de menor grosor.

El grosor del cartílago de la rodilla de un ratón es de 0.1 mm.

El grosor del cartílago del tobillo es de los menos gruesos, a pesar de ello es el más resistente.

En la figura 14 mostramos extensas lesiones del cartílago de distintas articulaciones que logramos su preservación tras aplicar el cultivo de condrocitos autólogos. Estas graves lesiones hubieran evolucionado a artrosis y posterior prótesis.

El cartílago del tobillo, el más resistente del miembro inferior, y por tanto soporta mejor la artrosis. Los cultivos de condrocitos han mostrado también los mejores resultados.

7.- TERMINOLOGÍA Y CONDROPENIA

Terminología. División, multiplicación o expansión celular. Cambio de paradigma en biología. Condropenia.

Cuando realizamos en la sala blanca o estéril el cultivo celular del condrocito autólogo, hemos multiplicado el número de células por divisiones sucesivas y resultan 21 millones de condrocitos iguales, pero nunca varían su tamaño. Simplemente se ha realizado una multiplicación del número de condrocitos, es decir, sería una fase de división, multiplicación o proliferación celular.

Esta terminología define de forma **inequívoca** la actividad celular.

Los anglosajones a esas fases de proliferación celular la denominan “fase de expansión” que **no** es un término **unívoco**.

Nosotros entendemos que la “expansión celular” se produce en dos fases por mecanismos totalmente distintos:

- Cuando el número de células aumentan o multiplicación celular.
- Cuando se alarga el citoplasma y la célula se agranda.

En resumen, recomendamos usar el término de proliferación o división o multiplicación celular, término **inequívoco** y no el de expansión que **no** es un término **unívoco**.

En el año 2008 en plena aplicación del MACI en pacientes realizamos una investigación con el Prof. Jesús Pintor (Dpto. de Bioquímica de la UCM) en la que aplicamos en una membrana de MACI tetraphosphate de diadenosina, **Ap₄A**, y en otro MACI no aplicamos nada y el resultado fue que el MACI en el que se aplicó Ap₄A se produjo un incremento del 150% en la producción de matriz extracelular. Este procedimiento estaría indicado en aquellos pacientes que precisen una rápida recuperación tras la cirugía con un defecto osteocondral profundo de más de 12 mm. Según mostramos en las figuras 15 a-b-c-d.

Cambio de paradigma en biología

Hablamos de que el empleo de la célula como medicamento, supone un cambio de paradigma. **Representa una revolución en el pensamiento, al variar lo que está tomado como ejemplo en un ámbito de la ciencia.** Pues bien, si la célula es un medicamento, disciplinas tales como la histología o la citología han de pasar de ser meras **ciencias descriptivas** a ser **proactivas** y estudiar las características que son necesarias para la reparación de tejidos. Pero debemos ser cautos ya que esta es una nueva disciplina y queda todavía un largo camino que recorrer hasta su utilización global.

Condropenia

Definir condropenia: Es un término médico que empezamos a usar en el año 1996 para indicar que la rodilla del paciente al cual le estamos practicando una artroscopia tenía “menos cartílago” del normal, que es tanto como decir que sufría una pobreza o carencia de cartílago. Se verá más delgado, más duro ya que el presionar con el palpador artroscópico no se deprimía o dejaba huella y también su color había variado a un marrón oscuro desde el blanco-amarillento normal. También veíamos que, en estas rodillas, sobre todo en cara lateral de rótula y cóndilo femoral interno, deterioro cartilaginosa y un tiempo después los síntomas clínicos habían sido mayores (dolor, crujidos, subderrame, pseudobloqueos, hipotrofia de cuádriceps) y pérdida de los últimos grados de extensión y flexión con una avanzada artrosis que requería una prótesis articular.

Entonces buscamos en los diccionarios la palabra condropenia y comprobamos que NO existe y sin embargo encontramos condromalacia –cartílago blando- y condropatía - enfermedad de los cartílagos-. Pero sí existe en el diccionario la palabra osteopenia (osteo-griego “hueso”, más penia -griego “carencia o pobreza”) como pobreza o disminución de la densidad y masa ósea. Pues bien, este significado es el que reclamamos para el cartílago, condropenia (Khondro-griego-cartílago más penia-griego-carencia o pobreza).

Pretendemos que el cartílago goce de los mismos términos que otros tejidos, como en carencias hematológicas, “anemia”, “leucopenia”; en carencias de densidad ósea, “osteopenia” y en carencia o pobreza de hierro “ferropenia”.

A la vez que reclamamos el término de condropenia para la carencia o pobreza de cartílago, proclamamos nuestra ignorancia del porqué muchas veces cursan asintomáticas, determinadas lesiones del cartílago en rótulas o cóndilos femorales. Y es sólo un hallazgo artroscópico, pero sí sabemos que estos pacientes años después, o con ocasión de un traumatismo de rodilla, manifiestan rica sintomatología, típica de artrosis, y entonces los tratamientos conservadores son ineficaces y se acaba con una prótesis.

La condropenia nos indica que el CA de la articulación está empobrecido y pese a estudiar con profundidad el líquido sinovial no tenemos un parámetro que nos indique la pobreza cartilaginosa. Hablamos también de condropenia cualitativa en la que se pierden capas de CA de la articulación y condropenia cuantitativa cuando se ha perdido todo el grosor de CA y deja al descubierto el hueso subcondral (Fig. 16 a-b-c).

8.- REPARACIÓN Y REGENERACIÓN

En el proceso de restauración de un tejido dañado existen dos conceptos claramente diferenciados: la **reparación** cuando no hay muerte celular formándose un tejido semejante al tejido lesionado, pero no igual y la **regeneración**, si ha existido muerte celular, deduciéndose de ello la terapia regenerativa constituida por aquellas medidas terapéuticas encaminadas a reemplazar un tejido muerto por otro que cumpla las mismas funciones biológicas y con la misma estructura. Es decir, igual al original.

Dentro de las **terapias regenerativas**, podemos diferenciar la **ingeniería tisular** (IT) para la creación de tejidos y la **terapia celular** (TC), como uso de las células para la reparación de lesiones. Así vemos en las figuras 17 a y b.

Terapia regenerativa

Podemos diferenciar la **ingeniería tisular para la producción de tejidos** y la **terapia celular como aplicación de células para la reparación de lesiones**. En ese contexto, a finales del siglo XX y comienzos de éste, se ha producido una nueva revolución en el campo de la Medicina: la aparición de la terapia celular y la ingeniería tisular para el tratamiento de enfermedades. En esta nueva disciplina, la verdadera protagonista es la **célula**, que convenientemente manejada, **constituye un medicamento**. En efecto, tras el nacimiento

de los cultivos celulares a finales del siglo XIX y comienzos del XX, su desarrollo, a lo largo del pasado siglo logra que la célula se pueda usar como medicamento.

9.- TERAPIAS CONSOLIDADAS

En este grupo de medicamentos de terapias consolidadas distinguimos tres tipos:

- **Terapia celular**, en el que sólo se utilizan células.
- **Ingeniería tisular**, en la que además se utiliza un biomaterial o transportador acompañando a las células.
- **Terapia génica**, en la que se utilizan células modificadas genéticamente.

Las terapias consolidadas son aquellos procedimientos cuya eficacia y seguridad están avaladas por años de investigación previa y utilización en pacientes antes que la terapia celular fuera considerada medicamento (figuras 18 a y b).

Tenemos tres terapias consolidadas:

1. Producción de piel a partir de queratinocitos
2. Tratamiento de úlceras corneales mediante células del limbo corneal.
3. Implante de Condrocitos Autólogos para el tratamiento de lesiones condrales.

10.- JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

Las afecciones musculoesqueléticas incluyen **más de 150 enfermedades y síndromes, generalmente son progresivos y dolorosos**. Se pueden caracterizar de forma general como **enfermedades articulares, discapacidad física**, trastornos vertebrales y **trastornos causados por un traumatismo**. Las afecciones que presentan un mayor impacto social son la **artritis reumatoide**, la **artrosis**, la **osteoporosis**, **lumbalgia** y los **traumatismos de las extremidades**. La articulación más afectada es la **rodilla**, seguida de la cadera, tobillo y hombro.

Consideramos que está plenamente justificado este tema, por la gran frecuencia de las lesiones por traumatismos de tráfico, trabajo y, sobre todo, del deporte; además de las lesiones condrales tras menisectomía, técnica tan en uso hoy día y sin olvidar, las osteocondritis disecantes y las condropatías degenerativas de cualquier origen (Guillen, P., 1997) [6].

Esta técnica es una gran esperanza para recuperar la buena funcionalidad de las articulaciones dañadas y cuyos buenos resultados se han conseguido en un 85-90%.

Lo que permite a los jóvenes accidentados, deportista o no, mantener sus grandes prestaciones o exigencias a las articulaciones lesionadas. Por tanto, con esta técnica de cultivo de cartílago y perfeccionando algunos aspectos de ellas, se ha conseguido una buena respuesta a la tan temida lesión condral y osteocondral, y se puede concluir diciendo, que el proceder terapéutico que vamos a presentar está absolutamente justificado (Lavernia, CJ., 1997) [7].

En este trabajo científico pretendemos exponer el estado actual del cultivo de cartílago autólogo, para reparar lesiones cartilagosas de las articulaciones, bien sea por lesiones postraumáticas o por procesos degenerativos. Los médicos traumatólogos que dedican su actividad profesional a la patología del Aparato Locomotor conocen la cara desagradable de la Meniscectomía total, que causa dolor y derrame, así como cambios artrósicos en la rodilla (figura 19).

Pues bien, les dejamos este mensaje: “hay que salvar el menisco y corregir el defecto osteocartilaginoso, y así evitaremos la evolución frecuente de estas patologías hacia la artrosis” (Guillen, P., 1997) [8].

11.- PRECARIEDAD DE ÓRGANOS

Actualmente hay **precariedad de tejidos y órganos**, y esta irá en aumento con el paso del tiempo, ya que han **disminuido los accidentes de tráfico** y por tanto el número de politraumatizados, fuente importante de órganos para trasplante. Además, ha **aumentado la longevidad del hombre** y este es **menos altruista**. Todo ello hace que podamos paliar esta falta de tejidos y órganos con técnicas como la **ingeniería tisular**. Es esta una **tecnología multidisciplinar** que requiere del apoyo de ciencias tan dispares como la Biología, Bioquímica, Biotecnología, Ingeniería de Materiales o la Informática para alcanzar su objetivo que es el de producir tejidos y órganos para reponer otros enfermos o defectuosos.

Cada 30 segundos muere en el mundo una persona esperando un órgano para ser trasplantado.

En EE. UU. mueren más de 6.000 pacientes al año esperando un órgano y 110.000 están en lista de espera para un trasplante.

Esta precariedad solo la puede resolver la investigación que haga avanzar a la Medicina Regenerativa.

Reemplazar una articulación dañada por una prótesis interna artificial, NO ES MEDICINA REGENERATIVA.

Sustituir la pérdida de la pierna por una prótesis externa, NO ES MEDICINA REGENERATIVA.

En una lagartija si se regenera la cola tras haberla amputado, esto SI ES MEDICINA REGENERATIVA.

Los embriólogos comentan que, en los primeros momentos del periodo embrionario, sanamos nuestras lesiones, pero después esta capacidad regenerativa se pierde.

Tras haber implantado condrocitos autólogos y haber practicado una biopsia al paciente, a los 2 y 5 años, hemos encontrado CHA, esto SI es Medicina Regenerativa, pero cuando a una lesión cartilaginosa le practicamos perforaciones solo se forma fibrocartílago sin colágeno tipo II y esto NO es Medicina Regenerativa (figura 20).

Las tasas mundiales de mortalidad no dejan de disminuir y Naciones Unidas pronostica que la tierra tendrá en el año 2050 en torno a 9.376 millones de habitantes y de este número el 30% tendrá más de 65 años. La revista "Time" en edición americana, el 22 de mayo de 2000 pronosticaba que en el horizonte de los próximos 25 años la profesión más sólida será la **ingeniería tisular** y la segunda, **programadores genéticos** y la décima para los **ingenieros del conocimiento**.

12.- EVOLUCIÓN DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO

Se conoce desde W. Hunter 1783 [9] la nula capacidad de reparación del cartílago dañado y esta evolución ha sido confirmada por muchos estudiosos del CA y que cuando este se repara lo hace con un tejido de reparación que no contiene colágeno tipo II ni otros elementos esenciales del tejido cartilaginoso para seguir protegiendo la articulación.

Así las cosas, la evolución de una lesión aguda del grosor total del cartílago pese a las distintas formas de tratamiento que se han propuesto todos acaban en artrosis y solo el cultivo de condrocitos autólogos rejuvenece la articulación y con este procedimiento médico-investigador llevamos desde 1996 hasta hoy. ¡Veintiséis años! En la figura 19 se muestra la evolución de la artrosis.

13.- MEDICINA REGENERATIVA

La **Medicina Regenerativa** y la **Ingeniería tisular**, hoy por hoy, presentan las mejores credenciales posibles para asumir el desafío que suponen reparar o reemplazar órganos o tejidos enfermos o mermados, bien por el desgaste inherente a la edad, o bien como consecuencia de una determinada patología como la leucemia, la esclerosis múltiple o la regeneración muscular o articular.

Es cierto que son múltiples las patologías asociadas a la edad, como las enfermedades cardiovasculares y las neurodegenerativas, la osteoporosis o la diabetes. Pero afortunadamente también lo son, cada vez más las vías de investigación aplicada que se han abierto, desde el cultivo intensivo de la piel, hasta la terapia génica, pasando por la creación de órganos en laboratorio-granja. También se están aplicando últimamente los xenoinjertos –de cerdo manipulado genéticamente- para resolver la precariedad de órganos. Fig. 20

14.- LA CÉLULA COMO MEDICAMENTO

En nuestro afán por encontrar un tratamiento para estas lesiones focales del cartílago articular, en el año 1995 tuvimos conocimiento en diferentes congresos internacionales a los que asistimos, de que una nueva técnica se estaba realizando en Suecia a manos del Profesor Lars Peterson. En aquel entonces el concepto de terapia celular aún no contaba con la difusión de la que goza en estos momentos, así que ese enfoque de utilizar células para curar una lesión nos pareció en un principio muy atractivo.

Dejando aparte las transfusiones de sangre, que comenzaron a realizarse de modo empírico en el siglo XIX en Inglaterra, curiosamente no para paliar hemorragias sino para alterar el comportamiento del receptor, a finales del siglo XX existían muy pocos ejemplos de terapia celular en el mundo. En el año 1931, el Dr. Paul Niehans (1888-1971) [10] suizo, cirujano, desarrolló el término de **terapia celular** al aplicar con éxito células obtenidas de la glándula paratiroides de un embrión de ternero para reparar en un paciente en estado crítico, la glándula tiroides dañada tras una cirugía. Quizás a finales del siglo pasado la **terapia celular más extendida en el mundo era el trasplante de médula ósea**, aplicada con notable éxito para el tratamiento de cánceres que afectan a las células sanguíneas.

Así pues, en **1995 pusimos rumbo a Goteborg en Suecia** para conocer de primera mano la técnica ideada por el grupo sueco, con todas las esperanzas puestas en este nuevo enfoque para el tratamiento del cartílago articular dañado con células autólogas. Desde nuestra tesis doctoral en la que investigamos con células de embrión de pollo para formar órganos, y lo logramos, siempre pensamos que la célula podría ser un medicamento y hasta reconducirla

una vez dañada a la normalidad. Allí nos encontramos con un lugar frío, donde durante gran parte del año no se puede realizar actividad física al aire libre debido a las condiciones meteorológicas y todo el deporte es “indoor”, es decir, se realiza en recintos cerrados. Este procedimiento fue desarrollado por un equipo multidisciplinar compuesto por cirujanos ortopédicos e investigadores entre los que se encontraban los doctores L. Peterson, M. Brittberg y AH. Lindahl (Suecia) La técnica, en ese primer momento indicada sólo para el cartílago de la rodilla, consistía en dos cirugías: **una primera artroscopia** en la que se **valoraba la lesión** del cartílago y se tomaba una **biopsia** de una zona de no carga de la rodilla y una **segunda cirugía** en la que las **células, una vez aisladas y multiplicadas en el laboratorio, se implantaban en el defecto** utilizando un **fragmento de periostio** tomado de la tibia del paciente, para contener las células en el defecto, a modo de “parche de bicicleta”.

Con dicha técnica bajo el brazo y llenos de ilusión regresamos a España impacientes de aplicarla a nuestro primer paciente, ya que nos parecía la solución al problema de las lesiones focales de cartílago agudas o subagudas. Uno de los puntos claves del procedimiento, dejando a un lado el aspecto quirúrgico, es el cultivo celular.

En esos primeros momentos, solamente el laboratorio del equipo sueco poseía los conocimientos técnicos para realizarlo, así que ellos fueron los primeros a los que enviamos las biopsias de cartílago y desde donde nos devolvían los millones de células para implantar a cada paciente. De este modo comenzamos nuestra andadura en la aplicación de la terapia celular a los problemas de cartílago en el año 1996. En esta primera etapa desarrollada en colaboración con Goteborg, el implante de condrocitos autólogos (ACI) se realizaba en medio líquido, implantando 20 millones de células bajo el parche de periostio. A pesar de la dificultad técnica, nos atrevimos a aplicar este procedimiento en lesiones de tobillo, siendo los primeros en el mundo en realizar un implante de condrocitos en tobillo. (Figura 4)

Entre los años 1996 y 1999 realizamos 152 implantes de condrocitos en medio líquido, 146 rodillas y 6 tobillos, con un 60% - 80% de pacientes con resultados buenos o excelentes. El periostio favorecía la fibrosis y el 20% de los implantados precisaron cirugía artroscópica pues el periostio como tejido vivo autólogo desarrollaba abundantes fibrosis. Tocaba estudiar y evitar el uso del periostio.

El año 1999 es un año clave en el desarrollo de los implantes de condrocitos autólogos. En primer lugar, la compañía alemana de biotecnología Verigen, con sede en la ciudad de Leverkusen (Nordrhein-Westfalen), adquirió la técnica de los cultivos de condrocitos del laboratorio del Dr. Peterson. Ese año fuimos a visitar la sede de Verigen y expresamos por una parte nuestra satisfacción con los resultados del procedimiento, pero nos mostramos disconformes con el hecho de tener que realizar una cirugía tan agresiva que incluía la toma de periostio. Les expresamos la necesidad de desarrollar algún tipo de biomaterial o de

membrana biocompatible que redujera la morbilidad asociada y que por otro lado permitiera la realización del implante por artroscopia. Tomaron nota de nuestra propuesta y al cabo del tiempo nos ofrecieron una solución, incorporando una membrana de colágeno I/III de origen porcino, desarrollada por la empresa suiza Geistlich, que hasta entonces utilizaban de manera habitual los odontólogos y cirujanos maxilofaciales. De esta manera nació la técnica MACI (matrix-Assisted Autologous Chondrocyte Implantation) o implante de condrocitos autólogos en membrana. Exigió mucho intercambio de ideas con el fabricante de la membrana.

15.- ACI-MACI-ICC Y RETAURAR LA ARTICULACIÓN

En el año 2007 nos pusimos en contacto con una empresa de biotecnología de nueva creación, Amplicel, con sede en el Parque Científico de Madrid, en Tres Cantos, para ver si podíamos colaborar en la realización de los cultivos de condrocitos en España, teniendo en cuenta este desajuste en la densidad celular que existía entre ACI y MACI. El primer contacto con los Dres. Elena Rodríguez y Juan Manuel López-Alcorocho, biólogos e investigadores, lo celebramos en nuestra institución (Clínica CEMTRO), donde les pusimos al corriente del problema del tratamiento del cartílago y de cómo la terapia celular era la alternativa más prometedora. Les emplazamos a que asistieran a un congreso de la Sociedad Internacional de Cartílago (ICRS de la cuál soy socio fundador) que se iba a celebrar un mes después en Varsovia (Polonia), donde podrían aprender y familiarizarse con todo lo relacionado con el cartílago articular, desde su histología, características moleculares, hasta los distintos tratamientos disponibles en ese momento y los resultados obtenidos con ellos. En aquel congreso de ICRS presentamos nuestra experiencia y resultados del cultivo de condrocitos autólogos y moderamos la mesa de cultivo de condrocitos.

El equipo de Amplicel se puso manos a la obra para el desarrollo de los cultivos en España y comenzó por estudiar los requerimientos legales de las Agencias Regulatoras. En 2007, cuando empezó con este nuevo proyecto, los implantes celulares estaban considerados como trasplantes de tejidos y la supervisión de los laboratorios de cultivos celulares estaba transferida a las Comunidades Autónomas. De este modo, sólo era necesario un laboratorio con presión positiva, separado del complejo investigador, con control del personal con permiso de acceso, para poder realizar cultivos que pudieran implantar en pacientes. En ese laboratorio construido en Tres Cantos comenzamos a desarrollar nuestro proyecto.

Pensamos que podríamos incrementar la dosis celular aumentando la densidad celular en la membrana, es decir, el número de células por unidad de superficie. Pero ¿cómo podríamos hacerlo? La primera pregunta que debíamos responder era saber la máxima densidad celular que podría soportar la membrana sin saturarse. Para responder a dicha

cuestión realizamos experimentos en las que recortamos sendos fragmentos de membrana de 1 cm², en los que sembramos de 1 a 10 millones de condrocitos [21]. Dichos fragmentos los pusimos en placas de Petri sumergiéndolos en medio de cultivo. Tras esperar 20 minutos, que es tiempo en que tardan las células en adsorberse en la membrana según habían demostrado los fabricantes de la misma, recogimos el medio de cultivo y lo centrifugamos. Esperábamos que en las membranas no saturadas no aparecieran células en el sobrenadante, mientras que en las que tuvieran una cantidad mayor de células de la que la membrana pudiera soportar, aparecieran células en el medio líquido. Comprobamos que a partir de 8 millones aparecerían células en el sobrenadante, por lo tanto, establecimos que una densidad celular idónea podría ser de 5 millones de células por cm² de lesión. Pensamos que el método que deberíamos seguir podría ser el siguiente: una vez expuesta la lesión durante la cirugía, podríamos medirla y estimar el número de células necesario para alcanzar la densidad de 5 millones por cm². A continuación recortaríamos la membrana según el tamaño y la forma de la lesión y depositaríamos todas las células que nos llegarían del laboratorio en forma de suspensión líquida. A esta modalidad le pusimos el nombre de Instant Centrocell (ICC) o HD-ACI (implantes de condrocitos autólogos de alta densidad) y lo patentamos (figura 21).

Lo primero que teníamos que demostrar era el **valor de la densidad celular en el implante de condrocitos**. Para ello contactamos con otra compañía del Parque Científico de Madrid, llamada Vivotecnia, especializada en estudios preclínicos en animales para probarlo en el modelo animal de la oveja. Estudiamos 15 animales que dividimos en tres grupos de 5 animales: a un grupo de 5 animales le implantamos 1 millón de condrocitos (al igual que se hacía en el MACI), a otros 5 se le implantaron 5 millones de condrocitos (la densidad celular del ICC) y en otro grupo de 5 animales se implantaron 5 millones de células madre, que por esos años se estaban ensayando en diversos lugares del mundo. El resultado lo comparamos con microfracturas, una técnica que también en 2007-2008 se estaba utilizando para el tratamiento de las lesiones de cartílago y que consiste en practicar una serie de perforaciones en el hueso subcondral que lleguen hasta la médula ósea, con la esperanza que pasen células progenitoras hasta la lesión de cartílago y promuevan su reparación. Tres meses después de los implantes se estudió el tejido generado en cada uno de ellos, comparándolo con el cartílago normal desde el punto de vista histológico y molecular. Se comprobó que los únicos implantes que eran capaces de replicar el cartílago sano eran en los que se habían empleado condrocitos, a diferencia de las células madre y las microfracturas donde se obtenían solo fibrocartílago. En las figuras 22 a 31 se muestra paso a paso el trabajo de investigación y que publicamos en *Cartilage*. Comprobamos que el tejido más similar al cartílago sano era aquel generado tras implantar 5 millones y de mejor calidad que el que se formaba con 1 millón de condrocitos. Por tanto, este era el formato que

podríamos implantar en los pacientes, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Publicamos el trabajo en el Journal de ICRS, Cartilage los años 2013 y 2017 [11-12].

Tomamos la primera biopsia para el nuevo procedimiento ICC en julio de 2009 y se envió al laboratorio de Tres Cantos para su cultivo. El primer paciente implantado con ICC se realizó en enero de 2010 y fue un paciente con un defecto en el cartílago de la rótula de 25x25 mm. Mientras tanto, la legislación aplicable para la terapia celular en los países del primer mundo, incluida la Unión Europea y por supuesto nuestro país cambió, y la **célula se consideró un medicamento**. El primer efecto fue que el lugar donde se podían cultivar las células era bastante más restrictivo y sólo se podían cultivar en salas blancas en las que se hubiera implantado la norma de calidad GMP o Normas de Correcta Fabricación. En ese momento, comenzamos la construcción de una sala blanca en Clínica CEMTRO y Amplicel pasó a formar parte de nuestra institución. En 2010 se obtuvo la certificación de laboratorio de producción celular de nuestra sala blanca por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, continuando la labor de cultivos que se inició en Tres Cantos. (Fig. 18b).

Desde el año 2010 hasta el momento se han realizado 427 cultivos de condrocitos en nuestra sala blanca, no solo para nuestro centro, sino que también se han cultivado células para otros hospitales españoles. Los resultados obtenidos en rodilla y en tobillo han sido de hasta un 90% de pacientes con buenos o excelentes resultados. De los 427 cultivos realizados, 318 fueron para implantes en rodilla, 105 para tobillo, en 3 casos hemos cultivado condrocitos para implantar en cadera y 1 de muñeca.

Hemos realizado second look en rodilla y tobillo, y el cartílago formado es de mayor riqueza celular y dureza constituyendo una réplica del cartílago original.

16.- INVESTIGACIÓN. ALTA DENSIDAD CELULAR

Era preciso a nuestro grupo investigar con el fin de obtener tras el implante un tejido neoformado de CA no tan blando y de mayor celularidad.

Aunque la segunda generación que era el MACI y la aplicábamos por técnica artroscópica con el artroscopio sin cables, WAD-Dr. Guillén y todo este proceder en 2013 de la mano de Google Glass se retransmitió en directo al mundo entero. Los 5 continentes pudieron ver el trasplante de condrocitos autólogos en una rodilla con el artroscopio sin cables demostrando que el mundo médico no tiene fronteras. Tres meses después repetimos este mismo avance al mundo entero.

En 2009-2015 se llevó a cabo por nuestra unidad de investigación un ensayo preclínico en modelo animal: Oveja. Ensayo de terapia celular para comparar la técnica de microfracturas, células mesenquimales y condrocitos autólogos en el tratamiento de las lesiones del cartílago articular. También se estudió si el aumento de la dosis de condrocitos influye positivamente en los resultados.

En la figura 32 se muestra el estudio histológico después de un Second look, a los 20 meses del implante de condrocitos en rodilla, esto si es Medicina Regenerativa y cartílago articular el tejido neoformado.

Desde el momento que demostramos que con la alta densidad celular el implante resultante es de mayor dureza y números de células, y que por lo tanto se asemeja más al tejido cartilaginoso control, dejamos la técnica MACI y solo realizamos HD-ACI (Hight Density-Autologous Chondrocytes Implantation). No obstante, la técnica MACI se sigue implantando en EE. UU. con buenos resultados a nivel de rodilla, según nuestra técnica. (Fig. 33)

En la figura 34 mostramos nuestra casuística una de las mayores que existen (753 casos) de 1996 a 2023.

Por qué nos inclinamos por la alta densidad, quizá está en nuestro gen de cirujano ortopédico, que siempre queremos más injertos óseos para corregir defectos del hueso y además que el exceso de tejido sano no condiciona problemas y si su falta. Y también en la ciencia manda mucho la intuición. El acto intuitivo es un ejemplo excelente de algo que no es aprendido pero que sigue dependiendo del aprendizaje, adiestramiento, de la práctica, de la formación... Por intuición pensamos entonces cuantas más células mejor y los resultados nos han dado la razón.

De cómo fabricar cartílago funcionante nos vamos a detener un poco por el enorme valor que representa para que un defecto de cartílago reciba células cartilaginosas autólogas en las mejores condiciones (Fig. 35).

La primera generación, ACI (Autologous Chondrocyte Implantation) de 1996 a 2001 con 152 casos y el cultivo de condrocitos autólogos se cubría con periostio del propio paciente siendo el cultivo de condrocitos de forma líquida y con gran cantidad de células. Los resultados fueron buenos, aunque ciertas fibrosis obligaron a segundas cirugías.

La segunda generación, MACI (Membrane Autologous Chondrocyte Implantation) de 2001 a 2009 con 174 casos y esta técnica ha sido aprobada por la FDA en 2016. El cultivo sobre membrana se aplica al defecto cartilaginoso, pero con 1 millón de células (condrocitos cultivados) x cm². El cartílago resultante era de menos células y más blando, aunque con la

gran ventaja de que la técnica se podría aplicar por artroscopia. No nos sentíamos felices con la “pobreza celular resultante” aunque los resultados clínicos habían mejorado.

La tercera generación, HD-ACI o HD-ICC también llamada por nosotros técnica ICC (Instant Chondrocyte CEMTRO) la aplicamos desde el 2010 al 2023 con 427 casos. Esta técnica ha sido ideada en nuestro hospital. El cultivo de condrocitos autólogos sobre membrana es ahora de 5 millones de células x cm². Los resultados clínicos han mejorado hasta un 95% de buenos resultados.

La cuarta generación con células alogénicas (2018) es un trabajo de investigación llevado a cabo en nuestra clínica CEMTRO por la unidad de investigación y en el que tenemos puesta todas nuestras esperanzas por ser el cartílago un tejido privilegiado desde el punto de vista inmunológico al no tener vasos, ni nervios ni linfáticos. Además, esta técnica alogénica evitaría la primera cirugía de toma de biopsia de cartílago y las células estarían siempre disponibles en el departamento de investigación y quirófano para su aplicación inmediata. Además, esta técnica resultaría de menos coste.

La quinta generación (2019) nacida tras la reprogramación celular de Shinya Yamanaka (Nobel de Medicina 2012) se está llevando a cabo la investigación en nuestra unidad de clínica CEMTRO y pretendemos reconducir al condrocito dañado, por lesión o por degeneración o artrosis a la normalidad. Yamanaka demostró que es posible reprogramar células ya diferenciadas -adultas- y devolverlas así a un estado propio de las células pluripotentes. El sabio japonés había rejuvenecido la célula aplicando los 4 factores llamados de Yamanaka. Sus publicaciones en Nature, Science y Cell demuestran su gran hazaña investigadora-científica. ¡Qué gran logro! [19].

17.- INVESTIGACIÓN. ALTA DENSIDAD CELULAR

Quinta generación. Reprogramación celular. IPS. Reconducir los condrocitos dañados. En investigación.

Nuestros esfuerzos investigadores se han centrado en las patologías que afectan el aparato locomotor. Para profundizar tanto en los mecanismos subyacentes como en la búsqueda de posibles soluciones terapéuticas, comenzamos nuestra colaboración con el Profesor Juan Carlos Izpisua, del Laboratorio de Expresión Génica del Salk Institute de California (1910) y en los dos últimos años con Altos Labs en USA.

La primera de estas nuevas dianas terapéuticas en las que este grupo ha mostrado su interés la constituye una enzima conocida como DNA metiltransferasa 3b (Dnmt3b). El interés se despertó tras la publicación de un trabajo por parte de Shen y cols. [13] en el que se

demostraba que los niveles de esta enzima estaban aumentados en sujetos sanos y en cambio estaban más bajos en pacientes con artrosis.

Otra diana interesante en la que se puede incidir es la proteína DGCR8. Recientemente, el grupo de Izpisua con nuestra colaboración ha publicado un artículo en el que se demuestra que esta proteína, implicada en la regulación de la expresión génica a través del procesamiento de los micro-RNAs, posee una función alternativa que consiste en la estabilización de la heterocromatina [14].

Los autores demuestran que la proteína DGCR8 (Di George Syndrome Critical Region 8) se une a la heterocromatina a través de diversas proteínas entre las que se encuentra la proteína Lámina B, que forma parte de los filamentos intermedios de la envuelta nuclear (Fig. 36 a-b).

La heterocromatina está constituida por zonas del ADN más compactadas, que se tiñen más intensamente que el resto y que corresponden a genes que no se pueden expresar dado el alto grado de compactación de la estructura.

Se conocía que a medida que avanza el envejecimiento, la heterocromatina se desorganiza y se comienzan a expresar genes que no deberían en un tipo celular determinado e incluso genes nocivos como pueden ser oncogenes.

En este estudio se demuestra en el modelo del ratón, que la artrosis está relacionada con desorganización de la heterocromatina a través del descenso en la expresión de DGCR8. Por tanto, el objetivo de una terapia génica sería utilizar un sistema similar al comentado para la diana anterior, con el que conseguir aumentar los niveles de DGCR8 en el interior de la célula.

En otro estudio publicado también recientemente [15], el grupo de Izpisua demuestra que la activación del factor de transcripción FOX-D1 por la proteína YAP alivia la senescencia y la artrosis. Ambas proteínas tienen un papel significativo en la homeostasis celular y se ha comprobado en un modelo de ratón al que se le ha provocado una artrosis, que el aumento de la expresión de estas proteínas alivia los efectos de la artrosis en la articulación. Este es por tanto un caso muy similar a los dos anteriores basado en el desarrollo de un sistema de terapia génica para aumentar la expresión de unas proteínas determinadas.

Otra aproximación para el tratamiento de la artrosis se basa en la reprogramación parcial del condrocito. La hipótesis parte de un trabajo publicado en 2016 por el grupo de Izpisua y Guillén [16] y en el que se demuestra que es posible la reprogramación in vivo de un animal, el ratón en este caso, para aliviar los efectos de enfermedades relacionadas y asociadas al envejecimiento.

Los autores utilizaron un modelo de ratón con progenia y comprobaron que la expresión por pulsos de los factores de Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc: OSKM) es capaz de revertir los efectos de la edad en estos animales e incluso aliviar enfermedades como la retinosis pigmentaria.

Y, por último, en un trabajo publicado en marzo 2020 [17], por nuestro grupo, se ha comprobado que en modelos de artrosis en rata que los niveles de la proteína α KLOTHO y de la forma soluble del receptor del factor de crecimiento transformante β (sTGF β R2) están disminuidos (Fig. 37).

Así pues, la estrategia sería similar al descrito en las otras ocasiones: desarrollar un sistema de terapia génica con el fin de aumentar la expresión de ambas proteínas mediado por virus atenuados.

En resumen, en estos momentos existen pruebas de concepto para el tratamiento de la artrosis con terapia génica desde numerosas perspectivas. Es cuestión de tiempo y de inversión de recursos suficientes que alguno o todos estos sistemas cristalicen en una terapia eficaz para el tratamiento de una enfermedad que desgraciadamente padece un gran número de personas en el mundo.

No podemos aventurar por el momento si este tratamiento se basará en uno de los sistemas descritos a lo largo de este capítulo o en efecto sinérgico de varios de ellos o por el contrario las investigaciones conducen al desarrollo de otro sistema completamente distinto mucho más efectivo.

Lo cierto es que en estos momentos el condrocito enfermo, artrósico, está acosado o sitiado por muchas líneas de investigación que más pronto que tarde convergerán en una terapia para aliviar una enfermedad asociada al envejecimiento, cuya prevalencia, al menos en nuestro país, va aumentando debido al envejecimiento de la población.

18.- LA CURACIÓN, DE LA ARTROSIS, MÁS CERCA

Nuestra última publicación demuestra que cada vez estamos más cerca de rejuvenecer el cartílago dañado según el trabajo publicado en noviembre de 2023 en Cell Stem Cell [18].

Detección de activación CRISPR de todo el genoma en las células senescentes revelan que SOX5 es un conductor y objetivo terapéutico de rejuvenecimiento (12/X/23) (Fig. 38)

- El cribaje con CRISPa identifica un conjunto de genes con efectos rejuvenecedores frente al envejecimiento.

- La activación de SOX5 promueve el programa de rejuvenecimiento a través del remodelado epigenético.
- SOX5 posee efectos anti-envejecimiento.
- La terapia génica utilizando SOX5 promueve la regeneración de las articulaciones de rodillas envejecidas.

19.- AGRADECIMIENTOS Y EPÍLOGO

Como epílogo podemos asegurar, dentro de la certeza que se adorna la investigación, que estamos cerca de reconducir la célula dañada a la normalidad no solo en la artrosis, actuando sobre el condrocito degenerado, sino también en otros tejidos del cuerpo humano lo que supondría que rejuvenecemos estas estructuras.

Con más de 26 años aplicando cultivos de condrocitos autólogos en lesiones focales del cartílago articular, podemos aseverar que ha nacido una nueva era para rejuvenecer la articulación lesionada. En la figura 39 mostramos la técnica ICC paso a paso en una lesión cartilaginosa de la rótula.

Sin perjuicio de los continuos progresos, la enfermedad siempre acechará a la vida del “homo sapiens”, o ¿es que acaso podría escaparse de la enfermedad?

En un alarde de predicción solo hay dos maneras de librarse de la enfermedad, una dejando de ser hombre y otra dejando de estar vivo.

La investigación e innovación tecnológica aplicada a la ciencia en beneficio de la sociedad y al servicio de la medicina, la salud y el bienestar de las personas es uno de los retos más hermosos a los que bien merece la pena que dediquemos nuestros esfuerzos.

En esta cuna de la sabiduría comprometido con la “ciencia” deseo hacer un homenaje a la amistad, recurriendo al aforismo latino, “*sine amicitia vitam esse nullam*” que significa “La vida sin amigos es inútil”, con lo que quiero expresar mi agradecimiento a la junta directiva de la RAD.

Y acabo con un recuerdo agradecido a cuantos me ayudaron en mi formación humana, médica y ortopédica y sobre todo a aquellos maestros que me enseñaron lo que no está en los libros.

Y termino con una predicción y un alegato. La predicción es que espero ver pronto “curar la enfermedad sin parar el motor del hombre”, y un alegato, que estamos comprometidos con la investigación e innovación como motor del progreso.

Agradezco de todo corazón la distinción que me ha concedido la Real Academia de Doctores de España de Académico de Honor y espero responder a cuantos deberes se deriven de tan alto honor. Gracias querido presidente Prof. Antonio Bascones y también gracias a los Excelentísimos Miembros de la RAD que tuvieron la generosidad de postular mi nombre. Gracias, querido Prof. José Antonio Rodríguez Montes por su excelente y sentido Laudatio.

20.- REFERENCIAS

1. JIMÉNEZ COLLADO, J; GUILLÉN GARCÍA, P; SOBRADO PÉREZ, J. “Rodilla: Morfogénesis, Anatomía Clínica, Vías de Acceso”. Edit. Mapfre. 1994
2. GUILLÉN GARCÍA, P. El Condrocito, una oportunidad terapéutica en traumatología y cirugía ortopédica. 2013.
3. GUILLÉN GARCÍA, P. Defectos condrales: tratamiento con implante de condrocitos cultivados (ICA). Edi. Mapfre, SA. 1997. Vol. 48: págs. 519-538
4. ALTMAN, RD. Et al. Practice guidelines in the management of osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage. 1998. Vol. 6; págs. 22-24
5. J. B. SUTTON. “Ligaments. Nature and Morphology”. Forgotten Book. 1785. London
6. GUILLÉN GARCÍA, P. (1997), “Defectos condrales: tratamiento con implante de condrocitos cultivados (ICA)”. Ed. Mapfre, S. A. 1997. VI-48: págs. 519-538.
7. LAVERNIA, C. J.; GUZMÁN, J. F.; GACHUPIN GARCÍA, A. (1997), “Cost-effectiveness and quality of live of life in knee arthroplasty.” Clin. Orthop.; 345: págs. 134-139.
8. GUILLÉN GARCÍA, P. (1997),” Genufonia (Lenguaje de la rodilla)”. Anales de la Real Academia Nacional de Medicina. Tomo CXIV, Cuaderno Primero: págs. 169-190. Madrid.
9. HUNTER, W. (1743), “On the structure and diseases of articulating cartilages.” Philos Trans R. Soc Lond B. Biol Sci; 42 (B): 514-521.
10. NIEHANS, PAUL. Introduction to Cellular Therapy. Pagean Books, NY. 1960
11. GUILLÉN GARCÍA, P; RODRÍGUEZ-IÑIGO, E; GUILLÉN VICENTE, I; CABALLERO SANTOS, R; GUILLÉN VICENTE, M; ABELOW, S; GIMÉNEZ GALLEGO, G; LÓPEZ ALCOROCHO, JM. Increasing the Dose of Autologous Chondrocytes Improves Articular Cartilage Repair: Histological and Molecular Study in the Sheep Animal Model. Cartilage. 2013 Vol. 5(2) 114-122
12. LÓPEZ ALCOROCHO, JM; ABOLI, L; GUILLÉN VICENTE, I; RODRÍGUEZ IÑIGO, E; GUILLÉN VICENTE, M; FERNÁNDEZ JAÉN, T; ARAUZ DE ROBLES, S; ABELOW, S; GUILLÉN GARCÍA, P. Cartilage Defect treatment using high-density autologous chondrocyte implantation: Two-year follow-up. Cartilage. 2017 1-7.
13. JIE SHEN, CUICUI WANG, DAOFENG LI, TAOTAO XU, JASON MYERS, JOHN M. ASHTON, TING WANG, MICHAEL J. ZUSCIK, AUDREY MCALINDEN, AND REGIS J. O’KEEFE. *DNA*

- methyltransferase 3b regulates articular cartilage homeostasis by altering metabolism.* JCI Insight. 2017 Jun 15;2(12) pii: 93612. Doi: 10.1172/jci.insight.93612
14. DENG L, REN R, LIU Z, SONG M, LI J, WU Z, REN X, FU L, LI W, ZHANG W, GUILLÉN P, IZPISUA BELMONTE JC, CHAN P, QU J, LIU GH. *Stabilizing heterochromatin by DGCR8 alleviates senescence and osteoarthritis.* Nat Commun. 2019 Jul 26;10(1):3329 doi: 10.1038/s41467-019-10831-8
 15. FU L, HU Y, SONG M, LIU Z, ZHANG W, YU FX, WU J10, WANG S, IZPISUA BELMONTE JC, CHAN P, QU J, TANG F, LIU GH. *Up-regulation of FOXD1 by YAP alleviates senescence and osteoarthritis.* PLoS Biol. 2019 Apr 1;17(4):e3000201. Doi:10.1371/journal.pbio.3000201
 16. OCAMPO A, REDDY P, MARTÍNEZ-REDONDO P, PLATERO-LUENGO A, HATANAKA F, HISHIDA T, LI M, LAM D, DURITA M, BEYRET E, ARAOKA T, VAZQUEZ-FERRER E, DONOSO D, ROMÁN JL, XU J, RODRÍGUEZ ESTEBAN C, NUÑEZ G, NUÑEZ DELICADO E, CAMPOSTOL JM, GUILLÉN I, GUILLÉN P, IZPISUA BELMONTE JC. *In vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming.* Cell. 2016 Dec 15;167(7):1719-1733.e12. doi:10.1016/j.cell.2016.11.052
 17. MARTÍNEZ-REDONDO P, GUILLÉN-GUILLÉN I, DAVIDSHON N, WANG C, PRIETO J, KURITA M, HATANAKA F, ZHONG C, HERNÁNDEZ-BENITE R, HISHIDA T, LEZAKI T, SAKAMOTO A, NEMETHA AN, HISHIDA Y, RODRÍGUEZ ESTEBAN C, SHOJIMA K, HUANG L, SHOKHIREV M, NUÑEZ-DELICADO E, CAMPISTOL JM, GUILLÉN-VICENTE I, RODRÍGUEZ ÍÑIGO E, LÓPEZ-ALCOROCHO JM, GUILLÉN-VICENTE M, GUILLÉN GARCÍA P, CHURCH G, REDDYA P, IZPISUA BELMONTE JC. *α KLOTHO and sTGF β R2 treatment counteract the osteoarthritic phenotype developed in a rat model.* Protein Cell 2020 Mar;11(3):219-226. Doi:10.1007/s13238-019-00685-7.
 18. JING, Y; JIANG, X; JI, Q; WU, Z, WANG, W; LIU, Z; GUILLÉN GARCÍA, P; RODRIGUEZ ESTEBAN, C; REDDY, P; HORVATH, S; LI, J; GENG, L; HU, Q; WANG, S; IZPISUA BELMONTE, JC; REN, J; ZHANG, W; QU, J; LIU GH. *Genome-wide CRISPR activation screening in senescent cells reveals SOX5 as a driver and therapeutic target of rejuvenation.* Cell Stem Cell, 2023. Vo.13 (11):1452-1471.
 19. TAKAHASHI, K; YAMANAKA, S. *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.* Cell, 2006. 126: 663-676.

21.- FIGURAS

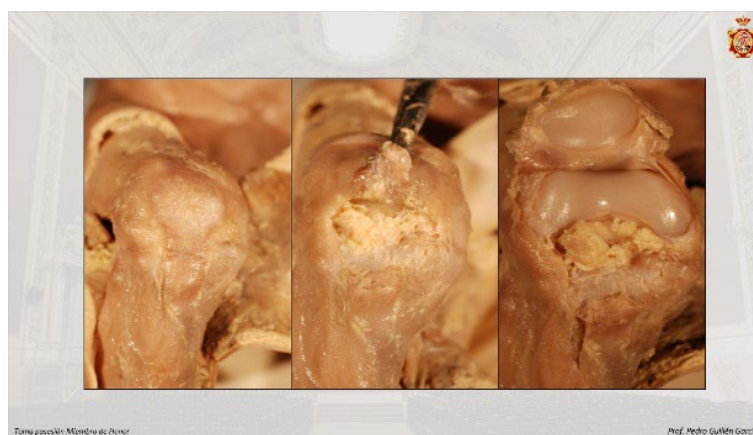
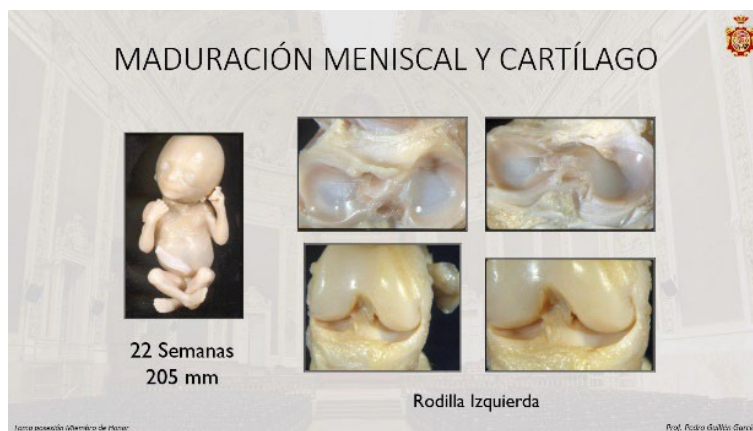


Fig. 1a

Fig.1b

Fig. 1 a-b: El color blanco brillante del cartílago de feto de 22 semanas 205 mm por carecer de riego sanguíneo, figura 1a. En la figura 1b el movimiento articular y el líquido sinovial va impregnando al cartílago de un color menos blanco.



Fig. 2: Se muestran las distintas fases del desarrollo embrionario y fetal de la articulación de la cadera.



Fig. 3: Líquido sinovial (LS) extraído de una rodilla lesionada que “llora” LS amarillento y poco viscoso. Debemos secar la producción de LS pues estas sinovitis acaban en severas condropatías, artrosis.



Fig. 4: Tobillo al que le implantamos condrocitos autólogos cultivados en 1996 y que a los 28 años sigue asintomático y con normal arco de movilidad.



Fig. 5a



Fig. 5b

Fig. 5 a la fractura de cúbito ha consolidado, pero con acortamiento y rotación. La fractura no fue bien reducida y guarda la memoria de un mal tratamiento. Figura 5b hueso de fémur del hombre de Java (cien mil años) que guarda todavía la patología que sufrió. ¡solo el hueso guarda sus patologías a la posteridad

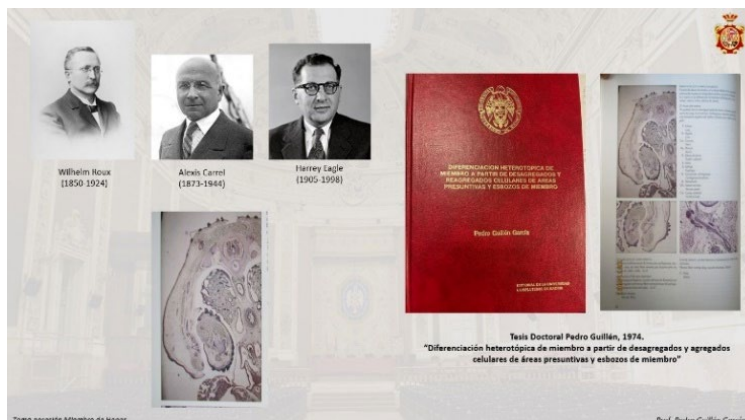


Figura 6. Distintos autores que estudiaron las células, las cultivaron y multiplicaron en cultivos. Nuestra tesis en la que trasplantamos células en embrión de pollo para obtener órganos.



Figura 7. Imágenes de condrocitos en el tejido cartilaginoso articular y características del mismo.



Fig:8: Fotos de la Meniscoteca (1976-1980) compuesta por 120 meniscos con diferente lesión.

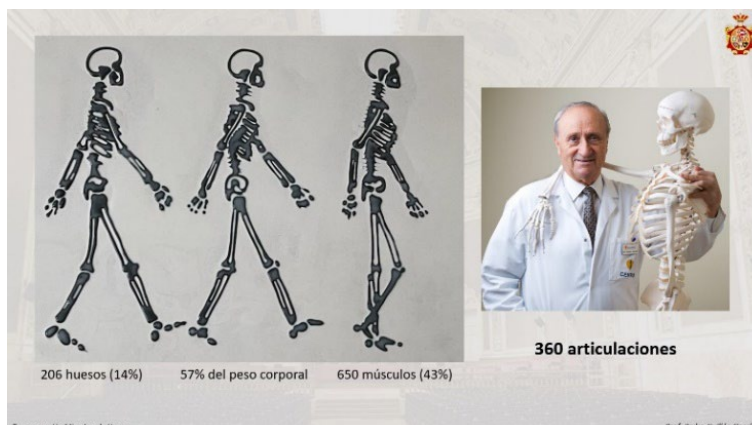


Fig. 9: Peso del Aparato Locomotor y número de articulaciones (360)

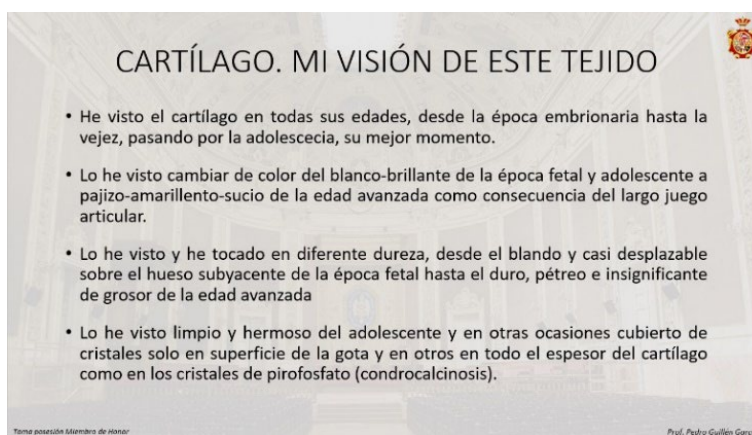


Fig. 10: Algunos aspectos externos del CHA



Fig. 11: Respuesta del cartílago a la carga.



Fig. 12: Grosor del cartílago en distintas articulaciones.



Fig. 13: Grosor del cartílago y factores que lo determinan.



Fig. 14: Lesiones del cartílago antes de aplicar los implantes de condrocitos autólogos cultivados.

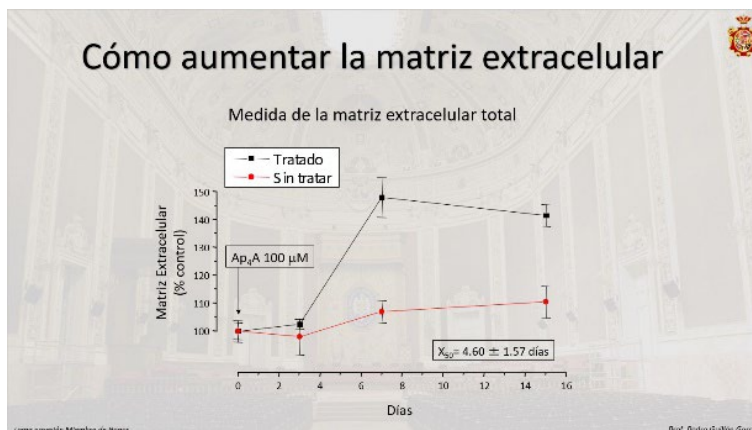


Fig. 15a

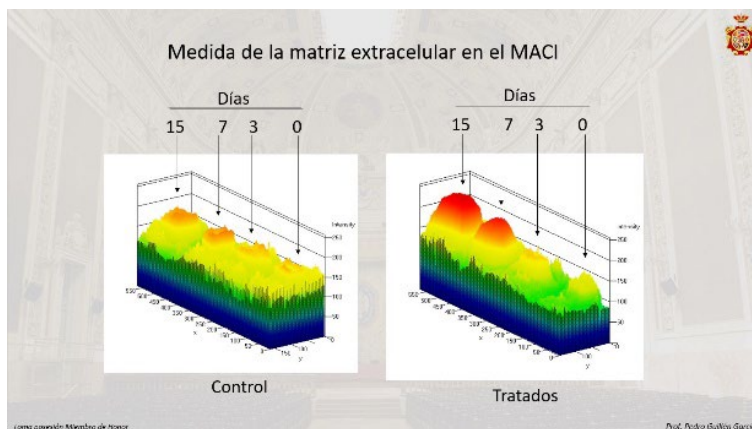


Fig. 15b

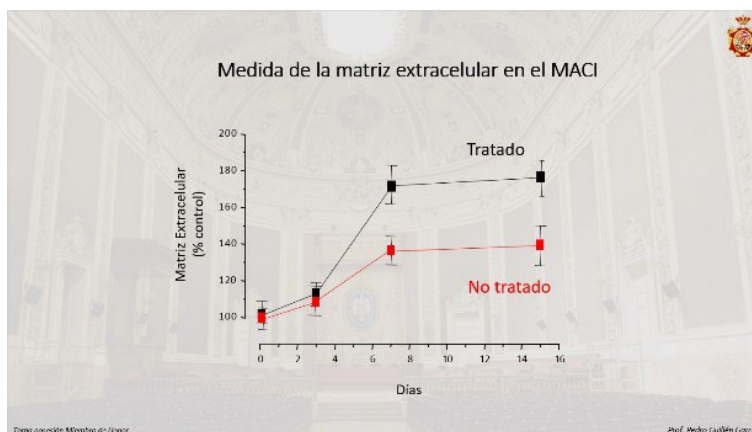


Fig. 15c

CONCLUSIONES

- 1.- El número medio de células en el MACI es de 21.000.000
- 2.- El tratamiento del MACI con Ap_4A incrementa un 150 % la producción de la matriz extracelular (sustancia fundamental) tanto en el MACI intacto como en el MACI “exprimido”.

Como poseedor Membro de Honor Prof. Pedro Guillén García

Fig. 15d

Fig. 15 a-b-c-d: aplicación del AP4A en el MACI que incrementa la matriz extracelular

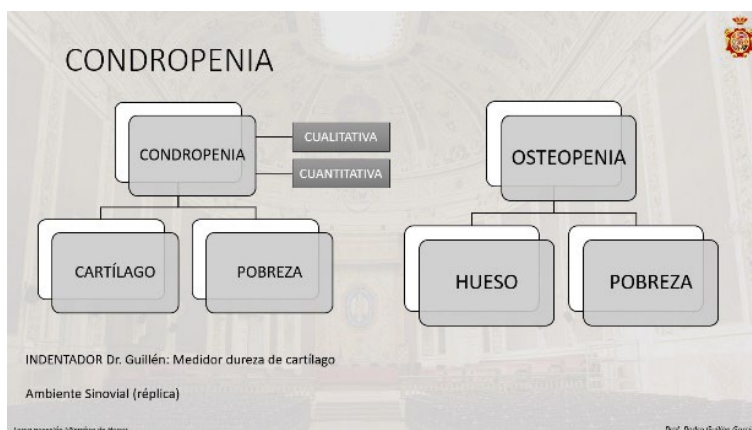


Fig. 16a

CONDROPENIA

- Cartílago empobrecido
- Buscar algún parámetro del líquido sinovial
- Condropenia: Cualitativa y cuantitativa

Como poseedor Membro de Honor Prof. Pedro Guillén García

Fig. 16b



Fig. 16c

Fig. 16 a-b-c: Condropenia definición y condropenia cualitativa y cuantitativa.



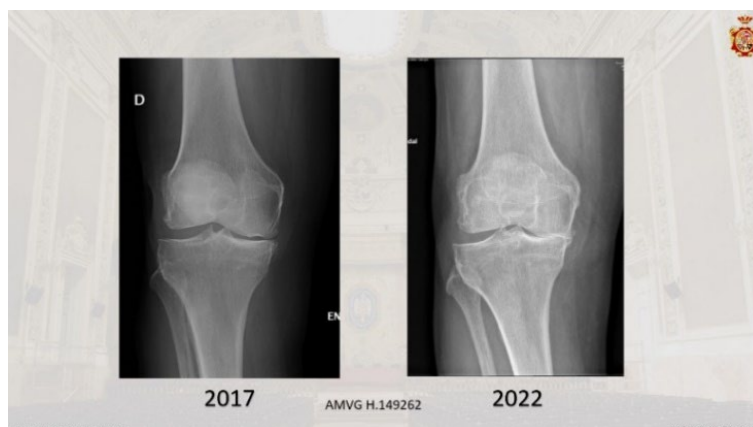
Fig.17a

Fig.17b

Fig. 17 a-b: 17a estudios histológico del implante de cartílago a los 18 meses que muestra su regeneración. 17b otro estudio histológico tras años de ser implantados.



Fig. 18 a-b: En a se muestran las terapias consolidadas y en b la autorización de la AEMPS



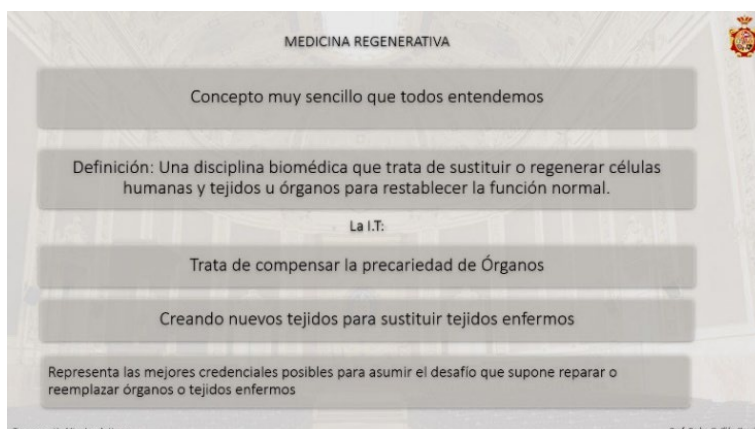


Fig. 20: Concepto de Medicina Regenerativa.

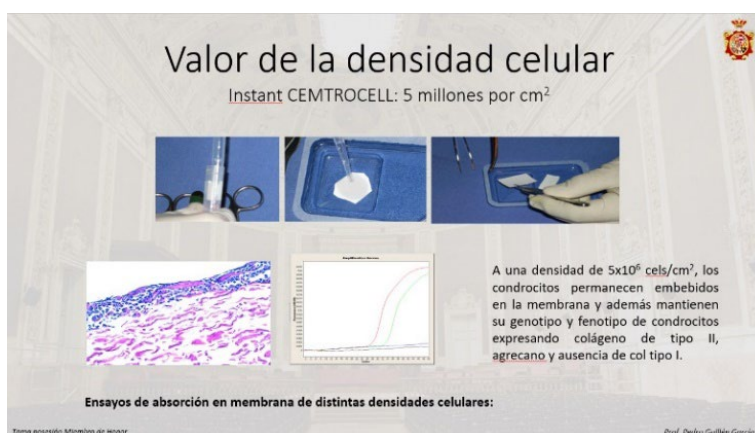


Fig. 21: Valor de la densidad celular y desde entonces se aplican 5 millones de condrocitos por cm^2

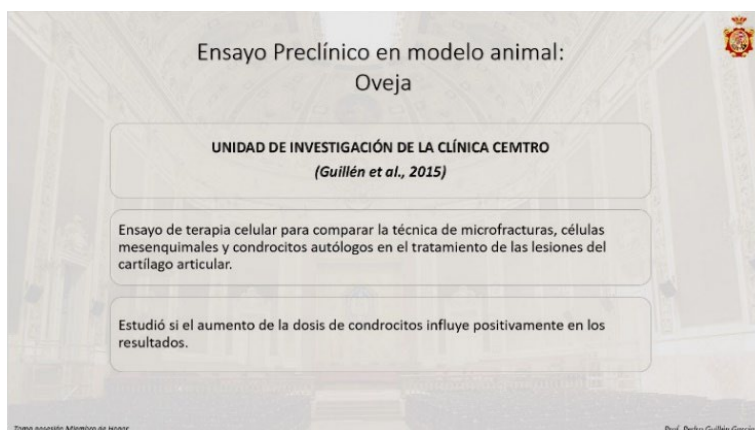


Fig. 22

Diseño Experimental

MODELO ANIMAL: • Oveja de raza Manchega

TAMAÑO MUESTRAL: • 15 animales (hembras de 2-3 años)

DOS CIRUGÍAS:

- 1ª cirugía: provocar lesiones en tróclea y cóndilo y toma de tejido para obtención de células
- 2ª cirugía: tratamiento de las lesiones con implantes celulares

En los tres grupos se comparó la eficacia de los **IMPLANTES** frente a las **MICROFRACTURAS**

Toma posesión Miembro de Honor Prof. Pedro Guillén García

Fig. 23

Diseño Experimental:

1ª CIRUGÍA
A CADA ANIMAL : DOS DEFECTOS (aproximadamente 1 cm²)

1. Surco troclear: se tratarán con microfracturas
2. Cóndilo femoral interno: se tratarán con implantes celulares:
 - Grupo 1: 1 millón condrocitos autólogos
 - Grupo 2: 5 millones condrocitos autólogos
 - Grupo 3: 5 millones células mesenquimales

2ª CIRUGÍA:
Tratamiento de las lesiones: Implantes celulares

Toma posesión Miembro de Honor Prof. Pedro Guillén García

Fig. 24

Diseño Experimental

TRES MESES DESPUÉS DE LOS IMPLANTES,
SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRA

Estudio histológico: Integración del implante en el cartilago circundante y arquitectura de tejido formado

Estudio molecular: Grado de "condrogenización" de las células implantadas (expresión génica por PCR de agregcano, Col II y Col I).

Toma posesión Miembro de Honor Prof. Pedro Guillén García

Fig. 25

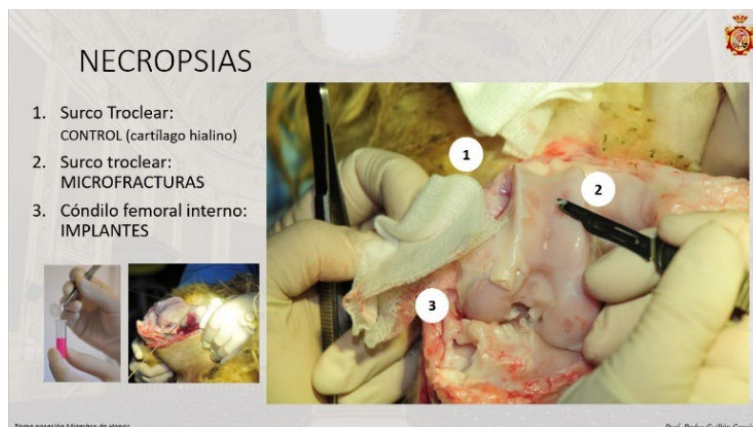


Fig. 26

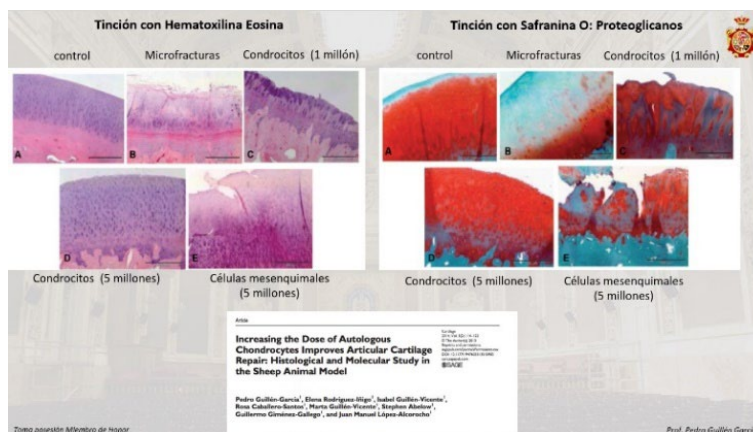


Fig. 27

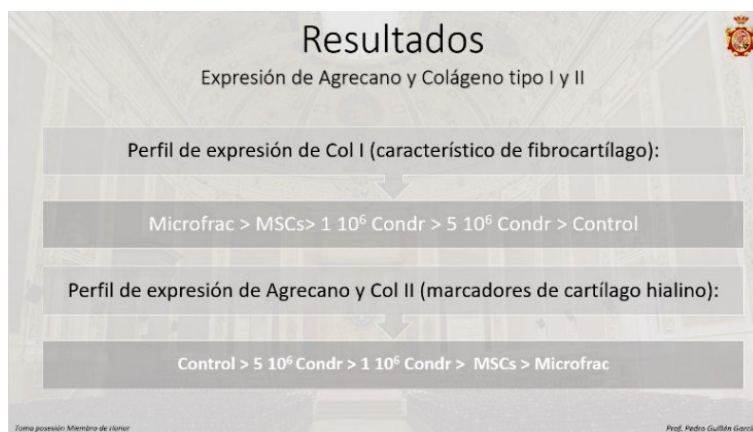


Fig. 28

1 • El tejido formado por los implantes celulares es mejor en cuanto a composición, estructura y viabilidad celular, que el formado por las microfracturas, donde incluso se ve tejido fibroso

2 • Los implantes de condrocitos regeneran un tejido cartilaginoso más similar al cartilago hialino que los implantes con células mesenquimales, donde aparece mayoritariamente tejido fibrocartilaginoso

3 • El aumentar cinco veces la densidad de condrocitos mejora significativamente la calidad del tejido regenerado

LA TERAPIA CON CONDROCITOS ES LA UNICA QUE REPLICA AL CARTILAGO HIALINO

Toma posesión Membro de Honor Prof. Pedro Guillén García

Fig. 29

Resultados de experimentos con animales.
HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

MICROFRACTURAS
Nuevo tejido IS fibrocartilago con fibroblastos jóvenes

CÉLULAS MESENQUIMALES
Fibrocartilago con algunos fibroblastos maduros

IMPLANTE DE CONDROCITOS
(5 millones / 1 millón)
La mayor parte del hialino nuevo tejido es cartilago

CONTROL
Cartilago hialino normal

Toma posesión Membro de Honor Prof. Pedro Guillén García

Fig. 30

Valor de la densidad celular

Ensayo Preclínico:
En modelo animal ovino de la efectividad del aumento de la dosis celular en el implante
(Guillén García et al, 2015)

La terapia celular con 5 millones de células por cm2 mejora significativamente los resultados de la técnica produciéndose un cartilago hialino de mayor celularidad: ICC

Toma posesión Membro de Honor Prof. Pedro Guillén García

Fig. 31

Figuras 22 a 31: En las figuras 22 a 31 se explican los detalles de la investigación animal que realizamos para demostrar que la alta densidad celular mejora el resultado de los implantes de condrocitos autólogos.



Fig. 32: Se ve la normal regeneración del cartilago

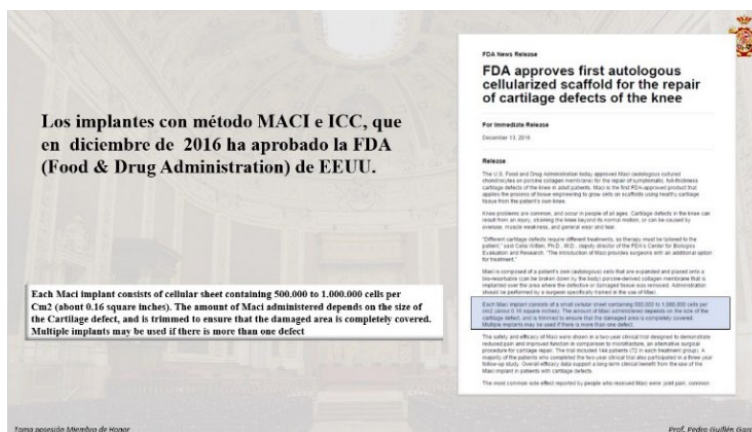


Fig. 33: La aprobación de la FDA de EEUU de la técnica MACI en 2016 y que se practica con normalidad.



Fig. 34: Mostramos nuestra casuística de ACI, MACI e ICC (HD)

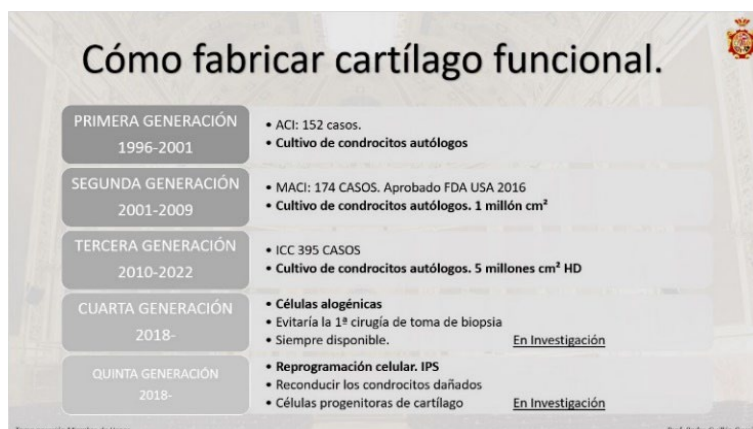


Fig. 35: Muestra la figura los pasos que hemos utilizado para formar cartílago funcional.

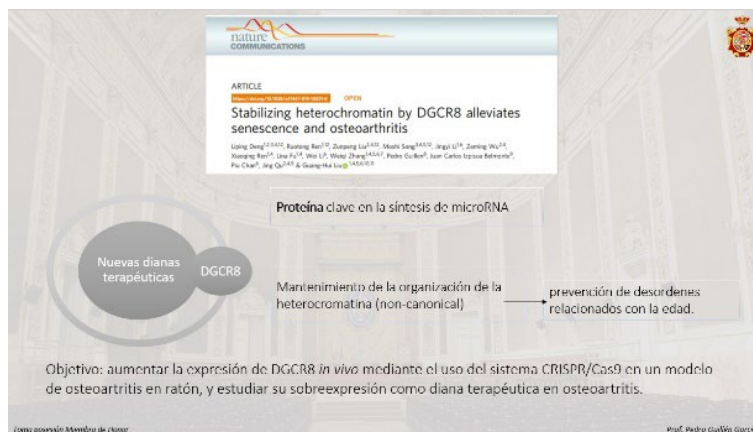


Fig. 36a

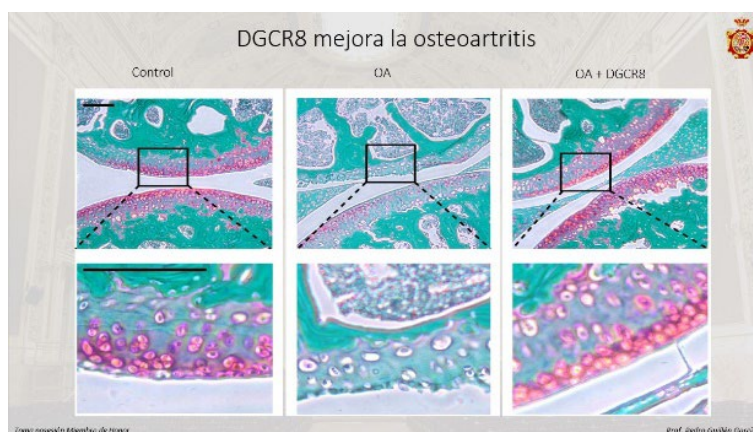


Fig.36b

Fig. 36 a-b: La aplicación del DGCR8 mejora la artrosis en ratones.

Nuevas dianas terapéuticas

- TGFβ
- Klotho

- Tiene un papel muy importante en el metabolismo del condrocito
- Está presente a elevadas concentraciones en el cartilago sano.
- Inhibe la hipertrofia del condrocito (ayuda a mantener niveles estables de Sox9 and Col2A)

- Con la edad su nivel en suero está disminuida. Esta disminución se observa en pacientes con enfermedades asociadas con la edad, como es la osteoartritis.

Paciente sano	Paciente con Osteoartritis
Niveles normales de TGFβ y Klotho	Niveles disminuidos de TGFβ y Klotho

Objetivo:
Aumentar los niveles de TGFβ y Klotho a nivel articular

Deng, J.C. Izpisua, P. Guillén, Nature 2019

Fig. 37: Mostramos como se aplica la molécula a KLOTHO en ratones y revierte la artrosis.

Cell Stem Cell Artículo

2 noviembre 2023

Genome-wide CRISPR activation screening in senescent cells reveals SOX5 as a driver and therapeutic target of rejuvenation

Key findings:

- CRISPR activation identifies a comprehensive set of rejuvenation-related genes
- Activation of SOX5 abates the senescence program through epigenetic remodeling
- SOX5 activates the MYC5B pathway for telomerase upregulation in senescent cells
- Gene therapy utilizing SOX5 alone can promote the regeneration of aged knee joints

- El cribado con CRISPR identifica un conjunto de genes con efectos rejuvenecedores frente al envejecimiento
- La activación de SOX5 promueve el programa de rejuvenecimiento a través del remodelado epigenético
- SOX5 posee efectos anti-envejecimiento
- La terapia génica utilizando SOX5 promueve la regeneración de las articulaciones de rodillas envejecidas.

Fig. 38: En este trabajo de investigación demostramos que el SOX5 goza de propiedades anti-envejecimiento.

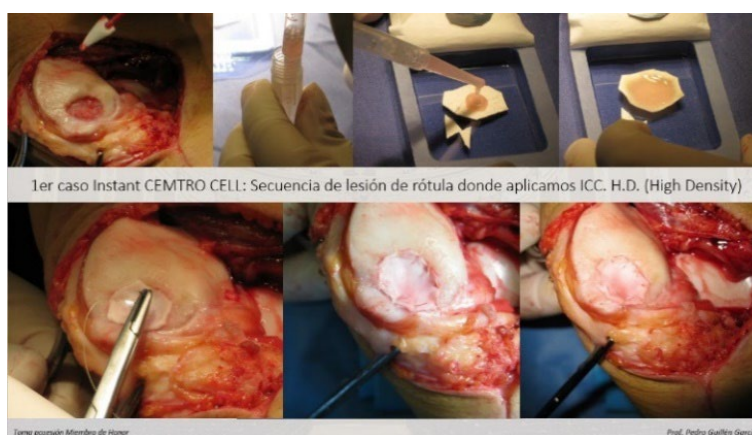


Fig. 39: Caso clínico: Técnica quirúrgica del ICC en una lesión de rótula, paso a paso, que acabó curando la lesión. Se logró una rodilla más joven a base de condrocitos autólogos cultivados.