

INVESTIGACIÓN

Cultivo de condrocitos sobre una matriz acelular derivada de membrana amniocoriónica

JOSÉ MANUEL LUCERO, ALEJANDRO ENRIQUE CASTIGLIONI,
PAULA HOVANYECZ, ADRIÁN GORLA, OSCAR BERASATEGUI,
GRISELDA VALERIA FEDRIGO y ALICIA SUSANA LORENTI

Fundación Biotar. Banco de Tejidos. Rosario, Santa Fe

RESUMEN

Introducción: El tejido cartilaginoso articular presenta escasa capacidad regenerativa. Existe alta incidencia de lesiones condrales en la rodilla, especialmente de grado II/III (Outerbridge). El uso combinado de células autólogas cultivadas con membranas biológicas es una posibilidad terapéutica. El objetivo del presente trabajo es analizar las características del desarrollo in vitro de condrocitos humanos sobre una membrana amniocoriónica acelular (MAC) desecada.

Materiales y métodos: Entre diciembre de 2010 y diciembre de 2011 se procesaron 16 muestras de cartílago de donante vivo, de las cuales se analizaron siete. Los condrocitos fueron cultivados y amplificados sobre plástico, a partir de lo cual se realizaron los siguientes análisis: interacción entre células y MAC, capacidad de la MAC como matriz para las células y comportamiento de las células cultivadas sobre la MAC.

Resultados: Los condrocitos in vitro mostraron cambios fenotípicos en presencia de MAC. Las células fueron capaces de adherirse y permanecer en la región esponjosa de la membrana. La microscopía electrónica de las MAC cultivadas mostró la presencia de células, organelas celulares bien conservadas, retículo endoplásmico y uniones de tipo desmosoma.

Conclusiones: Este trabajo muestra la factibilidad de cultivar condrocitos sobre MAC. Las células fueron capaces de adherirse, permanecer y diferenciarse sobre la membrana durante el tiempo del estudio.

PALABRAS CLAVE: Membrana amniocoriónica. Lesiones condrales. Cultivo de condrocitos.

CULTURE OF CHONDROCYTES ON AN ACELLULAR MATRIX DERIVED FROM AMNIOCHORIONIC MEMBRANE

ABSTRACT

Background: Hyaline cartilage has only a very restricted capability of regeneration in the adult. The incidence of chondral lesions at the knee is high, especially those of Grade II/III (Outerbridge). Therapies combining cells and biological scaffolds are promising biological approaches for the treatment of cartilage defects. The aim of this study is to analyze the characteristics of in vitro culture of human chondrocytes on decellularized amniochorionic membrane (ACM).

Methods: Between December 2010 and December 2011, 16 samples of cartilage from a living donor were processed, but only 7 of them were analyzed. Chondrocytes were grown and amplified on plastic and on ACM. The following analyses were carried out with those cells: interactions between cells and ACM; ACM capacity as a matrix for cells; and behavior of cells cultured on ACM.

Results: In vitro chondrocytes exhibited phenotypic changes in the presence of ACM. The cells were able to adhere and remain on the spongy region of the membrane. Electron microscopy of cultured ACM showed cells, well preserved organelles, endoplasmic reticulum and desmosomes junctions.

Conclusions: The feasibility of culturing chondrocytes on ACM was shown in this work. The cells were able to adhere, remain and differentiate on this membrane during the study period.

KEY WORDS: Amniochorionic membrane. Chondral lesions. Chondrocyte culture.

Recibido el 2-8-2012. Aceptado luego de la evaluación el 15-9-2012.

Correspondencia:

Dra. ALICIA SUSANA LORENTI
alicia.lorenti@grupobiotar.com.ar

Introducción

Las lesiones condrales en los pacientes jóvenes representan un serio problema en la práctica ortopédica. Diversos estudios de prevalencia, epidemiología y etiología han demostrado que un 60% de los pacientes sometidos a artroscopias padecen defectos condrales u osteocondrales de rodilla, con mayor incidencia de lesiones de grados II y III (Outerbridge).¹⁻⁴

El tejido cartilaginoso articular (hialino) tiene muy escasa capacidad regenerativa. Dado que carece de vasos, los procesos inflamatorios y reparativos provenientes de la circulación sistémica no pueden actuar en casos de lesión. Por otra parte, a diferencia de otros tejidos, los condrocitos no migran al sitio de la lesión desde sitios vecinos sanos, porque están rodeados por una densa matriz extracelular.⁵

Con el objetivo de restablecer la superficie articular dañada, se han utilizado técnicas reparativas y regenerativas.⁶ Las técnicas reparativas, como la estimulación de la médula ósea con microperforaciones, tienen como objetivo reconstruir el defecto condral aliviando los síntomas, pero sin restablecer la arquitectura del cartílago articular hialino, ya que el tejido de reparación está formado predominantemente por colágeno de tipo I (fibrocartílago) de diferentes características biomecánicas, respecto del tejido nativo.⁷

Por otro lado, las técnicas regenerativas procuran la restitución completa de la microarquitectura del tejido, compuesto principalmente por colágeno de tipo II y glucoproteínas (cartílago hialino). Estas técnicas comenzaron usando el implante de condrocitos autólogos cultivados preparados como suspensión (*autologous chondrocytes implantation*, ACI) para el relleno de defectos condrales, y se logró la formación de cartílago hialino en mayor proporción que de fibrocartílago.⁸

Sin embargo, esta técnica presentó una importante limitación relacionada con la migración y, por consiguiente, la pérdida de los condrocitos del sitio del implante, a pesar de los intentos de contenerlos colocando un parche de periostio autólogo o de membranas de colágeno a modo de bolsillo para contener las células.

Tiempo después se propuso la utilización de condrocitos autólogos cultivados in vitro, pero no como suspensión, sino asociados a una matriz y el implante de este conjunto sobre la lesión (*matrix-associated autologous chondrocytes implantation*, MACI) utilizando para ello diversas matrices.⁹⁻¹¹

El objetivo del presente trabajo es analizar las características del desarrollo in vitro de condrocitos humanos sobre una membrana amniocoriónica (MAC) desecada acelular, procesada en nuestra institución, como soporte para el desarrollo celular in vitro, analizando las características fenotípicas y microscópicas.

Materiales y métodos

Entre diciembre de 2010 y diciembre de 2011, se procesaron 16 muestras de cartílago hialino obtenidas de segmentos óseos (cabezas femorales – platillos tibiales) provenientes de donantes vivos sometidos a un procedimiento de artroplastia. Los pacientes donantes del tejido osteoarticular utilizado en este estudio firmaron un consentimiento de donación y de autorización para el uso en trasplante e investigación.

Todos los procedimientos, desde la extracción de la muestra hasta las manipulaciones in vitro, se llevaron a cabo cumpliendo con las normas de bioseguridad correspondientes.

Los condrocitos se obtuvieron luego de 18 horas de digestión de las muestras de cartílago en colagenasa de tipo I 0,1%, a 37°C. La suspensión celular obtenida fue filtrada con filtros de 70 µm para eliminar restos de tejidos sin digerir y centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos. Luego del recuento celular y el cálculo de viabilidad, se sembraron las células sobre una superficie plástica para cultivo celular, con un inóculo inicial de 4×10^4 células/cm².

Con el objeto de amplificar la población celular, cuando se alcanzaba un 70%-80% de confluencia, se realizaban como máximo cuatro subcultivos (P1, P2, P3 y P4) con un inóculo de $0,3-0,8 \times 10^4$ células/cm².

De las 16 muestras ingresadas, se descartaron 9: 5 debido a contaminación y 4 destinadas a la puesta a punto de la técnica (optimización de la digestión enzimática del tejido, elección de la superficie por cultivar, inóculos iniciales sobre plástico y sobre MAC). Las 7 restantes se usaron para los experimentos mostrados en este trabajo.

Las MAC se obtuvieron a partir de placenta humana y se procesaron según los procedimientos operativos estandarizados bajo estrictas normas de bioseguridad, mediante diversos tratamientos antibióticos, seguidos de procesos de descelularización, desecación y esterilización por radiación gamma.

Se realizaron los siguientes experimentos:

1. Interacción entre las células cultivadas in vitro (superficie plástica) y la matriz biológica (MAC).

Con células subcultivadas provenientes de tres muestras se realizó dos veces el siguiente procedimiento: agregado de un segmento de MAC al medio de cultivo y retiro de este a las 48 horas con evaluación de la respuesta fenotípica celular mediante visión directa con microscopio óptico invertido.

2. Capacidad de la MAC como matriz de soporte para condrocitos.

Las células provenientes de los subcultivos se cultivaron sobre el lado coriónico (2 P2, 1 P3 y 2 P4) o amniótico (2 P2, 1 P3 y 1 P4) de la MAC con un inóculo de 1×10^6 células/cm². Se observó la incorporación de los condrocitos a la MAC mediante microscopía óptica (fijación: glutaraldehído al 4%; tinción: azul de metileno).

3. Comportamiento de las células cultivadas sobre el lado coriónico de la MAC.

Se cultivaron dos subcultivos (P3 y P4) sobre el lado coriónico con un inóculo de 1×10^6 células/cm², y se evaluaron las características celulares los días 2, 6 y 14 de incubación mediante microscopía electrónica de transmisión (fijación: glutaraldehído al 4%; tetróxido de osmio al 1%, corte con ultramicrotomo).

Resultados

1. Interacción entre las células cultivadas *in vitro* (superficie plástica) y la matriz biológica (MAC).

Cuando los condrocitos se cultivaron *in vitro* sobre plástico, inmediatamente después de adherirse a dicha superficie sufrieron un proceso de desdiferenciación, adquiriendo un fenotipo fibroblastoide y proliferaron con esas características (Fig. 1A).

Luego de 7 días en cultivo, al agregar un segmento de MAC (2 x 2 cm²) al medio de cultivo, las células cambiaron su fenotipo y adoptaron una morfología compatible con la de condrocitos diferenciados, aun cuando nunca hubo contacto físico directo entre las células y la MAC (Fig. 1B).

Este proceso de desdiferenciación y diferenciación se repitió en todas las ocasiones en que la MAC se agregó o se quitó del medio de cultivo (dos veces por cada una de las tres muestras).

2. Capacidad de la MAC como matriz de soporte para condrocitos.

En los experimentos de siembra de las células sobre MAC, la siembra se realizó cinco veces sobre el lado coriónico y cuatro sobre el amniótico. La observación en el microscopio óptico mostró que, independientemente del lado de siembra inicial, las células se ubicaron siempre en la capa esponjosa intermedia de la MAC. Ambas caras, amniótica y coriónica de la MAC, soportaron de manera comparable el desarrollo de los condrocitos (Fig. 2).

3. Comportamiento de las células cultivadas sobre el lado coriónico de la MAC.

La observación por microscopía electrónica de transmisión de las MAC sembradas con condrocitos sobre el lado coriónico, e incubadas durante 2, 6 y 14 días, mostró la presencia de células con organelas bien conservadas, retículo endoplásmico y uniones de tipo desmosoma en varias regiones de la unión entre las células. También se observaron vacuolas con microfibras que aumentaban de tamaño cuanto mayor era el tiempo de cultivo (Fig. 3).

Discusión

Las matrices biológicas son soportes adecuados para la adhesión de condrocitos, sirven como barrera física para mantener las células en la zona del defecto y limitan la migración de proteínas inflamatorias al sitio de reparación.¹²⁻¹⁵

Debe tenerse en cuenta que el fenotipo celular en cultivo puede y suele ser distinto del de las células *in vivo*. El ambiente que las células tienen *in vitro* no es fisiológico y es frecuente que, en esas condiciones, cambien su fenotipo, casi siempre hacia estadios menos diferenciados.¹⁶

En este trabajo, se han podido cultivar *in vitro* condrocitos de origen humano, y se observó el inmediato cambio del fenotipo condrogénico de esas células hacia un fenotipo fibroblastoide, producto del proceso de desdiferenciación (Fig. 1).

Esta observación coincide con los resultados de otros estudios.¹⁷ Zheng y cols., entre otros, mencionan que, en los cultivos de condrocitos sobre estructuras tridimensionales, se induce nuevamente la expresión de proteínas específicas de cartílago y las células recuperan el fenoti-

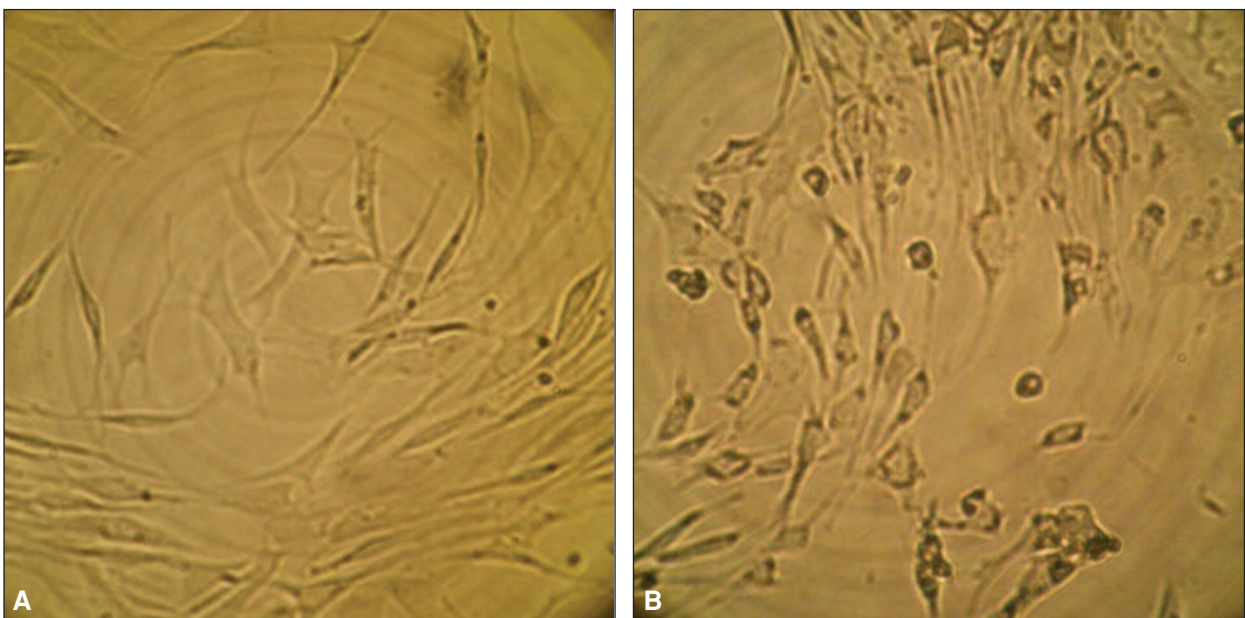


Figura 1. Células cultivadas sobre una placa plástica sin MAC (A, fenotipo fibroblastoide) o con MAC (B, fenotipo condrogénico).

po de condrocitos diferenciados, con buena integración a la matriz.^{17,18}

La estrecha relación que se establece entre la matriz y las células no es sólo producto del contacto directo entre ellas, sino que se producen también señales que son responsables de la dinámica de la relación entre ambas, que provocan los cambios fenotípicos observados en las células. Este efecto se ha mostrado en este trabajo cultivando las células adheridas al sustrato plástico, y cuando ya estaban desdiferenciadas, al agregar un pequeño segmento de MAC flotando en el medio de cultivo sin contacto directo con las células, se observó una morfología más esférica, que sugiere un fenotipo más diferenciado (Fig. 1). Este efecto de diferenciación-desdiferenciación se observó cada vez que la membrana fue agregada-quitada respectivamente del medio de cultivo.

A fin de optimizar los resultados, es importante que las matrices utilizadas para los procedimientos de MACI cuenten con determinadas características, como biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de soportar el cultivo celular, permitiendo la diferenciación y maduración de los condrocitos. Las membranas más usadas hasta ahora a nivel clínico son las derivadas de colágeno y de ácido hialurónico.⁸

Hace ya algunos años, en los bancos de tejidos, se comenzó a procesar la MAC, es decir, las membranas amniótica y coriónica en su conjunto como una unidad,¹⁹ lo cual le otorga a este material una estructura de mayor espesor y resistencia que la membrana amniótica sola, que también se ha utilizado en diversas aplicaciones clínicas.^{20,21} Se atribuyen a la MAC propiedades antimicrobianas y antifúngicas, baja inmunogenicidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad, lo que la hace sumamente atractiva para aplicaciones de ingeniería de tejidos.²²

En este estudio, se evaluó la capacidad de la MAC de sostener la adhesión y permanencia de condrocitos humanos sobre ella. Los resultados muestran que la MAC es una buena matriz de soporte (*scaffold*) para el cultivo de condrocitos, ya que las células pudieron adherirse y permanecer sobre su estructura tridimensional durante el tiempo que duró el estudio. Cabe destacar que no hay datos en la bibliografía acerca del cultivo de condrocitos humanos sobre MAC.

En los primeros experimentos de siembra de las células sobre MAC, esta se realizaba sobre el lado coriónico o amniótico. La observación en el microscopio óptico mostró que, independientemente del lado de siembra inicial, las células se ubicaban siempre en la capa esponjosa intermedia de la MAC (Fig. 2), con resultados similares.

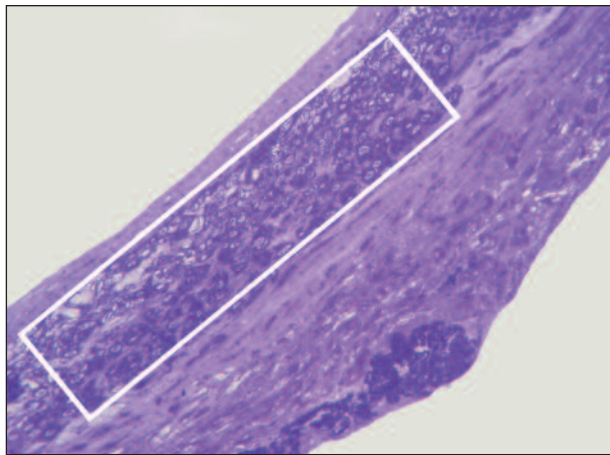


Figura 2. Condrocitos cultivados 6 días sobre MAC con un inóculo inicial de 1×10^6 células/cm², fijados con glutaraldehído al 4% y teñidos con azul de metileno. La región incluida en el rectángulo forma parte de la zona esponjosa donde se ubicaron los condrocitos.

La cara coriónica se seleccionó entonces arbitrariamente para estandarizar los experimentos de observación por microscopía electrónica.

El análisis por microscopía electrónica mostró que las células podían permanecer dentro de la estructura de la MAC durante todo el tiempo del estudio (entre 2 y 14 días), con organelas bien conservadas y formación de estructuras de novo, como uniones de tipo desmosoma. Estas características ultraestructurales, sumadas a las imágenes por microscopía óptica, muestran la capacidad de la MAC para sostener la permanencia de las células sobre ella y, por lo tanto, su utilidad como andamio (*scaffold*). Las vacuolas citoplasmáticas con microfibras contenidas en su interior podrían corresponder a fibras de colágeno sintetizadas por las células. Este hallazgo ha motivado un próximo estudio de investigación para su análisis e identificación.

Conclusiones

La MAC aparece como un material atractivo y novedoso para la aplicación de tecnologías de ingeniería de tejidos.

Este trabajo muestra la factibilidad de cultivar condrocitos sobre MAC, permitiendo su adhesión y diferenciación. En el futuro, esta membrana con los condrocitos cultivados podría redundar en el desarrollo de tratamientos para lesiones condrales que aún no tienen soluciones satisfactorias.

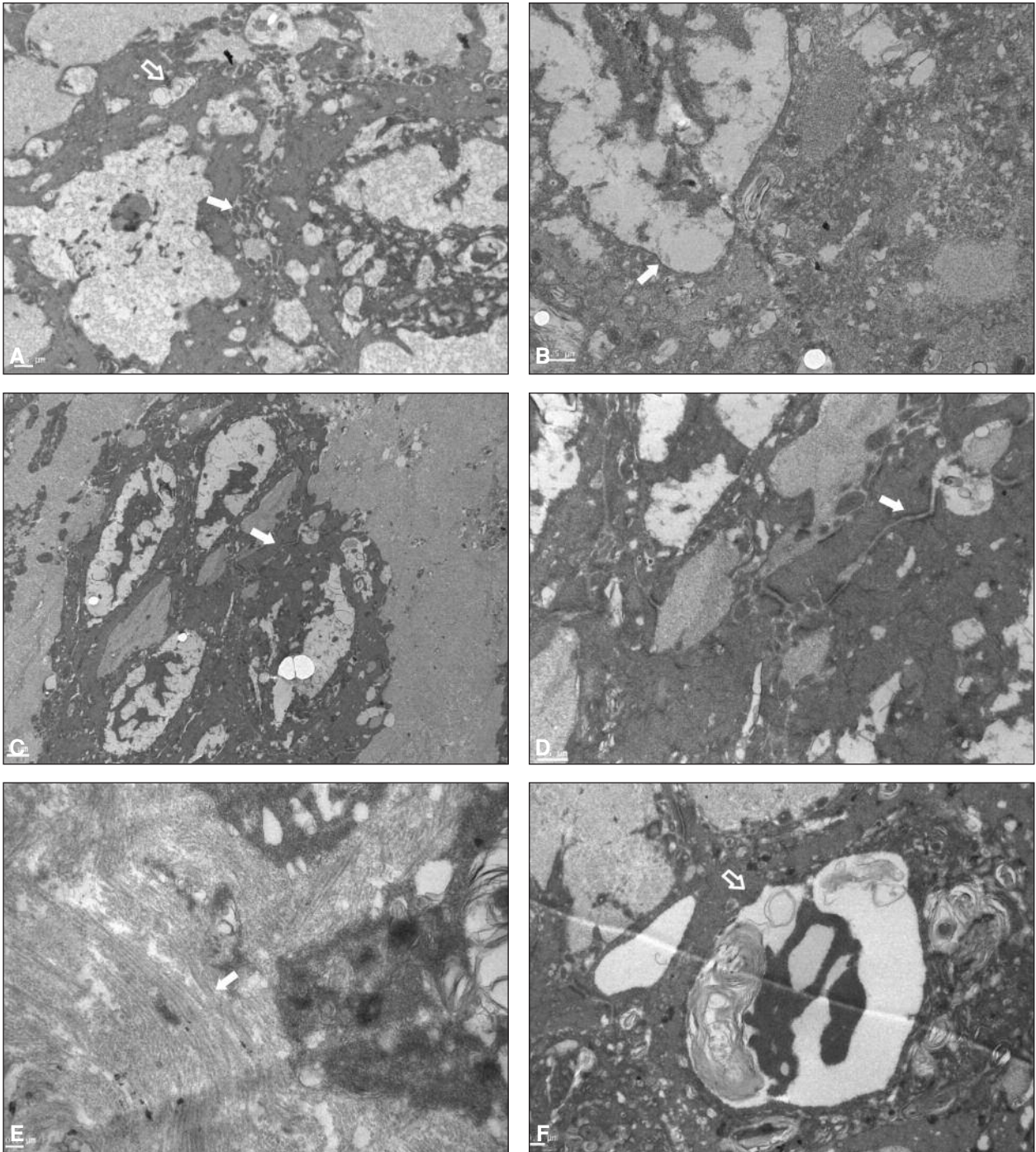


Figura 3. Microscopia electrónica de condrocitos cultivados sobre MAC durante 2 días (A), 6 días (B, C y D) o 14 días (E y F), fijados con glutaraldehído al 4%, tratados con tetróxido de osmio al 1% y corte con ultramicrotomo. En las imágenes, se distinguen mitocondrias (3A, flecha llena), doble membrana nuclear (3B, flecha llena), retículo endoplásmico (3E, flecha llena) y uniones de tipo desmosoma (3C y 3D, flecha llena). En las imágenes 3A y 3F, se observan vacuolas que aumentan su tamaño al transcurrir el tiempo en cultivo sobre la MAC, marcadas con flecha sin relleno. (A 12000x, B 20000x, C 7000x, D 20000x, E 30000x, F 12000x).

Bibliografía

1. **Outerbridge R.** The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br* 1961;43:752-7.
2. **Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M.** Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 2002;18:730-4.
3. **Widuchowski W, Lukasik P, Kwiatkowski G, Faltus R, Szyluk K, Widuchowski J, Koczy B.** Isolated full thickness chondral injuries. Prevalence and outcome of treatment. A retrospective study of 5233 knee arthroscopies. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2008;75:382-6.
4. **Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T.** Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee* 2007;14:177-82.
5. **Mankin HJ.** The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:460-6.
6. **Bedi A, Feeley B, Williams R.** Management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:994-1009.
7. **Furukawa T, Eyre D, Koide S, Glimcher M.** Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62:79-89.
8. **Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen, T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O, et al.** Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86:455-64.
9. **Cherubino P, Grassi F, Bulgheroni P, Ronga M.** Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2003;11:10-5.
10. **Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M.** Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;17:561-77.
11. **Zeifang F, Oberle D, Nierhoff C, Richter W, Moradi, Schmitt H.** Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *Am J Sports Med* 2010;38:924-33.
12. **Fuss M, Ehlers E, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P.** Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Ann Anat* 2000;182:303-10.
13. **Gigante A, Bevilacqua C, Cappella M, Manzotti S, Greco F.** Engineered articular cartilage: influence of the scaffold on cell phenotype and proliferation. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:713-6.
14. **Jones C, Willers C, Keogh A, Yates P, Kirk T, Zheng M.** Matrix-induced autologous chondrocyte implantation in sheep: objective assessments including confocal arthroscopy. *J Orthop Res* 2008;26:292-303.
15. **Nehrer S, Breinan H, Shortkroff S, Sledge C, Yannas I, Spector M.** Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 1998;19:2313-28.
16. **Jin C, Park S, Choi B, Lee K, Kang C, Min B.** Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Engineering* 2007;13(4):693-702.
17. **Kaps C, Fuchs S, Endres M, Vetterlein S, Krenn V, Perka C, et al.** Molecular characterization of tissue-engineered articular chondrocyte transplants based on resorbable polymer fleece. *Orthopade* 2004;33:76-85.
17. **Zheng MH, Willers C, Kirilak L, Yates P, Xu J, Wood D, et al.** Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment. *Tissue Engineering* 2007;13:737-46.
19. **Vega Sánchez R, Castillo Castrejón M, Hornelas Orozco Y, Gómez López N, Beltrán Montoya J, Vadillo Ortega F.** Three-dimensional analysis of human chorioamniotic membranes structure in term pregnancy. *Ginecol Obstet Mex* 2008;76(1):38-44.
20. **Lo V, Pope E.** Amniotic membrane use in dermatology. *Int J Dermatol* 2009;48:935-40.
21. **Ramakrishnan K, Jayaraman V.** Management of partial-thickness burn wounds by amniotic membrane: a cost-effective treatment in developing countries. *Burns* 1997;23(Suppl 1):S33-S36.
22. **Hori J, Wang M, Kamiya K, Takahashi H, Sakuragawa N.** Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea* 2006;25:S53-S58.