

Capacidad adhesivo-reparativa de condrocitos articulares aislados y trasplantados in vivo

GIUSEPPE M. PERETTI,* FULVIO A. RAZZA,** GUILLERMO MACIAS,** MARK A. RANDOLPH,** GIANFRANCO FRASCHINI*
y DAVID J. ZALESKE***

*Ospedale San Raffaele, Milán, Italia: **Hospital "Cosme Argerich", Buenos Aires: ***Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts. EE.UU.

RESUMEN: La reparación de los defectos condrales mediante el implante de condrocitos autólogos presupone la síntesis por los condrocitos de matriz cartilaginosa con capacidad de adherirse a la superficie de la lesión. En este estudio, se evaluó la capacidad adhesivo-reparativa de condrocitos articulares aislados enzimáticamente, cultivados *in vitro* sobre matriz cartilaginosa desvitalizada y trasplantados *in vivo* en bolsillos subcutáneos de ratones atímicos. Se utilizaron 50 ratones atímicos, cada uno portador de dos muestras experimentales y dos de control, subdivididos en 5 tiempos experimentales, que correspondían 7, 14, 21, 28 y 42 días desde el implante. El análisis de adhesividad en las muestras experimentales mostró valores siempre crecientes con el transcurso del tiempo hasta alcanzar un valor máximo entre los días 28 y 42; mientras que las muestras de control registraron valores nulos durante todo el estudio. El análisis histológico de los preparados mostró que el "adhesivo biológico" en las muestras experimentales estaba constituido por cartilago neoformado capaz de promover la adhesión-reparación de la matriz desvitalizada. Los resultados de este estudio demostraron que los condrocitos aislados y cultivados sobre matriz alogénica desvitalizada se encuentran en condiciones de producir *in vivo* neot tejido cartilaginoso, con una propiedad adhesiva tal que permite la adhesión recíproca en la matriz de soporte.

PALABRAS CLAVE: Cartilago. Condrocitos. Matriz cartilaginosa.

ADHESIVE-REPARATIVE CAPACITY OF ISOLATED AND TRANSPLANTED IN VIVO JOINT CHONDROCYTES

ABSTRACT: Repair of chondral defects using autologous chondrocyte implant assumes the synthesis of these cartilaginous matrix cells with adhesive potential in the surface of the lesion. In this study, we evaluated the adhesive-reparative potential of chondrocytes which were enzymatically isolated, seeded *in vitro* in cartilaginous devitalized matrix, and implanted *in vivo* in subcutaneous pouches of atymic mice. Fifty atymic mice were used, with two experimental samples and two control samples; they were subdivided into 5 experimental periods corresponding to days 7, 14, 21, 28, and 42 since implant. Adhesiveness analysis in experimental samples always showed increasing values up to a highest value between days 28 and 42; while control samples had null values during the study. Histological analysis of samples revealed that the "biological adhesive component" in the experimental samples consisted of newly formed cartilage capable of promoting the adhesiveness-repair of devitalized matrix. Results showed that chondrocytes that have been isolated and seeded in allogenic devitalized matrix can produce *in vivo* new cartilaginous tissue with sufficient adhesive capacity to allow reciprocal adhesion on the surface of the lesion.

KEY WORDS: Cartilage. Chondrocytes. Chondroid matrix.

Recibido el 6-12-1999. Aceptado luego de la evaluación el 22-5-2001. Correspondencia:

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

El problema de la reparación de las lesiones del cartilago articular fue y sigue siendo uno de los principales temas de estudio en el campo de la investigación ortopédica y reumatológica.

La capacidad de reparación espontánea de groseras lesiones del cartilago articular es mínima y consiste en la formación de un tejido fibrocartilaginoso, con propiedad biomecánica inferior respecto del tejido sano.¹⁰

Durante años, se propusieron diversas técnicas quirúrgicas con intención de resolver este problema. Entre estas, recordamos el curetaje, la esponjización,⁷ la mosaicoplastia⁸ y la perforación del hueso subcondral,¹¹ que permitirían obtener la formación de un tejido reparativo de naturaleza fibrocartilaginosa, con resultados clínicos inciertos.

En un estudio precedente ("Estudio de la actividad mitótica en el trasplante de condrocitos, de la fase *in vitro* a la fase *in vivo*": Premio "Prof. Dr. Carlos Ottolenghi", *Forum de Investigación XXXVI Congreso Argentino de Ortopedia y Traumatología, Buenos Aires, 1999* y *Rev Asoc Arg Ortop Traumatol*, 65 (4): 306-310, 2000), hemos analizado la modificación de la actividad mitótica de los condrocitos articulares sembrados en matriz cartilaginosa, después del implante *in vivo*.

Demostramos cómo la duplicación celular se modifica, pasando de valores muy altos, típicos de la fase de cultivo, a valores más bajos, similares al comportamiento celular presente en el cartílago maduro nativo. Los resultados obtenidos fueron alentadores y ubicaron al trasplante de condrocitos autólogos, sembrados en matriz alogénica desvitalizada, como uno de los posibles métodos para la reparación de las lesiones del cartílago articular.

El neotejido cartilaginoso, además de tener que sobrevivir y multiplicarse después del implante, deberá, necesariamente, reunir otra importante característica, representada por la capacidad de adherirse a la matriz circundante y a las paredes de la lesión. Con tal fin, programamos un estudio para analizar especialmente este aspecto, utilizando el mismo modelo de ratones atímicos, ya mencionado.

El trasplante de condrocitos autólogos en el lugar de la lesión ha tenido en los últimos años un interés creciente.³⁻⁵ La técnica no es nueva,¹ pero ha despertado la atención recientemente luego de la publicación, en 1994, del primer estudio de este método en el hombre.⁴ La ventaja y la innovación están representadas en la posibilidad de obtener, en un cultivo celular, una notable expansión *in vitro* del componente celular del tejido cartilaginoso por implantar.

Estudios experimentales en conejos⁵ evidenciaron la formación de un tejido cartilaginoso de reparación, de buena calidad, en lesiones de cartílago articular tratadas con la técnica de trasplante de condrocitos autólogos, pero aún con dificultad para resolver la adhesividad de la interfaz entre el neocartílago producido y el tejido receptor.^{2,9,12,13}

El objetivo de nuestro estudio es evaluar la capacidad adhesiva y reparativa de condrocitos aislados, pre-cultivados *in vitro* y sucesivamente trasplantados *in vivo* a un modelo experimental en ratones atímicos.

Material y método

Bajo condiciones de asepsia, se tomaron fragmentos (con forma de disco) de cartílago articular de la rodilla, cadera y

hombro de 6 corderos. Los fragmentos medían 3 mm de ancho, 5 mm de largo y 1 mm de espesor. Se colocaron en probetas de 50 ml, 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., EE.UU.).

Los discos fueron sometidos a un proceso de desvitalización según el siguiente protocolo:^{12,13} luego del proceso inicial se congelaron a una temperatura de -20°C durante 5 días. Después del descongelamiento, el PBS fue extraído y los discos de cartílago fueron sometidos a un ciclo de 5 pasajes de congelamiento y descongelamiento sin PBS. Al final de estos pasajes, se prueba la vitalidad de los condrocitos mediante su coloración con Trypan Blue (Trypan Blue 0,2%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) y con fluorescencia^{6,13} para documentar la ausencia de condrocitos vitales dentro de los discos de cartílago.

Sucesivamente, se extrajo tejido cartilaginoso articular bajo técnica aséptica de articulaciones de otros 5 corderos. Los fragmentos fueron digeridos en medio de HAM con Glutamax-1 (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, EE.UU.) con 0,075% de colagenasa tipo 2 (Worthington Biochemical Co., Freehold, NJ, EE.UU.). El medio fue suplementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma Chemical Co., EE.UU.) con 50 ng/ml de ácido ascórbico (Sigma Chemical Co., EE.UU.) y solución de antibiótico/antimicótico al 1%: 10.000 UI de penicilina, 10 mg de estreptomina y 25 ng de anfotericina B/ml en 0,9% de solución de cloruro de sodio (Sigma Chemical Co., EE.UU.) y glutamina 292 mg/l (L-Glutamina. Fisher Biotech, Fair Lawn, NJ, EE.UU.).

El período de incubación fue de 8 horas a 37°C. Los restos de tejido no digerido fueron removidos por filtrados sucesivos en gasa estéril.

La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos y lavada en una solución de PBS y 2% de antibiótico/antimicótico.

La vitalidad de los condrocitos fue evaluada con la coloración de Trypan Blue y registrada en porcentaje de condrocitos vitales por campo. Para el experimento, se eligieron las muestras que presentaron una vitalidad de condrocitos igual o superior al 90%. La solución de condrocitos fue ajustada a una concentración de 10⁶ células/mi. El recuento celular se efectuó con un hemocitómetro.

El cultivo de condrocitos con la matriz alogénica se efectuó colocando 3 discos de matriz desvitalizada en probetas de 12 ml, con 4 ml de medio y 1 ml de la solución condrocitaria obtenida por los pasos descritos previamente. Se mantuvo el cultivo durante 21 días para permitir que los condrocitos se adhieran a las paredes de la matriz cartilaginosa y se duplicaran, utilizando tal matriz como soporte.

Se mantuvieron muestras idénticas de control, pero sin condrocitos dentro de las probetas, bajo las mismas condiciones de cultivo. En todas las muestras experimentales y de control, el medio de cultivo fue cambiado 3 veces a la semana.

Para completar las fases programadas de la experimentación, se prepararon 100 probetas con los cultivos experimentales y 100 probetas con los controles.

Al finalizar el período de cocultivo, las matrices desvitalizadas con los condrocitos fueron extraídas de los 3 discos con el medio y colocadas yuxtapuestas en una placa de Petri, para favorecer el contacto entre ellas, sostenidas por una envoltura de gel adhesivo de fibrina ("compuesto experimental"). Este estaba constituido por la combinación de un crioprecipitado humano con trombina bovina (Thrombin, USP-Thrombostat, Parke Davis, Lambert Co., Morris Plains, NJ, EE.UU.).

Las muestras de control fueron preparadas según el mismo procedimiento, utilizando 3 discos de cartílago desvitalizado en ausencia de condrocitos vitales.

Para la fase *in vivo*, se utilizaron 50 ratones atímicos. En cada animal, se implantaron 2 compuestos experimentales y otros 2 de control, dentro de bolsillos subcutáneos en la región dorsal. El implante de los compuestos se efectuó en condiciones de asepsia dentro de una campana con flujo laminar. Los animales fueron sacrificados en grupos de 10 en lapsos de 7, 14, 21, 28 y 42 días a partir del implante; los compuestos fueron extraídos para realizar el estudio histológico y de la capacidad adhesiva del neocartílago.

La fuerza de apertura de una pinza Nro. 4 de microcirugía fue el método de valoración de la capacidad adhesiva del neot Tejido cartilaginoso, mediante la siguiente técnica: se introduce la pinza cerrada entre dos discos; en caso de no existir adhesión, la fuerza de apertura del instrumento es suficiente para separar los dos componentes. Si hay adhesión entre los discos, la pinza permanece cerrada.

A cada análisis, se asignó un valor positivo o negativo. Debido a que cada compuesto está constituido por 3 discos, existen para cada uno dos superficies de yuxtaposición. Por lo tanto, para cada tiempo de sacrificio, existen 40 superficies de valoración, tanto para las muestras experimentales como para las de control.

Los compuestos fueron fijados finalmente en formalina; luego procesados y coloreados con safranina O para el posterior análisis histológico.

Resultados

Como se observa en la Tabla, la valoración de la capacidad adhesivo-reparativa del tejido cartilaginoso neoformado ha evidenciado un comportamiento diferente entre las muestras experimentales y las de control.

En las muestras de control, el valor de adhesividad se mantuvo nulo (0%) durante todo el experimento. En los compuestos experimentales, se observó un aumento de los valores de adhesividad a partir del día 14 (35%) para alcanzar el máximo valor el día 28 (100%).

En el examen macroscópico, a partir de la cuarta semana del implante, las muestras experimentales presentaban los tres discos de matriz desvitalizada total-

mente unidas, a diferencia de los compuestos de control, en los que los discos permanecieron completamente independientes entre sí.

El estudio de los preparados histológicos de los compuestos experimentales mostró la presencia de un neot Tejido cartilaginoso "de reparación" interpuesto entre los discos de matriz desvitalizada, constituido por condrocitos vitales rodeados de matriz extracelular fuertemente coloreada con safranina O (Fig. 1). Por el contrario, entre los tres discos de las muestras de control, no se comprobó la presencia de condrocitos, y se observó un tejido fibroso con células de naturaleza fibroblástica (Fig. 2), insuficiente para permitir la adhesión recíproca de los discos.

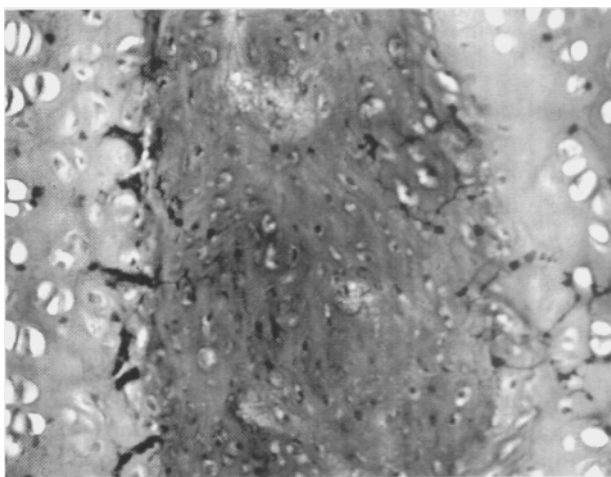


Figura 1. Preparados histológicos de una muestra experimental, procesada al final de la fase *in vivo* (safranina O; magnitud original: x200), donde se reconoce un neot Tejido cartilaginoso entre las matrices desvitalizadas.

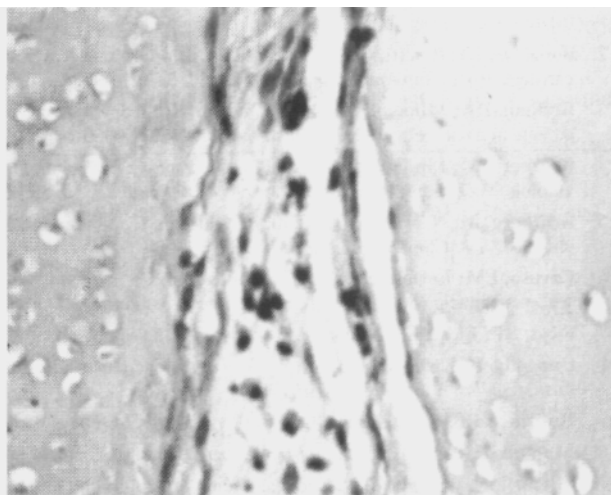


Figura 2. Preparados histológicos de una muestra de control, procesada al final de la fase *in vivo* (safranina-O; magnitud original: x200) que presenta un tejido fibroso interpuesto entre las matrices de soporte.

Tabla. Estudio de la capacidad adhesiva del neot Tejido

Días	Grupo experimental Adhesión	Grupo de control Adhesión
7	0/40 (0%)	0/40 (0%)
14	14/40(35%)	0/40 (0%)
21	32/40 (80%)	0/40 (0%)
28	40/40(100%)	0/40 (0%)
42	40/40(100%)	0/40 (0%)

Se representa la relación entre el número de las superficies unidas recíprocamente por acción del neot Tejido y el número de superficies totales por cada período experimental; entre paréntesis, los correspondientes valores porcentuales.

Discusión

La adhesión entre un tejido de reparación y el tejido limitante de un defecto condral representa el presupuesto fundamental para considerar válido un proceso de reparación en las lesiones del cartílago articular.^{2,9,12,13} El método de trasplante de condrocitos autólogos también debe ajustarse a esta regla.

Hemos estudiado la capacidad de adhesión y de reparación de los condrocitos en discos de matriz cartilaginosa desvitalizada, de manera que el único elemento vital en el interior de los cultivos fueran los condrocitos aislados, objeto de nuestro experimento.

El proceso de desvitalización de la matriz permitió evitar la influencia de las células contenidas en estos cartílagos sobre los resultados obtenidos.

El adhesivo de fibrina utilizado (presentado bajo la forma de gel de escasa consistencia) permitió el ensamblado de los tres discos cartilaginosos del compuesto, manteniéndolos uno sobre el otro, pero sin adherirlos.

El estudio *in vivo* de nuestro modelo se realizó utilizando ratones atómicos, para asegurar la ausencia de respuesta inmunitaria heteróloga (muestras tomadas de corderos e implantadas en ratones), simulando un modelo de trasplante autólogo.

La valoración de la capacidad adhesivo-reparativa de los condrocitos aislados mostró un incremento constante de los valores registrados en los distintos tiempos; se comenzó a manifestar el día 14 del implante (35%) hasta alcanzar el valor máximo de adhesividad (100%) el día 28.

A nuestro parecer, la obtención de iguales resultados el día 42 (100%) valoriza estos hallazgos, y demuestra la reproducibilidad del modelo.

Los compuestos de control mostraron, por el contrario, ausencia de adhesividad entre los discos, lo que demuestra que la capacidad adhesivo-reparativa es dependiente únicamente del neocartílago producido en la fase *in vitro*, y sucesivamente, *in vivo* por parte de los condrocitos aislados presentes en las muestras experimentales. La presencia de condrocitos aislados representa la única diferencia entre las muestras experimentales y los controles.

El estudio histológico de los preparados reveló la neoformación de tejido cartilaginoso por parte de los condrocitos aislados y sucesivamente cultivados *in vitro*. Este tejido mostró una morfología normal y una intensa coloración con safranina O.

El tejido fibroso con células de naturaleza fibroblástica entre los discos de matriz desvitalizada en las muestras de control se coloreó en forma incompleta con la safranina O, debido a la ausencia de glicosaminoglicanos. Esto se originó por el huésped (ratón atómico), debido a que en los cultivos preimplante, no existían elementos celulares vitales.

Conclusiones

Podemos concluir que los condrocitos aislados, expandidos *in vitro* y trasplantados *in vivo*, están en condiciones de producir matriz cartilaginosa con la propiedad de "adhesivo biológico". Por lo tanto, bajo las condiciones descritas, poseen capacidad adhesivo-reparativa, uno de los requisitos fundamentales para su empleo en la reparación de las lesiones del cartílago articular.

Referencias bibliográficas

1. Bentley, G, y Green, RB: Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular chondrocytes into joint surfaces. *Nature*, 230: 385-388, 1971.
2. Bonassar, LJ; Peretti, GM; Caruso, EM; Randolph, MA, y Zaleske, DJ: Biomechanical analysis of a cell-based model of integrated cartilage repair. *Sup Ann Biomed Eng*, 25 (1): S-79, 1997.
3. Breinan, HA; Minas, T; Hsu, U-P; Nehrer, S; Sledge, CB, y Spector, M: Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *JBone Jt Surg (Am)*, 79: 1439-1451, 1997.
4. Brittberg, M; Lindahl, A; Nilsson, A; Ohlsson, C; 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.
5. Brittberg, M; Nilsson, A; Lindahl, A; Ohlsson, C, y Peterson, L: Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop*, 326: 270-283, 1996.
6. 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.
7. Ficat, RP; Ficat, C; Gedeon, P, y Toussaint, JB: Spongialization. A new treatment for diseased patellae. *Clin Orthop*, 144: 74-83, 1979.
8. Hangody, L; Kish, G; Karpatis, Z, y cols.: Autogenous osteochondral graft technique for replacing knee cartilage defects in dogs. *Orthopaedics*, 5 (3): 175-181, 1997.
9. Hunziker, EB, y Rosenberg, LC: Biological basis of repair of superficial articular cartilage lesions. *Trans Orthop Res Soc*, 17: 231, 1992.
10. Mankin, HJ: The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Jt Surg (Am)*, 64: 460-466, 1982.
11. Mitchell, N, y Shepard, N: The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforation through the subchondral bone. *J Bone Jt Surg (Am)*, 58: 230-233, 1976.
12. 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.
13. Peretti, GM; Randolph, MA; Caruso, EM; Rossetti, F, y Zaleske, DJ: Bonding of cartilaginous matrices with cultured chondrocytes: an experimental model. *J Orthop Res*, 16: 89-95, 1998.