

INVESTIGACIÓN

Reparación de defectos condrales de rodilla con implantes de condrocitos autólogos cultivados: estudio experimental en cerdos

JORGE GENOVESE*, MIGUEL PUIGDEVALL, DANIEL MUDROVICI*, JUAN JOSÉ D'ALLAGLIO*, HUGO SCIPIONE**
y FERNANDO ROLDÁN*

*División Bioingeniería, CRAVERI S.A.I.C, **Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires

RESUMEN

Introducción: En la actualidad, han cobrado relevancia nuevas técnicas de ingeniería de tejidos para la reparación de lesiones condrales. Una de estas técnicas se basa en el uso de condrocitos autólogos expandidos in vitro e implantados en el defecto condral. El objetivo de este trabajo fue evaluar en un modelo animal la reparación de defectos condrales tratados con un implante de condrocitos autólogos cultivados, las características macro y microscópicas del tejido de reparación, y la calidad del tejido de reparación en función del tiempo transcurrido desde su implante.

Materiales y métodos: Para el estudio se utilizaron 6 cerdos entre 2 y 4 meses de edad. Fueron operados en dos oportunidades: primero: defecto para cultivo de cartílago y segundo: defecto con injerto autólogo cultivado. Se estudió el tejido de reparación resultante a los 15 días, y a los 1, 3, 4 y 6 meses de realizado el implante.

Resultados: Las biopsias mostraron la curación de los defectos condrales con la formación de un tejido de reparación con características macro y microscópicas similares a las del cartílago hialino articular. La calidad de este tejido de reparación fue mejor cuanto más tiempo había transcurrido entre la realización del implante y la eutanasia del animal.

Conclusiones: Sobre la base de estos resultados concluimos que el implante de condrocitos autólogos aislados y expandidos in vitro parecería ser una opción terapéutica válida para el tratamiento de las lesiones focales y aisladas del cartílago articular.

PALABRAS CLAVE: Condrocitos. Cultivo. Autólogo. Ingeniería de tejidos.

REPAIR OF CHONDRAL DEFECTS OF THE KNEE WITH CULTURED AUTOLOGOUS CHONDROCYTES: EXPERIMENTAL STUDY IN PIGS

ABSTRACT

Background: Presently, new tissue engineering techniques have become relevant to repair chondral lesions. One of them uses autologous chondrocytes expanded in vitro and implanted in the chondral defect. The goal of this study was to assess in an animal model the repair of chondral defects with the implantation of cultured autologous chondrocytes; the macro and microscopic characteristics of the repair tissue, and its quality as a function of the time elapsed since the implantation.

Methods: Six pigs between 2 and 3 months old were used for the study. They were operated twice, first: defect to grow the cartilage and second: defect with cultured autologous graft. The resulting repair tissue was studied at 15 days, 1, 3, 4 and 6 months after the implantation.

Results: The biopsies showed the healing of the chondral defects through the formation of a repair tissue whose macro and microscopic features were similar to those of the hyaline articular cartilage. The quality of the repair tissue improved as a function of the time between the implantation and the pig's euthanasia.

Conclusions: On the basis of such results we concluded that the implantation of autologous chondrocytes isolated and expanded in vitro appears as a valid therapeutic option to treat articular cartilage focal and isolated lesions.

KEY WORDS: Chondrocytes. Culture. Autologous. Tissue engineering.

Las lesiones traumáticas, degenerativas o inflamatorias del cartílago articular representan un importante

Recibido el 15-8-2002. Aceptado luego de la evaluación el 13-12-2002.

Correspondencia:

Dr. JORGE GENOVESE

Arengreen 830 - (1405) Buenos Aires.

Tel.: 5167-0541

E-mail: genovese@craveri.com.ar

problema para el cirujano ortopédico. Debido a la limitada capacidad de reparación del cartílago hialino lesionado, estas lesiones evolucionan naturalmente a la degeneración articular por incongruencia de sus superficies.^{8,15} Por ese motivo, el cirujano ortopeda debe hacer el mayor esfuerzo para reconstruir la superficie articular en las fracturas intraarticulares; y en el caso de lesiones crónicas sintomáticas, repararlas en forma quirúrgica.

El objetivo de la cirugía es reparar estos defectos condrales con un tejido lo más similar posible al cartílago hialino, tanto en sus propiedades biológicas como mecánicas. De las distintas técnicas actualmente utilizadas (estimulación del reclutamiento celular pluripotencial de la médula ósea,^{18,20} transferencias osteocondrales autólogas,^{10,20} alotrasplantes^{9,10,18,26}) pocas consiguen lograr este objetivo. Este problema ha generado particular interés en los cirujanos ortopedistas e investigadores. En la actualidad, han cobrado relevancia nuevas técnicas de ingeniería de tejidos para la reparación de lesiones condrales. Una de estas novedosas técnicas se basa en el uso de condrocitos autólogos expandidos *in vitro* e implantados en el defecto condral.^{6,13,17,19}

Las propiedades biomecánicas características del cartílago articular hialino están determinadas por su matriz extracelular. Los responsables de la remodelación y el mantenimiento constantes de la matriz son los condrocitos del cartílago hialino. Si como se mencionó, las técnicas de reparación de las lesiones condrales tienen como objetivo generar un tejido sustitutivo que posea las mismas propiedades biomecánicas que el cartílago articular hialino, son necesarias células vivas capaces de sintetizar y mantener una matriz cartilaginosa similar a la del cartílago articular normal. Estas células vivas al ser implantadas en el defecto condral deberían permanecer viables para poder sintetizar y mantener esa matriz. Trabajos experimentales con técnicas de regeneración tisular demostraron que condrocitos autólogos colocados en el defecto condral cumplían tales requisitos.^{7,11} Mediante esta técnica, condrocitos obtenidos del cartílago hialino del paciente son enzimáticamente separados y cultivados *in vitro*, para implantarlos luego. Existen varias publicaciones de estudios realizados en seres humanos para el tratamiento de lesiones condrales con implantes de condrocitos autólogos cultivados con un buen resultado clínico después de un seguimiento de entre 2 y 9 años.^{4,16,21,22,24,25}

El objetivo de este trabajo fue evaluar en un modelo animal la reparación de defectos condrales tratados con un implante de condrocitos autólogos cultivados; las características macro y microscópicas del tejido de reparación, y la calidad de este tejido de reparación en función del tiempo transcurrido desde su implante.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Para el estudio se utilizaron 6 cerdos de entre 2 y 4 meses de edad. Los animales tenían un peso promedio de 10 kg (rango, 9 a 12). Todas las operaciones se realizaron bajo anestesia general inhalatoria (halotano) y con técnicas estériles. Cada animal recibió dos cirugías: en la primera se tomó una muestra de cartílago hialino para ser cultivado, creándose en forma artificial un defecto de 6 mm de diámetro en la parte lateral de la tróclea femoral de la rodilla derecha. En la segunda cirugía, se creó otro defecto condral similar al anterior, que fue tratado con un implante de condrocitos autólogos cultivados colocado debajo de un parche de periostio. El defecto resultante de la primera cirugía no fue tratado y se utilizó como grupo control.

Primera cirugía

Se abordó la rodilla derecha por una vía longitudinal pararro-tuliana interna. Se luxó la rótula hacia lateral. Con la ayuda de un sacabocados se realizó un defecto circular de 6 mm de diámetro en la parte lateral de la tróclea femoral. Con una cureta se extrajo del defecto la totalidad del cartílago articular sin lesionar la capa de hueso subcondral. La cantidad de cartílago extraído fue de entre 0,047 y 0,07 g (promedio: 0,058 g) y se utilizó para el cultivo de condrocitos. El defecto resultante se dejó a su libre evolución y fue utilizado como grupo control. La rodilla se cerró suturando por planos y se permitió la libre movilidad del animal inmediatamente después de finalizada la cirugía.

Aislamiento y cultivo de los condrocitos

La biopsia de cartílago articular se colocó en 20 ml de un medio de transporte de Eagle modificado por Dulbecco / Fórmula 12 de Ham (1:1) (Life Technologies, Baltimore, MD), al cual se agregó gentamicina (0,05 mg/ml) (Life Technologies, Baltimore, MD), penicilina y estreptomina (100U/ml) (Life Technologies, Baltimore, MD). Se conservó la muestra en un recipiente refrigerado hasta su procesamiento en el laboratorio.

El cartílago aislado se cortó en fragmentos de aproximadamente 2 mm³, y se lavó tres veces con una solución de medio Fórmula 12 de Ham (Life Technologies, Baltimore, MD), suplementado con gentamicina (0,1 mg/ml) (Life Technologies, Baltimore, MD), penicilina y estreptomina (100 U/ml) (Life Technologies, Baltimore, MD).

Los fragmentos fueron tratados con colagenasa I (2 mg/ml) (Life Technologies, Baltimore, MD) en 10 ml de medio de Fórmula 12 de Ham, durante 16 horas a 37°C, en presencia de desoxirribonucleasa I (100 U) (Life Technologies, Baltimore, MD).

La suspensión resultante se filtró con una malla (100 mm de poro) y se centrifugó 7 minutos a 2100 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham's F12 (1:1) (Life Technologies, Baltimore, MD), suplementado con L-glutamina (Life Technologies, Baltimore, MD), sal sódica de ácido L-ascórbico (50 mg/ml) (Anedra, San Fernando, Argentina), penicilina y estreptomina (100 U/ml) (Life Technologies, Baltimore, MD), y 10% de suero fetal bovino (Life Technologies, Baltimore, MD).

Las células se mantuvieron *in vitro* a 37°C y 5% de CO₂, y a humedad saturada el medio de cultivo se cambió tres veces por semana. El cultivo se repicó cuando alcanzó el 60% de confluencia.

El día del implante los condrocitos fueron tripsinizados, lavados tres veces con buffer fosfato salino (Life Technologies, Baltimore, MD) a 37°C y se resuspendieron a una concentración de $2,4 \times 10^7$ células en 0,4 ml de medio Ham's F12 (Life Technologies, Baltimore, MD).

Segunda cirugía

La segunda cirugía se realizó a los 18 días promedio luego de la primera (rango, 14-21). Se abordó la rodilla derecha por la vía descrita y se luxó la rótula hacia lateral. Utilizando el mismo procedimiento que en la primera cirugía, se creó artificialmente un defecto en la parte lateral de la tróclea femoral un centímetro por debajo del defecto ya realizado. Se tuvo especial cuidado en no lesionar la capa de cartilago calcificado durante la producción de este defecto. Se extrajo un parche de periostio de la cara interna de la tibia proximal y se suturó a los bordes del defecto con vicril 6-0. Con la ayuda de una aguja de 18 gauge se inyectaron los condrocitos cultivados en el defecto (Fig. 1) y se sellaron los bordes de la unión periostio-cartilago sano con adhesivo hemostático fisiológico derivado del fibrinógeno (Tissucol®, Baxter). La rodilla se cerró suturando por planos y se permitió la libre movilidad con carga total del animal inmediatamente después de finalizada la cirugía.

Evaluación macroscópica y microscópica

Se realizó la eutanasia de un animal por vez a los 15 días, 1, 3, 4 y 6 meses (a los 3 meses se sacrificaron dos cerdos). Uno de los cerdos sacrificado a los 3 meses había presentado un cuadro de parasitosis intestinal que alteró su crecimiento, por lo que la talla y el peso de este cerdo no aumentaron en dimensiones similares a los otros 5 utilizados en el estudio. El tratamien-

to antiparasitario se realizó con una combinación de benzetimida, penicilina y estreptomina.

Los 12 defectos cartilagosos realizados artificialmente se dividieron en dos grupos: 1) en el primer grupo se incluyeron los 6 defectos tratados con un implante de condrocitos autólogos, 2) en el segundo grupo se incluyeron los 6 defectos sin tratamiento del grupo control. Para comparar los resultados entre ambos se realizó una evaluación macroscópica y una microscópica; y una evaluación histológica para objetivar los cambios ocurridos en el desarrollo del tejido de reparación del primer grupo con relación al momento en que se realizó la eutanasia del animal.

Para la evaluación macroscópica se utilizó la evaluación de la ICRS,¹² que evalúa el grado reparado del defecto, la integración del neocartilago con el cartilago articular circundante y la apariencia de la superficie del neocartilago, dando como resultado un tejido de reparación normal, cercano a lo normal, anormal o severamente anormal (Tabla 1).

Para la primera parte de la evaluación microscópica (se compararon los resultados de los dos grupos entre sí), se tomaron biopsias de todos los defectos creados, se realizaron cortes seriados y se tiñeron con hematoxilina-eosina y con alcian blue para identificar la presencia de proteoglicanos en la matriz extracelular. Se evaluaron los cortes histológicos que incluían la región central del defecto. También se realizó inmunohistoquímica para colágeno tipo II. De acuerdo con la celularidad de la muestra, el aspecto de la matriz (metacromasia positiva con el alcian blue) y al resultado de la inmunohistoquímica para colágeno tipo II, se clasificaron tres tipos de tejido de reparación:

- Tejido fibroso: las células son fusiformes, tienen un núcleo elongado tipo fibroblastos y no forman lagunas. La matriz se caracteriza por manojos ondulantes de colágeno, orientados por lo general en forma paralela. La matriz tiñe negati-

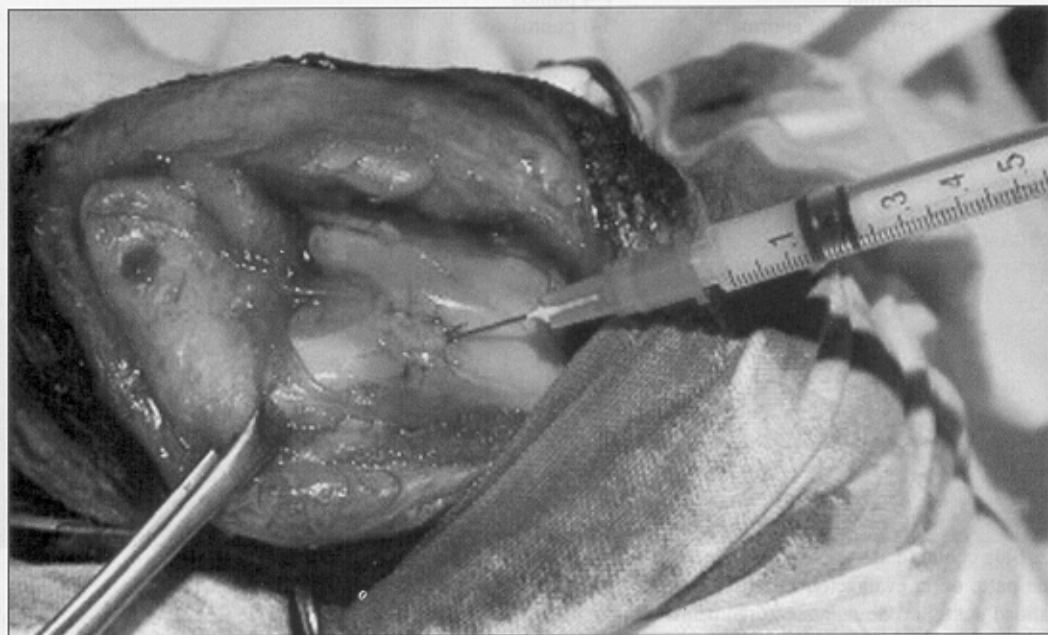


Figura 1. Momento en que se implantan los condrocitos autólogos cultivados en el defecto sellado con un parche de periostio.

Tabla 1. Evaluación macroscópica de la zona reparada

Crterios		Puntos
• Grado reparado del defecto	<ul style="list-style-type: none"> • A nivel con el cartílago circundante • 75% del defecto reparado • 50% del defecto reparado • 25% del defecto reparado • 0% del defecto reparado 	4 3 2 1 0
• Integración del borde con el cartílago circundante	<ul style="list-style-type: none"> • Integración completa al cartílago circundante • Borde demarcatorio < 1mm • 3/4 del injerto integrado; 1/4 con un borde demarcatorio • > 1 mm • 1/2 del injerto integrado, 1/2 con un borde demarcatorio • > 1 mm • Sin contacto a 1/4 del injerto integrado al cartílago circundante 	4 3 2 1 0
• Apariencia macroscópica	<ul style="list-style-type: none"> • Superficie suave e intacta • Fibrilaciones superficiales • Fisuras pequeñas y aisladas • Fisuras mayores y aisladas o pequeñas pero generalizadas • Degeneración total del área implantada 	4 3 2 1 0

Resultados de la evaluación:

• Grado I	Normal	12 puntos
• Grado II	Cercano a lo normal	11-8 puntos
• Grado III	Anormal	7-4 puntos
• Grado IV	Severamente anormal	3-0 puntos

va para el alcian blue y el colágeno tipo II. Matriz heterogénea. Alta celularidad.

- Tejido transicional: posee características intermedias entre el tejido fibroso y el cartílago hialino. Algunas áreas de la matriz tiñen positivo con el alcian blue. La presencia de manojos de fibras de colágeno distingue este tejido del cartílago hialino. Las características de las células, que son redondeadas y pueden formar lagunas, lo diferencian del tejido fibroso.
- Tejido tipo cartílago hialino (*hyaline-like*): se identifica por el aspecto de sus células y de su matriz. No se encuentran fibras de colágeno agrupadas en manojos. Las células tienen una forma esférica y están agrupadas en lagunas. La matriz tiñe positiva para el colágeno tipo II y el alcian blue. Matriz homogénea. Baja celularidad.

La segunda parte de la evaluación microscópica consistió en evaluar la calidad del tejido de reparación del primer grupo (defectos condrales tratados con un implante de condrocitos autólogos cultivados) en relación con el tiempo transcurrido desde el implante hasta el sacrificio del animal. Se utilizó una escala de evaluación histológica descrita por O'Driscoll,¹⁴ con un puntaje

máximo de 31 puntos correspondiente al cartílago hialino articular normal. La escala evalúa: morfología del tejido de reparación (máximo 3 puntos), metacromasia positiva de la matriz con el alcian blue (máximo 3 puntos), integridad estructural del neocartílago (máximo 4 puntos), presencia de conglomerados de condrocitos (máximo 2 puntos), presencia de la interfase cartílago-hueso subcondral (máximo 4 puntos), características de la superficie (máximo 3 puntos), relleno del defecto (máximo 3 puntos), integración lateral con el cartílago circundante (máximo 2 puntos), integración basal con el cartílago circundante (máximo 3 puntos) y presencia de inflamación (máximo 4 puntos).

La evaluación de los hallazgos microscópicos fue realizada por un anatomopatólogo experimentado en patología del sistema musculoesquelético.

Análisis estadístico

Las diferencias obtenidas en los resultados histológicos del primer grupo (defectos condrales tratados con un implante de condrocitos autólogos cultivados) y del segundo grupo (defec-

tos condrales no tratados y utilizados como control) fueron analizadas utilizando la prueba de la *t* para grupos emparejados. Alfa fue 0,05.

Resultados

Evaluación macroscópica

La apariencia de la articulación en el momento de su exposición era normal. El tejido sinovial tenía un aspecto regular, sin signos de inflamación y el color del líquido sinovial era normal.

La evaluación macroscópica de la superficie del tejido de reparación del primer grupo (defectos tratados con un implante de condrocitos autólogos cultivados) fue normal en el 50% de los cerdos (3 de 6). Esta superficie era similar al cartílago articular circundante y no presentaba límite de demarcación con el resto de la articulación. En los cerdos sacrificados a los 15 días y al mes de realizado el implante, el tejido formado presentaba un borde menor de 1 mm de espesor que demarcaba el tejido de reparación del cartílago hialino circundante y se encontraba levemente deprimido con respecto al cartílago articular circundante, siendo el resultado una superficie articular cercana a la normal. El cerdo enfermo sacrificado a los 3 meses presentó un resultado anormal en la evaluación macroscópica de su superficie articular (la superficie se encontraba hundida y con varias fisuras pequeñas y aisladas).

Todos los cerdos del segundo grupo (defectos sin tratamiento del grupo control) presentaron en la evaluación macroscópica de su superficie articular un resultado

anormal, con varias fisuras en la superficie del tejido de reparación, la cual estaba hundida y con un borde demarcatorio mayor de 1 mm con respecto al cartílago articular circundante.

Evaluación microscópica

En la primera parte de esta evaluación se compararon los resultados histológicos entre los dos grupos. En todos los defectos del grupo control (defectos sin tratamiento) el tejido de reparación fue calificado como tejido fibroso sin importar la fecha de la eutanasia del animal (Fig. 2A). Las células eran de características fusiformes y con un núcleo elongado tipo fibroblasto. En todos ellos la matriz tiñó negativa para el alcian blue y el colágeno tipo II. Por el contrario, en 5 de los 6 (83%) defectos del primer grupo (tratados con un implante de condrocitos autólogos cultivados) el tejido de reparación se clasificó como cartílago tipo hialino en su mayor parte (Fig. 2B). Las células tenían una forma esférica y se agrupaban en grupos isogénicos. La matriz tiñó positiva para el colágeno tipo II y para el alcian blue. En el defecto restante (del animal enfermo con parasitosis) el neotejido tenía características de tejido fibroso, con abundantes fibroblastos y con una matriz negativa para el alcian blue y el colágeno tipo II. La diferencia entre los resultados de ambos grupos fue estadísticamente significativa ($p = 0,0041$).

En la segunda parte de esta evaluación (calidad del tejido de reparación en relación con el tiempo transcurrido desde el implante hasta la eutanasia del animal) se encontró que la calidad del tejido de reparación de los defectos condrales tratados con un implante de condrocitos autó-

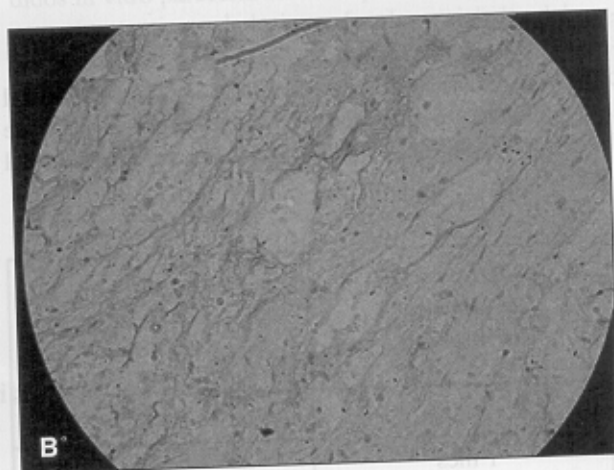
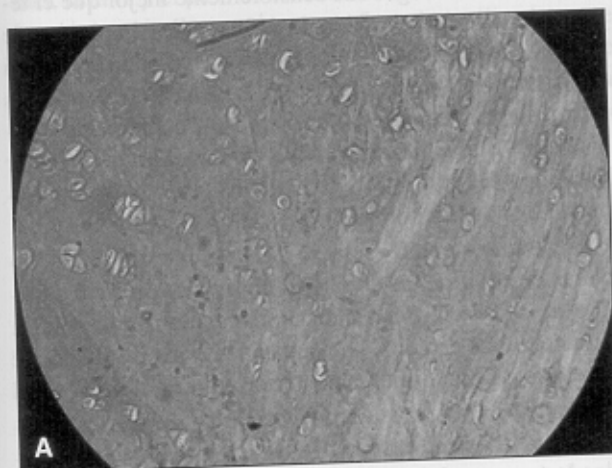


Figura 2. Cortes histológicos de biopsias tomadas a los 6 meses de realizado el implante. Tinción con alcian blue. (Detalle x 400).
A. Biopsia del defecto del grupo control. El neotejido presenta características de tejido fibroso, con abundantes fibroblastos y con una matriz negativa para el alcian blue. **B.** Biopsia del defecto tratado con un implante de condrocitos autólogos cultivados. El tejido de reparación se clasificó como cartílago tipo hialino en su mayor parte. Las células son de forma esférica y están agrupadas en grupos isogénicos. La matriz tiñó positiva para el alcian blue.

logos cultivados fue mejor cuanto más tiempo había transcurrido entre la realización del implante y la eutanasia del animal (Tabla 2). A mayor tiempo de evolución del implante, mejor era la calidad del cartílago hialino formado. Esta mejoría en el resultado se debió fundamentalmente a la mejor organización estructural del neocartílago, a una tinción más homogénea de la muestra con el alcian blue (mayor contenido de proteoglicanos) y a una mejor integración basal y lateral del injerto al cartílago sano circundante. Se observó una buena unión lateral en todas las muestras estudiadas. Respecto de la integración basal del neocartílago al hueso subcondral, ésta fue total recién a los 4 y 6 meses de realizado el implante. El alto porcentaje de condrocitos agrupados en conglomerados de las primeras muestras mostraba una organización más columnar en las muestras obtenidas a los 4 y 6 meses de realizado el implante. Un defecto presentó una hipertrofia del tejido de reparación por sobre el nivel de la superficie articular. Analizando las características de este tejido hipertrófico, se observó que se debió a una hipertrofia del periostio utilizado para sellar la cavidad donde se realizó el implante.

Discusión

Los defectos condrales creados en las rodillas de los cerdos y tratados con un implante de condrocitos autólogos cultivados se curaron con la formación de un tejido de reparación con características macro y microscópicas similares a las del cartílago hialino. La calidad de este tejido de reparación fue mejor cuanto más tiempo había transcurrido entre la realización del implante y la eutanasia del animal.

Tabla 2. Calidad del tejido de reparación en función del tiempo transcurrido desde la realización del implante de condrocitos autólogos cultivados hasta la eutanasia del animal

Tiempo de evolución del implante	Puntaje (max. 31 puntos)
15 días	15
1 mes	20
3 meses	26
4 meses	29
6 meses	30

El tejido de reparación en 5 de los 6 defectos tratados con un implante de condrocitos autólogos cultivados tiñó positivo para el colágeno tipo II y para el alcian blue. Además, las células tenían las características propias de los condrocitos del cartílago hialino articular normal. Estos resultados fueron diferentes de los obtenidos en los defectos creados en la misma rodilla de los mismos cerdos y que no fueron tratados. Las características del tejido de reparación de estos defectos eran las de un tejido fibroso, con células fusiformes y un núcleo elongado tipo fibroblasto, con una matriz con tinción negativa para el colágeno tipo II y el alcian blue. Comparando los resultados de ambos grupos, observamos que la calidad del tejido de reparación fue muy superior en el grupo de defectos tratados con un implante de condrocitos autólogos cultivados que en el grupo control. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores. Los primeros estudios en animales con resultados favorables fueron realizados en conejos.^{5,11,23} En uno de estos estudios,¹¹ se aislaron condrocitos de la articulación por tratar, se marcaron con un radioisótopo y se cultivaron durante 21 días. Posteriormente fueron implantados en el defecto condral y el tejido de reparación fue analizado a las 6 semanas de realizado el implante. El estudio histológico de este tejido mostró la reparación de la lesión con un tejido tipo cartílago hialino que contenía condrocitos viables y una matriz con colágeno tipo II. Un 8% de las células de este tejido de reparación permanecían marcadas con el radioisótopo, por lo que los autores concluyeron que los condrocitos implantados en el defecto se habían incorporado en el tejido de reparación formado y habían proliferado en él. Otro de estos estudios realizados en conejos⁵ demostró que a los 3 meses de efectuado el implante, la cantidad y calidad histológica del tejido de reparación obtenido de defectos condrales tratados con un implante de condrocitos autólogos fue sensiblemente mejor que el tejido de reparación obtenido de defectos sin ningún tipo de tratamiento. También se comparó el tejido de reparación obtenido luego del implante con el obtenido de defectos tratados con un parche de periostio sin implante de células debajo y al año de evolución continuaba siendo mejor la calidad del tejido de reparación formado luego del implante de condrocitos autólogos cultivados.

En otras dos publicaciones,^{1,3} el tratamiento con un implante de condrocitos autólogos cultivados produjo un tejido de reparación con características de fibrocartílago. En uno de los estudios la evaluación de los resultados se hizo a los 12 y 18 meses posteriores a la realización del implante.³ Los autores atribuyeron estos resultados negativos a la diferente especie y edad del modelo animal utilizado (perros adultos), a la falta de retención de los condrocitos implantados en el defecto debido a un posible desplazamiento del parche de periostio y a la localización del defecto condral (tróclea femoral). Por otra parte, los autores también notaron en sus experimentos la penetración de la capa de hueso subcondral durante la produc-

ción del defecto condral. Es fundamental que la capa de cartílago calcificado se encuentre intacta en el momento de realizar el implante de los condrocitos cultivados. Cuando se lesiona esta zona, el defecto se rellena con células provenientes del aporte vascular del hueso subcondral y el resultado es el relleno del defecto con un tejido de reparación con características de fibrocartílago. Sin embargo, estos mismos autores en un experimento posterior² con el mismo modelo animal, observaron una diferencia significativa en el relleno total del defecto y en el porcentaje de cartílago hialino luego del tratamiento de defectos condrales con un implante de condrocitos autólogos cultivados en comparación con los defectos condrales sin tratamiento del grupo control. Informaron un incremento del porcentaje de cartílago hialino respecto de fibrocartílago en el tejido de reparación a los 45 días, 3 y 6 meses de realizado el implante. Para explicar las diferencias entre estos resultados y los obtenidos en sus estudios previos, los autores concluyeron que el tejido de reparación tipo cartílago hialino que se formaba en el defecto a los 6 meses de realizado el implante presentaba una unión completa en la base de éste, pero una unión incompleta al cartílago articular de los bordes de la lesión. Con un mayor tiempo de evolución (12 a 18 meses) esta unión lateral incompleta sumada a fisuras verticales observadas en el tejido de reparación habrían contribuido a la degeneración y posterior pérdida del tejido de la base del defecto, con la consecuente reparación de éste con fibrocartílago.

En nuestro estudio, un solo defecto de los tratados con un implante de condrocitos autólogos cultivados en el tejido de reparación tenía las características del tejido fibroso, siendo además anormal el resultado de la evaluación de su superficie. Este defecto pertenecía al cerdo enfermo con una parasitosis intestinal. Debido a la enfermedad, la talla y el peso de este animal no aumentaron en dimensiones similares a los otros 5 cerdos utilizados en el estudio. Creemos que la alteración en el desarrollo del animal que produjo la parasitosis alteró también el desarrollo y maduración del tejido de reparación. Si bien no encontramos en la bibliografía ningún informe sobre la acción de los antiparasitarios y el desarrollo del cartílago

articular, este factor debería tomarse en cuenta en el análisis del mal resultado obtenido en este animal.

También observamos que cuanto más tiempo transcurría entre el implante de condrocitos autólogos cultivados y la eutanasia del animal, mejor era la calidad del tejido de reparación. Sin embargo, en ninguna de las muestras analizadas se alcanzó el puntaje máximo del cartílago articular normal. En la muestra de mayor desarrollo (6 meses) la organización columnar del cartílago no estaba totalmente desarrollada y había un bajo porcentaje de células condrales agrupadas en racimos. Esto representa un tejido de reparación inmaduro y todavía en desarrollo. Por este motivo, creemos que la formación definitiva de cartílago hialino articular normal mediante esta técnica es un proceso que necesita una duración mayor de los seis meses estudiados por nosotros. Incluso, este tiempo podría llegar a ser superior a un año, ya que otros autores⁵ observaron que el tejido de reparación luego del implante de condrocitos autólogos cultivados todavía se encontraba en una fase de maduración en las muestras obtenidas a las 52 semanas de realizado el implante.

En nuestro conocimiento, esta es la primera experiencia para la reparación de defectos condrales con un implante de condrocitos autólogos cultivados realizada en cerdos. Nuestros resultados demuestran la posibilidad de efectuar en nuestro medio el procedimiento de cultivo y amplificación de condrocitos, así como su posterior aplicación con resultados terapéuticos equivalentes a los obtenidos por otros grupos en otros modelos.

Si bien el número de animales utilizado podría considerarse reducido en comparación con otros estudios experimentales publicados, éste fue determinado considerando los concluyentes resultados logrados y los criterios de buena práctica de laboratorio con animales.

El implante de condrocitos autólogos aislados y expandidos in vitro parecería ser una opción terapéutica válida para el tratamiento de lesiones focales y aisladas del cartílago articular. Mediante esta técnica se produce la reparación del defecto condral con la formación de un tejido de cartílago tipo hialino con características macro y microscópicas similares a las del cartílago hialino articular normal.

Referencias bibliográficas

1. **Breinan HA, Martin SD, Hsu HP, et al.** Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. *J Orthop Res*;18(5):781-789;2000.
2. **Breinan HA, Minas T, Hsu HP, et al.** Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *J Orthop Res*;19(3):482-492;2001.
3. **Breinan HA, Minas T, Hsu HP, et al.** Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Jt Surg (Am)*;79(10):1439-1451;1997.

4. **Brittberg M, Lindahl A, Ohlsson C, et al.** Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*;331(14):889-895;1994.
5. **Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, et al.** Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop*;(326):270-283;1996.
6. **Brittberg M.** Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop*;367S:S147-S155;1999.
7. **Buckwalter JA, Lohmander S.** Operative treatment of osteoarthritis: current practice and future development. *J Bone Jt Surg (Am)*;76:1405-1418;1994.
8. **Bucwalter JA, Mankin HJ.** Articular cartilage. *J Bone Jt Surg (Am)*;79(4):600-632;1997.
9. **Czitrom AA, Keating S, Gross AE.** The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. *J Bone Jt Surg (Am)*;72(4):574-581;1990.
10. **Farnworth L.** Osteochondral defects of the knee. *Orthopedics*;23(2):146-157;2000.
11. **Grande DA, Pitman MI, Peterson L, et al.** The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res*;7(2):208-218;1989.
12. **ICRS (International Cartilage Repair Society)** Cartilage Injury Evaluation Package. Presentado en el 3er Simposio de la ICRS; Gothenburg, Suecia; 2000.
13. **Jackson DW, Scheer MJ, Simo TM.** Cartilage substitutes: overview of basic science and options. *J Am Acad Orthop Surg*;9(1):37-52 ;2001.
14. **Mainil-Varlet P.** *Modified O'Driscoll score for cartilage defects.* <http://www.pathology.unibe.ch>.
15. **Mankin HJ.** The response of articular cartilage to injury. *J Bone Jt Surg (Am)*;64(3):460-466;1982.
16. **Micheli LJ, Browne JE, Erggelet C, et al.** Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experience and minimum 3-year follow-up. *Clin J Sport Med*;11(4):223-228;2001.
17. **Minas T, Chiu R.** Autologous chondrocyte implantation. *Am J Knee Surg*;13(1):41-50;2000.
18. **Minas T, Nehrer S.** Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics*;20(6):525-538;1997.
19. **Minas T, Peterson L.** Chondrocyte transplantation. *Operative Tech Orthop*;7(4):323-333;1997.
20. **Newman A.** Articular cartilage repair. *Am J Sports Med*;26(2):309-324;1998.
21. **Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, et al.** Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med*;30(1):2-12;2002.
22. **Peterson L, Minas T, Brittberg M, et al.** Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop*;374:212-234;2000.
23. **Peterson M, Menche D, Grande D, et al.** Chondrocyte transplantation - an experimental model in the rabbit. *Trans Orthop Res Soc*;9:218;1984. Abstract.
24. **Richardson JB, Catterson B, Evans EH, et al.** Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Jt Surg (Br)*;81(6):1064-1068;1999.
25. **Robinson D, Ash H, Aviezer D, et al.** Autologous chondrocyte transplantation for reconstruction of isolated joint defects: the Assaf Harofeh experience. *Isr Med Assoc J*;2(4):306-307;2000.
26. **Tomford WW, Springfield DS, Mankin HJ.** Fresh and frozen articular cartilage allografts. *Orthopedics*;15(10):1183-1188;1992.