

INVESTIGACION

Propiedad biomecánica del neotejido cartilaginoso sintetizado por condrocitos sembrados en matriz alogénica desvitalizada

GIUSEPPE M. PERETTI,^{1,2} LAWRENCE J. BONASSAR,³ MARK A. RANDOLPH,¹
FULVIO RAZZA,⁴ GUILLERMO MACÍAS,⁴ ILARIA PAPINIZORLI³ Y WALTER ALBISETTI⁵

¹Plastic Surgery Research Laboratories, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

²Orthopaedic Department, San Raffaele Hospital, Milán, Italy

³Center for Tissue Engineering, UMass Medical Center, Worcester, MA, USA

⁴Hospital Cosme Argerich, Buenos Aires, Argentina

⁵Istituto di Clínica Ortopédica, Milano, Italia

RESUMEN: El presente estudio valora la capacidad biomecánica del neotejido cartilaginoso, sintetizado por condrocitos sembrados en una matriz alogénica. El cartílago se extrae de articulaciones de corderos jóvenes y se corta en discos que serán desvitalizados mediante sucesivos ciclos de congelamiento y descongelamiento. Los condrocitos articulares fueron aislados por digestión enzimática y cultivados durante 3 semanas con los discos desvitalizados. Los discos portadores de condrocitos fueron colocados yuxtapuestos de a pares y envueltos por un gel de adhesivo de fibrina. Luego se trasplantaron al tejido subcutáneo de ratones atímicos. Los animales fueron sacrificados a la primera y cuarta semanas y los compuestos cartilagosos fueron evaluados mediante el examen macroscópico e histológico y sometidos a tests biomecánicos. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron diferencias significativas en los valores de esfuerzo elástico máximo, deformación máxima, energía de fractura y módulo de elasticidad de los compuestos experimentales en relación con las muestras control, constituidas por discos desvitalizados cultivados en ausencia de condrocitos.

El examen histológico demostró que los condrocitos sembrados en los discos de cartílago desvitalizado permiten la adhesión de las muestras de matriz mediante la formación de un neotejido cartilaginoso.

PALABRAS CLAVE: Cartílago. Biomecánica. Condrocitos sembrados.

BIOMECHANICAL PROPERTIES OF NEO-CARTILAGINOUS TISSUE, SYNTHESIZED BY CHONDROCYTES SEEDED ONTO ALLOGENIC MATRIX

ABSTRACT: The present study analyzes the biomechanical properties of neo-cartilaginous tissue, synthesized by chondrocytes seeded onto allogenic matrix. Cartilage tissue was harvested from young lambs joints, shaped into discs, which were devitalized by freeze/thaw cycles. Articular chondrocytes were isolated by enzymatic digestion and cultured for three weeks with the devitalized discs. Pairs of seeded discs were assembled together, wrapped into a fibrin glue, and transplanted into subcutaneous pockets of nude mice. Animals were sacrificed at 1 and 4 weeks from implantation. Samples were evaluated by macroscopic and histological analysis and by biomechanical test. Results from the present study demonstrated significant difference in values of tensile strength, fracture strain, fracture energy and modulus between the experimental samples and the controls, which were made of devitalized discs, cultured in absence of cells.

Histological evaluation demonstrated that seeded chondrocytes allowed adhesion of devitalized discs by the synthesis of newly formed cartilaginous tissue.

KEY WORDS: Cartilage. Biomachine. Seeded chondrocytes.

Recibido el 24-4-02. Aceptado luego de la evaluación el 13-6-02

Correspondencia:

Dr. GIUSEPPE M. PERETTI
Via Gubbio, 10
20122, Milano - Italia
E-mail: gperetti@iol.it

Los defectos del cartílago articular tienen limitada capacidad de reparación espontánea. El tejido reparativo que se origina está constituido a menudo por tejido fibrocartilaginoso y presenta propiedades biomecánicas inferiores al tejido originario. La mayoría de las veces esto es responsable de la degeneración precoz artrósica de la articulación comprometida.^{1,11}

El trasplante de condrocitos autólogos^{1,2,5,6,8,17,19} fue propuesto recientemente como técnica para la reparación de las lesiones del cartílago articular en el hombre. El interés en este tipo de adelanto se basa en la posibilidad de la alta capacidad de expansión de estas células in vitro. No obstante, el buen resultado de dicha técnica no dependerá sólo de la capacidad de los condrocitos aislados de producir nueva matriz cartilaginosa, sino también de la eficacia en la adhesión del neot tejido al cartílago preexistente⁷ y de la capacidad biomecánica del tejido de reparación.

Estudios precedentes in vitro demostraron la propiedad de cohesión del cartílago vital¹⁶ y la capacidad de los condrocitos aislados enzimáticamente de adherirse a la matriz cartilaginosa desvitalizada.^{1,4} Estos hechos sugieren que los condrocitos cultivados sobre matriz cartilaginosa desvitalizada in vitro pueden producir nueva matriz cartilaginosa inmadura, pero la capacidad de estos condrocitos de reparar cartílago in vivo no es todavía clara.

Hendrickson y cols, demostraron que los condrocitos trasplantados en adhesivo de fibrina producen proteoglicanos y colágeno de tipo II,⁶ lo que permite el mantenimiento de la función biológica y de la expresión fenotípica de las células. Estudios precedentes demostraron que los condrocitos articulares, sembrados previamente sobre matriz cartilaginosa, sintetizan in vivo neot tejido cartilaginoso con propiedades adhesivas.^{11,14,15}

El presente estudio describe el uso de polímeros naturales, como el adhesivo de fibrina, para el ensamblaje de compuestos de matriz y condrocitos, en la evaluación del proceso de reparación del cartílago articular. Los objetivos de este estudio son indagar la capacidad de los condrocitos de adherir y remodelar la matriz cartilaginosa desvitalizada, y valorar la propiedad biomecánica de la adhesión entre los tejidos mediante tests específicos.

Material y método

a) Procesamiento e implante de las muestras

En condiciones de esterilidad, se extrajeron cilindros de cartílago articular de hombro, rodilla y cadera de corderos de 2 semanas de vida, mediante el uso de un trocar. De esas tomas se fabricaron discos cartilaginosos regulares de 5 mm de diámetro y de 1 a 1,5 mm de espesor. Los discos de cartílago fueron sometidos a ciclos repetidos de congelamiento y descongelamiento para desvitalizarlos. Al término de dichos pasajes se valoró la vitalidad de los condrocitos mediante la coloración con Trypan blue (Trypan blue 0,2% Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EE.UU.) y coloración de fluorescencia,^{3,12} sin que se evidenciara la presencia de ningún elemento celular vital.

Sucesivamente se extrajeron secciones de cartílago articular de animales de la misma especie que fueron digeridas en medio de HAM F12 (GibcoBRL, Life Technologies Inc. Grand Island, NY, EE.UU.) que contenía 0,075% de colagenasa tipo II (Worthington Biochemi-

cal Co. Freehold, NJ, EE.UU.) durante 12 horas para aislar los condrocitos. La suspensión que contenía los condrocitos fue centrifugada a 1.500 rpm durante 10 minutos y el conteo celular se realizó mediante un hemocitómetro. La vitalidad de los condrocitos se constató superior al 90%, evaluada mediante la coloración con Trypan blue.

El cultivo de los condrocitos obtenidos con la matriz alógena desvitalizada se efectuó colocando dos discos de matriz en cultivo con una solución condricitaria de 106 células/ml en probetas de 15 ml (Corning, NY, EE.UU.) con 5 ml de medio (HAM F 12 médium con Glutamax-1) (GibcoBRL, Life Technologies Inc.) El medio fue suplementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma Chemical Co.), 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma Chemical Co.) con solución de antibiótico/antimicótico al 1% (10.000 U de penicilina, 10 mg de estreptomicina y 25 µg de anfotericina B/ml en 0,9% de solución de cloruro de sodio) (Sigma Chemical Co.) y glutamina 292 mg/l (L-Glutamina, Fisher Biotech Fair Lawn, NJ, EE.UU.) durante 21 días.

Muestras idénticas de control, sin condrocitos en el interior de las probetas, fueron mantenidas en las mismas condiciones de cultivo.

Al término del período de cultivo, los compuestos fueron ensamblados colocando 0,3 g de adhesivo de fibrina alrededor de dos discos de cartílago articular. El adhesivo se compone de la combinación de fibrinógeno bovino, fracción I (Sigma Chemical Co.) y trombina (Thrombin, Topical USP Thrombogen; Johnson & Johnson, Medical Inc., Arlington, TX, EE.UU.).

Para este estudio se prepararon 24 compuestos experimentales y 12 de control.

El implante en los ratones atómicos de los compuestos matriz-condrocitos se efectuó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Los compuestos fueron implantados en tres bolsillos subcutáneos del dorso de los ratones.

Cada animal recibió un compuesto de control y dos experimentales, dispuestos casualmente, uno a nivel caudal y dos a nivel craneal. En este estudio se utilizaron 12 ratones, divididos en dos tiempos experimentales. Los compuestos cartilaginosos fueron extraídos a la primera y a la cuarta semanas y evaluados según referiremos en los ítem siguientes.

b) Tests biomecánicos y análisis estadístico

Después de su extracción, los compuestos se colocaron temporariamente en PBS, a temperatura de 4°C, por alrededor de 4 horas para luego someterlos a la evaluación biomecánica. Inmediatamente antes de testarlos, se eliminó la cápsula fibrosa que circundaba al compuesto para permitir el acceso directo al tejido. Se midieron el espesor y el diámetro de cada muestra: el espesor varió entre 2,5 y 4,5 mm, mientras que el diámetro era de unos 5 mm, similar al del trocar usado para cortar los discos.

Posteriormente cada superficie plana del compues-

to fue encolada a la extremidad de dos cilindros de plexi-glass, usando aproximadamente 20 μ l de adhesivo de contacto y los cilindros se colocaron en las morsas de un espectrómetro servohidráulico Dynastat (IMASS, Hingham, MA). Antes de proseguir con el test, se utilizó una pequeña cantidad de PBS (<1 ml), para prevenir su deshidratación. Se aplicó luego a los dos discos una distracción constante de 4-10 mm/s, igual a un grado de deformación de 0,15%/s de toda la muestra y la carga resultante se registró en una computadora. Los datos fueron registrados a la velocidad de 5 puntos/segundo. Se prosiguió con la distracción hasta la fractura de la muestra, evidenciada por la simple observación de la separación de los discos o cuando la carga medida era <0,05 N.

La distracción aplicada y la carga resultante fueron normalizadas respectivamente al espesor y al área de las muestras. Usando estos datos se elaboró una curva de carga para cada muestra. De dicha curva de carga se determinaron el esfuerzo elástico máximo (sUTS) como máximo esfuerzo soportado por la muestra; la deformación máxima (ef) representada por el punto de deformación a partir del cual no se verificaron valores de esfuerzo más elevados; la energía de fractura (Ef) definida como el área debajo de la curva de carga hasta la fractura. El módulo de elasticidad (M) para cada muestra se calculó como la pendiente de la porción lineal de la curva de carga.

Para aceptar que las muestras experimentales y las de control fueran significativamente diferentes para cada test, de las cuatro propiedades biomecánicas, se efectuó en los dos tiempos experimentales el test de t-Student a dos colas, para datos no apareados.

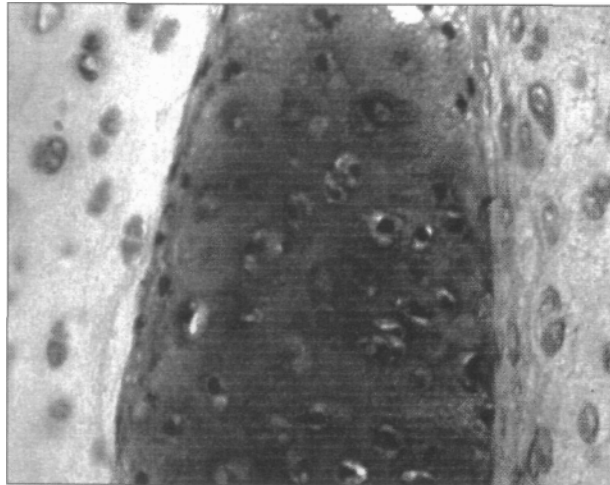


Figura 1. Sección histológica (coloración con safranina-O, magnificación $\times 200$) de una muestra experimental, 4 semanas después del implante en un ratón atímico. Dos discos de matriz desvitalizada son visibles a ambos lados, derecho e izquierdo, de la imagen (coloración más clara). Se identifican al centro de la imagen, condrocitos vitales productores de matriz cartilaginosa, bien coloreados con safranina-O. Este tejido representa la fusión de las dos superficies de crecimiento tisular, proveniente de los condrocitos sembrados sobre los discos desvitalizados.

c) Análisis histológico

Algunas muestras fueron elegidas al azar y sometidas al examen histológico después de su extracción de los ratones. Fueron fijadas con una solución de formalina al 10% e incluidas en parafina. Se realizaron secciones de 5 mm de espesor y se colorearon con safranina-O.

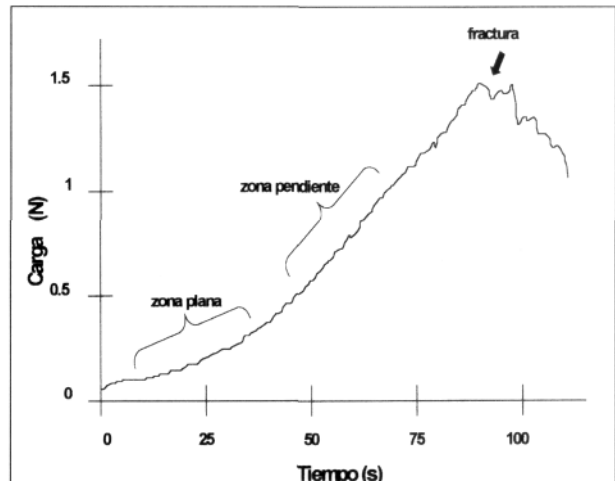


Figura 2. Típica curva de carga representada por una zona plana inicial, seguida por una zona de pendiente, hasta producirse la fractura de la muestra que corresponde al ápice de la curva. En la zona correspondiente a la pendiente se calcula el módulo de elasticidad.

Resultados

El análisis histológico de las muestras evidenció que los condrocitos adheridos a la matriz desvitalizada produjeron nueva matriz cartilaginosa y se constató la fusión completa entre los dos estratos de la neomatriz de las muestras experimentales, evaluadas luego de los 28 días del implante (Fig. 1). Además, el estrato de adhesivo de fibrina, observado a los 7 días, fue sustituido por la formación de matriz nueva.

No se observó ningún tipo de formación de nueva matriz en las muestras del grupo control, sino que el espacio entre los discos de cartílago fue invadido por tejido fibroso.

El análisis biomecánico de los compuestos demostró un comportamiento similar a las propiedades de un tejido blando.

Ante una pequeña deformación (<5%), las muestras evidenciaron una zona plana de la curva de carga donde la muestra era todavía relativamente plástica, seguida de una zona lineal más pendiente, sobre la cual se calculó el módulo de elasticidad (Fig. 2). Las propiedades mecánicas, calculadas del comportamiento de la curva de carga, aumentaron significativamente en el tiempo para las muestras cultivadas con células, mientras que las correspondientes a las muestras control no se modificaron. A las 4 semanas la fuerza tensil (Fig. 3A) fue 37 ± 13 kPa,

5 veces superior respecto de las de control ($p < 0,01$); la deformación máxima (Fig. 3B) era $8 \pm 3\%$, 7 veces mayor respecto de las de control ($p < 0,02$); la energía de fractura (Fig. 3C) era $10,7 \pm 5$ dinas, 24 veces mayor respecto de las de control ($p < 0,02$); y el módulo de elasticidad (Fig. 3D) fue de $0,5 \pm 0,17$ Mpa, 1,5 veces superior al control ($p = 0,60$).

brina fue sustituido gradualmente por neot Tejido cartilaginoso, hasta la fusión completa de los tejidos, evidenciada a las 4 semanas (Fig. 1).

La investigación ha sido realizada no sólo para evaluar la importancia de las propiedades del neocartilago formado, sino también para cuantificar esas propiedades a nivel de la interfaz entre el tejido portador y el neot Tejido.

La adhesión de los implantes de cartilago con la matriz nativa es un factor fundamental en la reparación de los defectos del cartilago. Todos los estudios sobre defectos focales del cartilago resaltan la dificultad de integración entre los dos tejidos.

En nuestro estudio, la unión de la interfaz entre el nuevo tejido y la matriz desvitalizada va incrementándose con el tiempo y demuestra un remodelado del neocartilago, sobre todo después que el adhesivo de fibrina, presente entre los dos discos, fuera sustituido por el neot Tejido.

Las propiedades biomecánicas de los compuestos a las 4 semanas resultaron del 4-8% de los valores normales del cartilago articular^{9,10,18,20} y de alrededor de 1,5 a 24 veces superiores a los del control.

El valor levemente superior al cero en las muestras de control se debió a la adherencia del adhesivo de fibrina y a la integridad de residuos de la cápsula fibrótica producida por el animal receptor. Esta participación puede considerarse significativa, como queda ejemplificado por las mediciones del módulo de elasticidad (Fig. 3D), en las que los controles demostraban un valor $M = 0,32$ MPa a las 4 semanas.

Los resultados del presente estudio demuestran que los condrocitos trasplantados tienen la capacidad de adherirse al cartilago desvitalizado y sintetizar neomatriz in vivo. Los condrocitos poseen la capacidad de reparar y remodelar la matriz cartilaginosa confiriendo capacidad biomecánica al neot Tejido con excepción del módulo de elasticidad, probablemente por la participación de la cápsula fibrosa en el momento de la evaluación. El nivel de las funciones biomecánicas informadas en este modelo es alentador y demuestra que todas las propiedades se incrementan con el tiempo. Estos hechos estimulan a desarrollar estudios ulteriores con mayor tiempo de seguimiento,

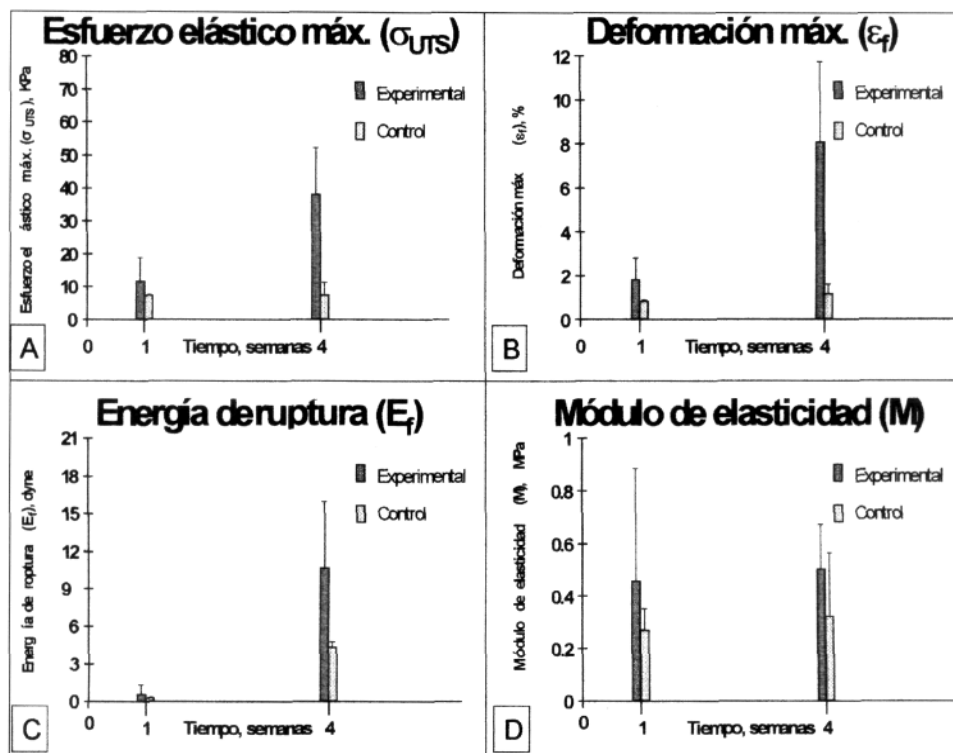


Figura 3. Progresión de los cambios en el tiempo del esfuerzo elástico máximo (A), deformación máxima (B), energía de fractura (C) y módulo de elasticidad (D) a las semanas 1 y 4, en los compuestos cultivados con los condrocitos y los controles in vivo. Todos los datos son representados como valores medios \pm desviación estándar.

Discusión

En este estudio se evalúa la capacidad biomecánica del neot Tejido cartilaginoso formado a partir de condrocitos aislados enzimáticamente y cultivados con cartilago desvitalizado.

La ausencia de coloración con Trypan blue y fluorescencia en el control de la matriz desvitalizada confirma la ausencia de condrocitos vitales y, por lo tanto, que en el proceso de reparación tisular el tejido desvitalizado previamente no tuvo participación. Excluida dicha participación, este estudio permite evaluar la capacidad adhesiva del tejido producido por los condrocitos sembrados. Las células dispuestas sobre la matriz desvitalizada dieron origen a un estrato de nueva matriz, aumentando su espesor progresivamente hasta el contacto con el neot Tejido yuxtapuesto, producido por la superficie del disco adyacente.

En forma simultánea, el estrato de adhesivo de fi-

en los que puedan producirse muestras con propiedades y características superiores; no obstante debe destacarse que el presente estudio fue realizado en un ambiente subcutáneo, vascular y no sometido a carga. Los resultados pueden considerarse positivos, ya que demuestran la capacidad de los condrocitos trasplantados de adherirse y

remodelar la neomatriz cartilaginosa.

Estudios futuros analizarán dicho modelo en un ambiente que reproduzca las condiciones presentes en un ambiente articular, para evaluar su potencialidad en esa situación y considerar así su eventual aplicación clínica.

Referencias bibliográficas

1. **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.
2. **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.
3. **Caruso, EM; Lewandrowski, KU; Ohlendorf, C; Tomford, WW y Zaleske, DJ:** Repopulation of laser-perforated chondroepiphiseal matrix with xenogeneic chondrocytes: an experimental study. *J Orthop Res*, 14: 102-107, 1996.
4. **Chen, AC; Johnson, EB; Nagrampa, JP; Sheeter, LM y Sah, RL:** The effect of static loading on proteoglycan biosynthesis by chondrocytes transplanted to articular cartilage in vitro. *Trans Orthop Res Soc*, 22: 201, 1997.
5. **Grande, DA; Singh, U y Pugh, J:** Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *Anatomical Records*, 218: 142-148, 1987.
6. **Hendrickson, DA; Nixon, AJ; Grande, DA; Todhunter, RJ; Minor, RM; Erb, H y Lust, G:** Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res*, 12: 485-497, 1994.
7. **Hunziker, EB y Rosenberg, LC:** Biological basis of repair of superficial articular cartilage lesions. *Trans Orthop Res Soc*, 17: 231, 1992.
8. **Itay, S; Abramovici, A y Nevo, Z:** Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop*, 220: 284-303, 1987.
9. **Jeffrey, JE; Gregory, DW y Aspden, RM:** Matrix damage and chondrocyte viability following a single impact load on articular cartilage. *Aren Biochem Biophys*, 322: 87-96, 1995.
10. **Kempson, GE:** Age-related changes in the tensile properties of human articular cartilage: a comparative study between the femoral head of the hip joint and the talus of the ankle joint. *Biochim Biophys Acta*, 1075: 223-230, 1991.
11. **Mankin, HJ:** The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Jt Surg (Am)*, 64: 460-466, 1982.
12. **Ohlendorf, C; Tomford, WW y Mankin, HJ:** Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. *J Orthop Res*, 14: 413-416, 1996.
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 (1): 89-95, 1998.
14. **Peretti, GM; Razza, F; Macías, G; Caruso, EM y Albisetti, W:** Estudio de la actividad mitótica entre las fases in vitro e in vivo en el trasplante de condrocitos. *Rev Asoc Arg Ortop y Traum*, 65 (4): 306-310, 2000.
15. **Peretti, GM; Razza, F; Macías, G; Randolph, MA; Frascini, GF y Zaleske, DJ:** Capacidad adhesivo-reparativa de condrocitos articulares aislados y trasplantados in vivo. *Rev Asoc Arg Ortop y Traum*, 66 (4): 297-300, 2001.
16. **Reindel, ES; Ayroso, AM; Chen, AC; Chun, DM; Schinagl, RM y Sah, RL:** Integrative repair of articular cartilage in vitro: Adhesive strength of the interface region. *J Orthop Res*, 13: 751-760, 1995.
17. **Sams, AE y Nixon, AJ:** Chondrocyte-laden collagen scaffold for resurfacing extensive articular cartilage defects. *Osteoarthr Cartil*, 3: 47-59, 1995.
18. **Setton, LA; Mow, VC; Müller, FJ; Pita, JC y Howell, DS:** Mechanical properties of canine articular cartilage are significantly altered following transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res*, 12: 451-463, 1994.
19. **Shortkroff, S; Barone, L; Hsu, HP; Wrenn, C; Gagne, T; Chi, T; Breinan, H; Minas, T; Sledge, CB; Tubo, R y Spector, M:** Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 17: 147-154, 1996.
20. **Woo, SL-Y; Akeson, WH y Jemmot, GF:** Measurements of nonhomogeneous, directional mechanical properties of articular cartilage in tensión. *J Biomech*, 9: 785-791, 1976.