

INVESTIGACIÓN

Estudio de la actividad mitótica entre las fases *in vitro* e *in vivo* en el trasplante de condrocitos

G. PERETTI,* ** F. RAZZA,† G. MACIAS,‡ E. CARUSO* y W. ALBISETTI‡

*Orthopaedics Research Laboratories, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, EE.UU.; **Clinica Ortopédica IV, Università di Milano, Ospedale San Raffaele, Milán, Italia; †Hospital Cosme Argerich, Buenos Aires, Argentina; ‡Istituto di Clinica Ortopédica, Università degli Studi di Milano, Milán, Italia.

RESUMEN: El trasplante de matrices alogénicas devitalizadas portadoras de condrocitos autólogos, previamente aislados y sembrados sobre ellas, podría ser una solución al problema de la reparación de las lesiones del cartílago articular. El presente estudio analiza la actividad mitótica de los condrocitos sembrados en cartílago alogénico devitalizado e implantados en animales vivos. Se aislaron enzimáticamente condrocitos de cartílago articular de cordero, y se sembraron *in vitro* sobre matriz cartilaginosa alogénica devitalizada durante tres semanas. Al final del período de cocultivo, se trasplantaron los compuestos de matriz y condrocitos en bolsillos subcutáneos de ratones atímicos. Las muestras experimentales y las de control fueron evaluadas luego de extraídas mediante el estudio histológico y tras la incorporación de timidina tritiada. Los resultados obtenidos mostraron una disminución importante de los valores de incorporación de timidina a partir del tiempo experimental cero (evaluación preimplante) hasta el día 28 del implante, seguido por un leve aumento hacia el día 42 del estudio. La experiencia ha demostrado la tendencia de los condrocitos articulares (cultivados *in vitro* y sucesivamente trasplantados *in vivo* sobre un soporte de matriz cartilaginosa alogénica devitalizada) de modificar su propia actividad mitótica desde valores muy altos, correspondiendo a los primeros días experimentales (típico de las fases *in vitro* de expansión celular) hasta valores muy bajos, similares a la conducta de los condrocitos articulares *in vivo*.

PALABRAS CLAVE: Trasplante de condrocitos.

MITOTIC ACTIVITY IN *IN VITRO* AND *IN VIVO* CHONDROCYTE TRANSPLANTATION

ABSTRACT: Transplantation of allogenic devitalized matrices carrying autologous chondrocytes previously isolated and seeded on them might solve the problem of repairing joint cartilage lesions. This study analyzes the mitotic activity of chondrocytes seeded in allogenic devitalized cartilage and implanted in living animals. Chondrocytes of joint cartilage of lambs were enzymatically isolated and seeded *in vivo* in allogenic devitalized matrix during three weeks. At the end of the co-culture period, the matrix compounds and chondrocytes were transplanted into subcutaneous pouches of atymic mice. Histological evaluation of the experimental and control samples was performed following incorporation of tritiated thymidine. The results showed a significant reduction in thymidine incorporation values, as of experimental moment zero (pre-implant evaluation) up to implant day 28, following by a slight increase by day 42 of the study. This experience has shown that joint chondrocytes (seeded *in vitro* and then transplanted *in vivo* on an allogenic devitalized matrix), tend to change their own mitotic activity from very high levels, corresponding to the initial experimental days (typical of the *in vitro* phase of cell proliferation), to very low levels, resembling the performance of *in vivo* joint chondrocytes.

KEY WORDS: Chondrocyte transplantation.

Recibido el 15-12-99. Aceptado luego de la evaluación el 12-4-00.

Correspondencia:

Dr. F. RAZZA
Av. Independencia 933 5° N
(1099) Capital Federal
Argentina
Tel.: (011) 4331-8837
E-mail: frazza@intramed.net.ar

El cartílago articular tiene escasa tendencia a la reparación espontánea. En las lesiones traumáticas o degenerativas típicas del joven (como la osteocondritis disecante), el tejido de reparación generalmente consiste en fibrocartílago, cuyas propiedades biomecánicas son inferiores a las del tejido original, sin capacidad de garantizar

una buena función articular ni de prevenir la osteoartritis.³

A través de los años se han propuesto diferentes técnicas quirúrgicas para solucionar este problema, que lleva a la formación de un tejido de reparación de naturaleza fibrocartilaginosa o cartilaginosa con resultados clínicos inciertos.

Recientemente, se ha presentado una técnica que prevé el injerto de condrocitos autólogos en el interior de la lesión condral, asegurados en su lugar por un colgajo de periostio suturado a los bordes.¹

A pesar de los resultados alentadores obtenidos en los primeros estudios clínicos, el método presenta algunos problemas.

En primer lugar, en las primeras fases, las propiedades biomecánicas del neot tejido de reparación son insuficientes, y este tejido sólo podrá resultar útil cuando los condrocitos comiencen a producir matriz extracelular. Este hecho demora la rehabilitación en el primer periodo, sobre todo en lo que respecta a la concesión de la carga. Otro problema, a menudo remarcado por los cirujanos, es la difícil manipulación de una solución celular líquida, poco densa, que tiende a escurrirse, si no es asegurada por una sutura perfecta del colgajo perióstico, lo que aumenta los problemas técnicos del método.

El trasplante de condrocitos autólogos, previamente aislados y cultivados sobre matrices alogénicas desvitalizadas, podría representar una solución para ambos problemas.

Estudios precedentes han demostrado que el cultivo de condrocitos en matrices desvitalizadas permite la adherencia y, posteriormente, la duplicación de los condrocitos sobre la superficie de las matrices.²

Para que resulte factible que los compuestos de matriz y condrocitos puedan ser transportados e inoculados dentro de las lesiones condras, es necesario que las células permanezcan viables, produzcan matriz condroide y también que conserven la capacidad de duplicarse después del trasplante *in vivo*.

En este estudio, se ha propuesto analizar la actividad mitótica de los condrocitos sembrados en un soporte de matriz cartilaginosa alogénica desvitalizada, y luego trasplantada al animal vivo.

Material y métodos

Bajo condiciones de asepsia, se tomaron secciones de 3 mm de ancho, 5 mm de longitud y 1 mm de espesor de cartílago articular de rodilla, cadera y hombro de 3 corderos. Las secciones fueron colocadas en probetas de 50 mi (Corning, NY, EE.UU.), con fosfato salino tamponado (*phosphate buffered saline* [PBS], Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) y solución antibiótica/antimicótica al 2% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.). Las secciones de cartílago fueron desvitalizadas mediante ciclos de congelación y descongelación.⁴ Luego, fueron congeladas a una temperatura de -20°C, durante cinco días. Después del descongelamiento, el PBS fue extraído, y las secciones de cartílago fueron sometidas a un

ciclo de 5 pasajes de congelación-descongelación sin PBS. Al finalizar este proceso, la vitalidad de los condrocitos fue evaluada mediante la coloración con *Trypan Blue* (Trypan Blue 0,2%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) y fluorescencia,² para documentar la ausencia total de condrocitos vivos dentro de las secciones cartilaginosas.

Al mismo tiempo, se obtuvo tejido cartilaginoso articular de otros dos corderos bajo iguales condiciones de asepsia y del mismo tipo de articulaciones. Las secciones cartilaginosas fueron digeridas en medio de HAM con Glutamax-1 (GibcoBRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, EE.UU.) que contenía 0,075% de colagenasa tipo II (Worthington Biochemical Co., Freehold, NJ, EE.UU.). El medio fue complementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.), con 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.), con la solución de antibiótico/antimicótico al 1% (10.000 UI de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina B en solución de cloruro de sodio al 0,9%; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) y glutamina 292 mg/l (L-Glutamine, Fisher Biotech Fair Lawn, NJ, EE.UU.). El período de incubación de tales secciones fue de 8 horas a 37°C. Los fragmentos de tejido digerido fueron removidos, filtrando la suspensión celular con una gasa estéril.

La suspensión celular conseguida fue centrifugada a 1500 rpm durante diez minutos y lavada con una solución de PBS y antibiótico/antimicótico al 2%. La vitalidad de los condrocitos fue evaluada mediante la coloración con *Trypan Blue*, y registrada como el porcentaje de condrocitos vitales por campo. Fueron consideradas las muestras que presentaron un porcentaje de vitalidad igual o superior al 90%. El recuento celular exacto se efectuó a través de un hemocitómetro. La solución condrocitaria fue ajustada a una concentración de 10⁶ células/ml.

Los condrocitos así obtenidos se cultivaron en matriz alogénica desvitalizada, según el protocolo previamente descrito. Se colocaron 3 secciones de matriz cartilaginosa en probetas de 12 mi (Corning, NY, EE.UU.), que contenían 4 mi de medio y 1 ml de la solución condrocitaria. Se mantuvo el cocultivo durante 21 días, para permitir que los condrocitos se adhirieran a las paredes de la matriz cartilaginosa y se multiplicaran usando la matriz como soporte. Muestras idénticas de control, sin condrocitos dentro de las probetas, fueron mantenidas bajo las mismas condiciones de cultivo. En todas las muestras, el medio de cultivo fue cambiado dos veces por semana.

Como se resume en la Tabla, se utilizaron 48 probetas con cultivos experimentales y 48 recipientes con muestras control.

Al finalizar el período de cocultivo, las tres secciones cartilaginosas de las muestras experimentales (que contenían condrocitos) fueron extraídas del medio y colocadas en una placa de Petri, para el ensamblado del compuesto. Tres secciones cartilaginosas separadas fueron colocadas una encima de la otra, y fueron sostenidas por una envoltura de gel adhesivo de fibrina constituido por la combinación de un crioprecipitado humano con trombina bovina (Thrombin, USP-Thrombostat, Parke Davis, Lambert Co., Morris Plains, NJ, EE.UU.).

De la misma manera fueron constituidos los compuestos control, utilizando tres secciones cartilaginosas desvitalizadas colocadas bajo las mismas condiciones de cultivo y sin condrocitos vitales.

Se utilizaron 18 ratones atímicos, o ratones "desnudos". En cada animal se implantaron 2 compuestos experimentales y otros 2 de control, en cuatro bolsillos subcutáneos dorsales. El implante de los compuestos se efectuó en condiciones de asepsia dentro de una campana con flujo laminar. Los ratones se sacrificaron en grupos de 6 a los 14, 28 y 42 días del implante; 8 muestras experimentales y 8 de control fueron extraídas para el estudio de la actividad mitótica, y 4 muestras experimentales y 4 de control, para el análisis histológico.

No se implantaron en los ratones 12 muestras experimentales

y otras 12 de control, que fueron analizadas inmediatamente después de la fase *in vitro* (tiempo 0 de la experimentación). Para cada grupo experimental y de control, 8 muestras fueron reservadas para el estudio de la actividad mitótica y 4 para la evaluación histológica. Para el estudio de la actividad mitótica, las muestras retiradas de la probeta de cultivo (tiempo experimental 0) y las extraídas de los ratones (tiempos experimentales 14, 28 y 42) fueron colocadas en incubación con 16 μCi (592 kBq/ml) de timidina tritiada a una atmósfera de 92% de aire y 8% de CO₂, durante 24 horas. Cada muestra fue hidrolizada y combinada con 3 ml de CytoScint (ICN Research Products División, Costa Mesa, CA, EE.UU.) y el resultante fue medido con un contador de ³H-centelleo (Beckman LS5000TD, Fullerton, CA, EE.UU.).

Se utilizó la prueba *t* de Student para datos no pareados para comparar los valores de incorporación de timidina (media \pm DE) en los distintos tiempos experimentales. Fue adoptada la modificación de Bonferroni, para mantener un error del tipo 1 con un valor igual a 0,05 en todas las comparaciones realizadas. Además, los valores de las muestras experimentales de cada tiempo de estudio fueron confrontados con los correspondientes a los de las muestras de control por medio de la prueba *t* de Student para datos no pareados ($p < 0,05$).

Para el estudio histológico, los compuestos fueron fijados en formalina, procesados y coloreados con safranina O.

Resultados

Como se observa en la Figura 1, el estudio de incorporación de timidina tritiada mostró, en las muestras experimentales, una reducción estadísticamente significativa de los valores a partir del tiempo experimental 0 hasta el tiempo experimental 28 ($p < 0,01$). En cambio, en el último tiempo experimental de 42 días se registró un ligero aumento de tales valores. En las muestras control, los valores se mantuvieron en niveles muy bajos (siempre bajo las 3000 cpm) excepto en el último tiempo experimental, cuando se registró un aumento de la incorporación, aunque no estadísticamente significativo, respecto de los tiempos precedentes (media de cpm >7000).

El análisis estadístico de estos resultados ha mostrado una diferencia significativa entre las muestras experimentales y las de control, en todos los tiempos experimentales ($p < 0,05$).

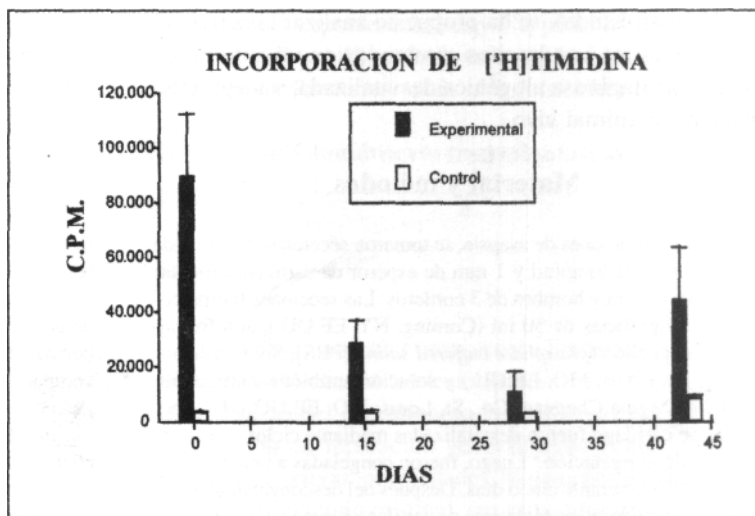
El estudio de los preparados histológicos de las

Tabla. Grupos de estudio y protocolo experimental

Grupos de estudio	Tiempo (días)	0 (no implantado)	14	28	42	Total
Valoración histológica	Exp. control	4	4(2)	4(2)	4(2)	16(6)
		4	4	4	4	16
Incorporación de timidina tritiada	Exp. control	8	8(4)	8(4)	8(4)	32(12)
		8	8	8	8	32
Total	Exp. control	12	12(6)	12(6)	12(6)	48(18)
		12	12	12	12	48

Entre paréntesis, cantidad de ratones empleados.

Figura 1. Gráfico que muestra la incorporación de timidina tritiada de muestras experimentales y control en los diversos tiempos del estudio. Mientras las muestras control se mantienen en valores basales durante todo el estudio, las experimentales registran valores muy altos al tiempo 0, para después decrecer significativamente hasta el día 28; luego, se evidencia un leve incremento de los valores correspondiente al tiempo experimental a los 42 días del implante (cpm = conteos por minuto).



muestras procesadas al final de la fase *in vitro* documentó la presencia de células adheridas a la superficie de la matriz desvitalizada, con producción de matriz extracelular (Fig. 2).

El análisis histológico de los preparados experimentales posimplante mostró, por el contrario, la presencia de neocartílago interpuesto entre las matrices desvitalizadas, y fuertemente adherido a éstas (Fig. 3). Se observaron varias figuras mitóticas en los condrocitos, casi siempre localizados en el interior de lagunas de la neomatriz, fuertemente coloreada con safranina O. En las muestras control, en cambio, los espacios entre las matrices desvitalizadas fueron ocupados por tejido fibroso y células de

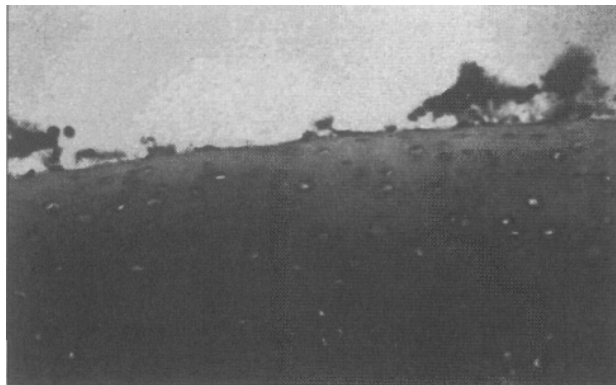


Figura 2. Sección histológica (safranina O, 100x) del compuesto experimental de matriz y condrocitos después de la fase *in vitro* y antes del implante en el ratón atímico. Son reconocibles algunos estratos celulares sobre la superficie del cartílago desvitalizado circundado por una escasa cantidad de sustancia extracelular. En el interior de la matriz desvitalizada, son visibles lagunas celulares vacías o que contenían sólo detritos nucleares.

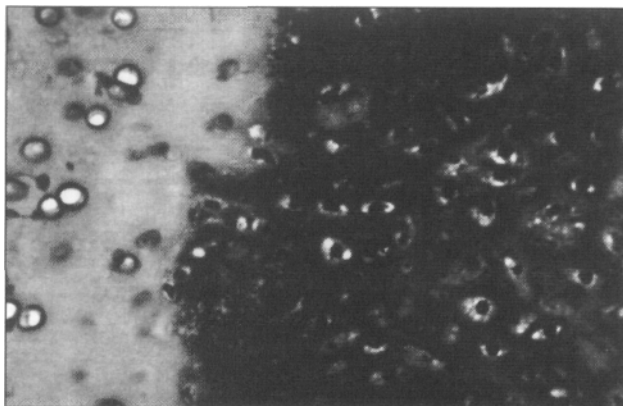


Figura 3. Sección histológica (safranina O, 200x) de un compuesto experimental después de 42 días *in vivo*. A la derecha, se observa neocartílago, morfológicamente bien representado, que se adhiere a la superficie de la matriz desvitalizada (izquierda). En las lagunas, no se reconocen células vivas.

naturaleza fibroblástica, pero no se observaron condrocitos.

Discusión

El estudio de la reparación de las lesiones del cartílago articular ha sido, desde hace unos años, el centro de atención de la investigación en los campos ortopédico y reumatológico.

Uno de los principales problemas referidos a la reparación de estas lesiones es la restauración de la integridad de la superficie articular con un tejido que posea las mismas características biomecánicas que el tejido original. Al tal fin, un modelo que presenta simultáneamente, la actividad mitótica de los condrocitos aislados y las propiedades biomecánicas del cartílago, puede proponerse para la resolución de esta situación patológica.

Para considerar válida esta propuesta, es necesario demostrar la capacidad de tales condrocitos para multiplicarse y producir matriz después del implante *in vivo*.

Hemos estudiado la actividad mitótica de condrocitos aislados y cultivados sobre matriz alogénica desvitalizada, después del implante del compuesto en el tejido subcutáneo de ratones atímicos. Los valores expresados por la incorporación de timidina tritiada reflejaron directamente la actividad multiplicativa de tales células.

El estudio *in vivo* se efectuó en ratones atímicos, que no presentan ningún tipo de respuesta inmunológica, y donde el neocartílago puede desarrollarse libremente simulando un modelo de trasplante autólogo, sin los problemas por rechazo.

El descenso rápido de los valores desde el tiempo experimental 0, en relación con los sucesivos tiempos, se puede interpretar como la modificación de la actividad mitótica de los condrocitos, desde valores muy altos (en los primeros tiempos experimentales, típico de las fases de expansión celular *in vitro*), hasta valores muy bajos y más uniformes, parecidos a la conducta silenciosa (desde el punto de vista mitótico) del condrocito articular *in vivo*. El aumento registrado en el día 42 señalaría, en cambio, una continua proliferación celular, confirmada, además, por histología.

Conclusiones

El presente estudio demostró que los condrocitos aislados, sembrados sobre un soporte de matriz alogénica desvitalizada, son transportables *in vivo* gracias a este soporte y, por lo tanto, inoculables en el interior de lesiones condrales; las células sobreviven, producen matriz cartilaginosa (hecho documentado por el estudio histológico) y conservan la capacidad de duplicarse después del trasplante *in vivo*.

A nuestro entender, este modelo se propone como un instrumento científico válido, simple y fácilmente reproducible para el estudio de la matriz alogénica utilizada

como soporte para los condrocitos en la reparación de las lesiones del cartílago articular. Esto representa la premisa esencial para su posible empleo en la clínica, con el

propósito de reparar las lesiones cartilaginosas con un tejido que presente las mismas características histológicas y biomecánicas del cartílago hialino normal.

Referencias bibliográficas

1. **Brittberg, M; Lindahl, A; Nilsson, A; Ohlsson, O; Isaksson, O, y Peterson, L:** Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331: 889-895, 1994.
2. **Caruso, EM; Lewandrowski, KU; Ohlendorf, C; Tomford, WW, y Zaleske, DJ:** Repopulation of laser-perforated chondroepiphyseal matrix with xenogeneic chondrocytes: An experimental study. *J Orthop Res*, 14: 102-107, 1996.
3. **Mankin, HJ:** The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Jt Surg (Am)*, 64: 460-466, 1982.
4. **Peretti, GM; Bonassar, LJ; Caruso, EM; Randolph, MA, y Zaleske, DJ:** Biomechanical analysis of cell-based model of articular cartilage repair. *Trans Orthop Res Soc*, 23: 795, 1998.