

# Terapia celular en lesiones meniscales: un estudio en grandes animales

## SEGUNDA PARTE

\*,\*\*GIUSEPPE M. PERETTI, \*THOMAS J. GILL, \*JIAN W. XU, \*MARK A. RANDOLPH,

\*\*GIANFRANCO FRASCHINI y \*DAVID J. ZALESKE

\*Massachusetts General Hospital Harvard Medical School, Boston, EE. UU.

\*\*Università Vita-Salute, Ospedale San Raffaele, Milano, Italia

**RESUMEN:** El presente estudio analiza la potencialidad de una "terapia celular" para emplear en la reparación de la zona avascular del menisco, en un modelo experimental de grandes animales. Fueron sembrados condrocitos articulares, aislados por digestión enzimática de fragmentos de cartílago extraídos de cerdos Yorkshire, en porciones de cartílago meniscal como soporte. Se practicaron lesiones meniscales en asa de balde en 12 animales y sucesivamente se repararon mediante la interposición y sutura del soporte sembrado con condrocitos autólogos (grupo A: 3 animales). Se prepararon otros tres grupos de control. En el grupo B, las lesiones fueron tratadas mediante la interposición del soporte privado de células; en el grupo C, las lesiones fueron tratadas con sutura simple; mientras que las lesiones en el grupo D fueron dejadas sin tratamiento. Los animales fueron sacrificados luego de las 9 semanas y los meniscos se analizaron macroscópica e histológicamente. Los resultados demostraron una buena integración entre el soporte sembrado con condrocitos y los márgenes de las lesiones meniscales, que resultaron reparadas en numerosas áreas, en los animales del grupo experimental A; mientras que ningún grado de reparación pudo evidenciarse en ninguna de las muestras de los grupos control.

**PALABRAS CLAVE:** Reparación meniscal. Adhesión meniscal. Trasplante de condrocitos. Zona avascular. Soporte sembrado. Grandes animales.

### CELL-BASED THERAPY FOR MENISCAL LESION: A STUDY ON LARGE ANIMALS

**ABSTRACT:** The present study analyzes the potential of a cell-based therapy to repair the avascular area of the meniscus in a large animal model. Articular

chondrocytes were enzymatically isolated from cartilage fragments harvested from Yorkshire pigs. Cells were seeded onto meniscal slices, used as scaffold. Bucket-handle lesions were made in 12 animals, and then repaired by interposition and suture of the scaffold seeded with autologous cells (group A: 3 animals). Three control groups were prepared. In group B, lesions were treated by the interposition of unseeded scaffold. In group C, lesions were treated with a simple suture. In group D, lesions were left untreated. Animals were slaughtered after 9 weeks and menisci were analyzed macroscopically and histologically. Results showed good integration in several areas between the seeded scaffold and the lesion margins in the experimental group A animal. On the other hand, no signs of repair were noted in the control samples.

**KEY WORDS:** Meniscus repair. Meniscus healing. Chondrocyte transplantation. Avascular area. Seeded scaffold. Large animal.

El fibrocartílago meniscal, así como la hialina articular, posee limitada capacidad reparadora a causa, al menos en parte, de la escasa vascularización y de la reducida capacidad de reclutar elementos celulares para la reparación. La función de los meniscos, descritos alguna vez como residuos de los músculos de la pierna, privados de función,<sup>3</sup> resulta crucial en la biodinámica de la rodilla<sup>2</sup> y su importancia está bien demostrada, tanto en su participación en la estabilidad como en la capacidad de absorber el efecto de shock al que la rodilla se ve sometida.<sup>5,11</sup> Por otra parte, estudios sobre biomecánica de la rodilla demostraron que la presión de contacto entre los componentes articulares aumenta notablemente a consecuencia de una meniscectomía,<sup>10</sup> y que el área de contacto disminuye aproximadamente un 50% en la rodilla meniscectomizada.<sup>10</sup> Esto provoca un aumento de la carga por unidad de superficie y compromete inevitablemente la integridad de la superficie articular.<sup>4,6</sup> Por lo expuesto, las cirugías de meniscectomía total o parcial fueron estrechamente asociadas con el desarrollo de una degeneración artrósica precoz de la rodilla.

Recibido el 10-10-2001. Aceptado luego de la evaluación el 10-12-2001

Correspondencia:

Dr. GIUSEPPE M. PERETTI

Via Gubbio, 10

20122 Milano, Italy

Teléfono: +39-02 58318124//+1-617 7266943

E-mail: gperetti@iol.it

Investigadores clínicos y de ciencia básica intensificaron sus esfuerzos en los últimos años con el afán de encontrar diversas estrategias para la protección y reparación de esta importante estructura. No obstante, la reparación meniscal representa aún un desafío, ya que el menisco está vascularizado sólo en su tercio externo y las lesiones que ocurren en los dos tercios internos rara vez tienden a la reparación espontánea.

En estudios anteriores hemos demostrado que los condrocitos aislados sembrados sobre un vehículo se encuentran en condiciones de permitir la adhesión de matriz cartilaginosa *in vivo*,<sup>7</sup> conservando su integridad biomecánica.<sup>8</sup> Sucesivos estudios demostraron la capacidad de los condrocitos de adherirse a la matriz cartilaginosa meniscal y permitir la reparación de lesiones localizadas en el tercio interno del menisco, en un estudio heterotópico en ratones atímicos.<sup>9</sup>

Sobre la base de los resultados precedentes, elaboramos la hipótesis en la cual los condrocitos articulares, vehiculizados en un soporte cartilaginoso, se encuentran en condiciones de permitir la adhesión de las superficies de una lesión en la zona avascular del menisco, en un modelo experimental con animales de gran talla.

El objetivo del presente estudio es analizar la capacidad de un vehículo biológico cartilaginoso, sembrado con condrocitos articulares, de reparar una lesión meniscal en asa de balde en un estudio ortotópico en cerdos.

meniscales fueron tratadas mediante cinco ciclos de congelamiento-descongelamiento, con el fin de eliminar los elementos celulares.

Se utilizaron luego 12 cerdos Yorkshire de 3 meses de edad para este estudio. Como referimos en la figura 1, se extrajeron fragmentos cartilaginosos de la tórclea femoral de la rodilla izquierda de los cerdos pertenecientes al grupo experimental. Los condrocitos fueron aislados mediante digestión enzimática (collagenase Type 2; Worthington Biochemical Co. Freehold, NJ, EE. UU.) y sembrados en cultivo con las secciones cartilaginosas meniscales previamente preparadas en medio de Ham F-12 (Cellgro, Mediatech, Renden, VA, EE. UU.) combinando 18 ml de medio y 2 ml de solución condrocitaria, en concentración de 106 células por mililitro.

Luego de la siembra *in vitro*, en una segunda cirugía utilizando una vía anteromedial, se accedió al menisco interno izquierdo, correspondiente al mismo cerdo del cual se habían aislado los condrocitos; se procedió a realizar una lesión en asa de balde a nivel de la unión entre el tercio interno y el tercio medio. El compuesto meniscal, previamente sembrado con los condrocitos, se suturó en el interior de la lesión, en tres cerdos pertenecientes al grupo experimental (grupo A). El mismo tipo de lesión se realizó en los otros cerdos: en tres, la lesión se trató suturando el implante meniscal, pero éste no fue sembrado con células (grupo B); en otros tres, la lesión se suturó sin interponer ningún tipo de material (grupo C); y en los últimos tres cerdos las lesiones fueron dejadas sin tratamiento (grupo D).

Todos los cerdos fueron sacrificados luego de 9 semanas y se extrajeron los meniscos para estudiar. Las muestras fueron examinadas macroscópicamente y luego de ser fijadas en formalina, se procesaron, seccionaron y colorearon con hematoxilina-eosina para su análisis histológico.

## Resultados

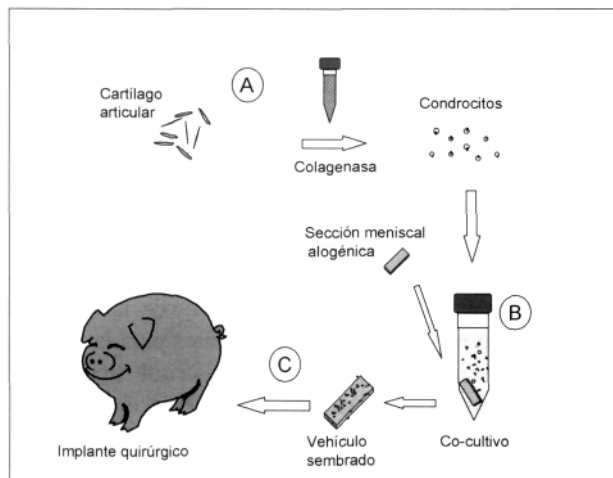
Los resultados evidenciaron macroscópicamente la reparación de los márgenes de las lesiones en las muestras del grupo A, en las cuales el implante se encontraba todavía presente en el lugar de la lesión. El análisis macroscópico de las muestras de control mostró la ausencia de algún tipo de reparación de las lesiones experimentales (Fig. 2).

El análisis histológico reveló una completa adhesión entre los márgenes de la lesión meniscal y el compuesto presembrado con condrocitos, en muchas áreas de las muestras meniscales del grupo A (Fig. 3); no obstante otras áreas de las mismas muestras presentaron una interrupción de la continuidad entre el compuesto y los márgenes de la lesión del menisco. Los cortes histológicos que mostraban la reparación evidenciaron la presencia de neomatriz cartilaginosa en el proceso reparador.

Por otra parte, en ninguna de las muestras de los grupos de control fue evidenciable algún tipo de reparación, ni la formación de neomatriz cartilaginosa.

## Discusión

El menisco es una importante estructura para la función de la rodilla y para salvaguardar la integridad de la superficie articular.



**Figura 1:**

Diagrama experimental: Los condrocitos articulares son aislados mediante digestión enzimática (A) y sembrados en una sección alogénica desvitalizada de matriz meniscal (B). El implante pre-sembrado se sutura en el interior de una lesión en asa de balde, producida en el mismo cerdo del que fueron obtenidos los condrocitos (C).

## Material y métodos

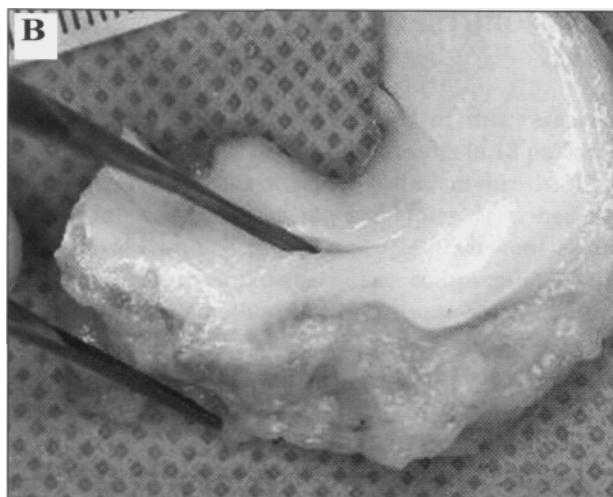
Secciones de tejido meniscal (10 mm x 2 mm x 0,5 mm) fueron obtenidas *in vivo* de meniscos de cerdos Yorkshire. Las muestras

Este trabajo analiza la capacidad de una "terapia celular" para reparar lesiones que involucren la zona avascular del menisco, en un estudio con animales de gran talla.

Basándonos en estudios precedentes que demostraron la capacidad de los condrocitos articulares aislados para reparar una lesión en la parte interna del menisco en un modelo heterotópico in vivo<sup>9</sup>, analizamos la posibilidad de aplicar este modelo in situ en grandes animales.

En el presente estudio, así como en el modelo precedente, se eligieron secciones meniscales alogénicas desvitalizadas como transporte de condrocitos autólogos.

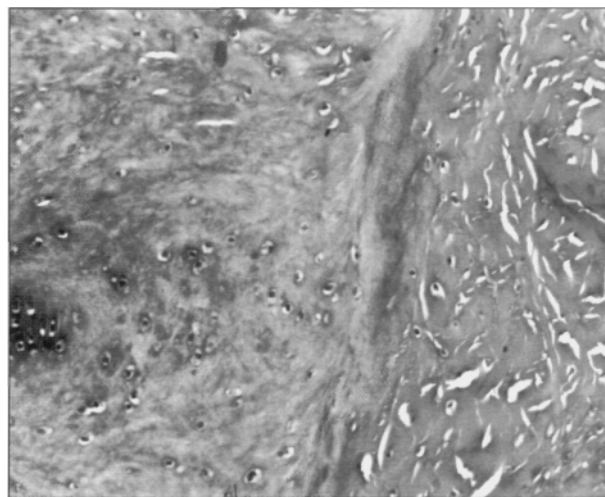
En este experimento demostramos que el compuesto constituido por el vehículo transportador y los condrocitos permite la reparación de lesiones meniscales en asa de balde, en la zona avascular de meniscos de cerdo.



**Figura 2.**

Análisis macroscópico. **A:** muestra experimental en la que se evidencia la adhesión de los márgenes de la lesión al compuesto presembrado con condrocitos. **B:** muestra control, que evidencia la persistencia de la lesión experimental.

Si bien la reparación obtenida no fue siempre homogénea, los resultados deben considerarse alentadores visto que una completa integración entre el implante y los márgenes de la lesión fueron documentadas en numerosas zonas, mediante la formación de neomatriz cartilaginosa. Entendemos que tales resultados representan una respuesta positiva a la posibilidad de la utilización de una "terapia celular" en la reparación de lesiones localizadas en el tercio interno del menisco, zona hasta hoy considerada privada de potencialidad reparadora. Ulteriores estudios permitirán determinar la fuerza de tal adhesión y analizar la influencia en el mecanismo de adhesión de factores tales como diversas condiciones de cultivo, diferentes células reparadoras y diferentes materiales para el transporte celular.



**Figura 3.**

Análisis histológico. Hematoxilina-eosina. Magnificación original: x 100.

Muestra experimental, a nivel de los límites entre la lesión meniscal (a la derecha) y el implante meniscal alogénico presembrado con condrocitos autólogos (a la izquierda). La buena integración se ve favorecida por la formación de neomatriz cartilaginosa, que actuaría como "adhesivo biológico".

### Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por el "Center for Innovative Minimally Invasive Therapy" (CIMIT). Los autores agradecen a los señores Kenneth Morse y Robert Roses por su ayuda en el desarrollo de esta experimentación. Un recuerdo y dedicación especial a la memoria de Christopher McAvoy, quien colaboró con entusiasmo en este proyecto. Los autores agradecen afectuosamente al Dr. Fulvio Razza por su valiosa colaboración en la elaboración del trabajo en español.

## Referencias bibliográficas

1. **Ahmed AM, Burke DL.** In vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints: Part I. Tibial surface of the knee. *J Biomech Eng* 1983;105:216-225.
2. **Arnoczky SP, Warren RE, Spivak JM.** Meniscal repair using an exogenous fibrin clot: an experimental study in dogs. *J Bone Jt Surg(Am)* 1988;70:1209-1217.
3. **Bland Sutton J.** *Ligaments, their nature and morphology.* Ed 2. London: HK Lewis; 1897.
4. **Cannon WD.** *Arthroscopic meniscal repair.* Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1999.
5. **King D.** The function of semilunar cartilages. *J Bone Jt Surg* 1936;18:1069-1076.
6. **LeRoux MA, Arokoski J, Vail TP, et al.** Simultaneous changes in the mechanical properties, quantitative collagen organization, and proteoglycan concentration of articular cartilage following canine meniscectomy. *J Orthop Res* 2000; 18:383-392.
7. **Peretti GM, Randolph MA, Caruso EM, et al.** Bonding of cartilage matrices with cultured chondrocytes: and experimental model. *J Orthop Res* 1998;6(1):89-95.
8. **Peretti GM, Bonassar LJ, Caruso EM, et al.** Biomechanical analysis of a cell-based model for articular cartilage repair. *Tissue Eng* 1999;5(4):317-326.
9. **Peretti GM, Caruso EM, Randolph MA, et al.** Meniscal fracture repair using engineered tissue. *J Orthop Res* 2001; 19(2):278-285.
10. **Seedhom BB, Hargreaves DJ.** Transmission of the load in the knee joint with special reference to the role of menisci: Part II. Experimental results, discussion and conclusions. *Eng Med* 1979;8:220-228.
11. **Voloshin AS, Wosk J.** Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study. *J Biomed Eng* 1983;5:157-161.