

Ingeniería tisular en la reparación de las lesiones articulares

Eduardo Álvarez-Lozano,* Jorge Lara-Arias,** Óscar Mendoza-Lemus,***
Hermínia Martínez-Rodríguez****

RESUMEN

La ingeniería tisular es una rama de la bioingeniería, cuyo principio básico es la utilización de un sustrato celular vivo, aunado a un diseño y manipulación del medio extracelular para crear bioimplantes destinados a reparar, reemplazar, mantener u optimizar el funcionamiento de órganos o tejidos lesionados. Las técnicas de ingeniería tisular utilizadas para la reparación de cartilago son dos: los injertos osteocondrales y el trasplante de condrocitos. El cultivo e implantación de condrocitos autólogos es una alternativa para la reparación de los defectos articulares; esta es una de las primeras biotécnicas aplicadas a la cirugía ortopédica. Los estudios originales de ésta fueron realizados en conejos con buenos resultados en 82% de los casos. El desarrollo de estos procesos ha traído consigo otras líneas de investigación, entre ellas, el estudio de los factores de crecimiento, de células madre o tallo y la terapia génica.

Palabras clave: Ingeniería tisular, lesiones condrales, implantación de condrocitos, injertos osteocondrales.

SUMMARY

Tissue engineering is a bioengineering branch, whose basic principle is the use of a live cellular substrate combined with the design and manipulation of extracellular media to create bioimplants with the purpose to repair, replace, maintain or optimize the functions of the organs or tissues damaged. The tissue engineering techniques used for cartilage repair are: The employment of osteochondral grafts and chondrocytes implantation. Cultivated autologous chondrocytes implantation is an alternative for the repair of articular defects; and this is the first biotechnology applied to the orthopedics surgery. The original studies of this technique were performed in rabbits getting 82 % of good results. The development of these processes have opened another research lines, as the study of growth factors, stem cells and gene therapy.

Key words: Tissue engineering, osteochondral lesions, chondrocyte implantation, osteochondral graft.

* Coordinador General, Banco de Hueso y Tejidos, Hospital Universitario «Dr. José E. González», UANL.

** Encargado de Laboratorio de Ingeniería Tisular, Banco de Hueso y Tejidos, Hospital Universitario «Dr. José E. González», UANL.

*** Jefe del Servicio de Ortopedia y Traumatología, Hospital Universitario «Dr. José E. González», UANL.

**** Jefa del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL.

Dirección para correspondencia:

Dr. Eduardo Álvarez-Lozano. Hospital Universitario «Dr. José Eleuterio González» UANL. Servicio de Ortopedia y Traumatología. Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos. Col. Mitras Centro 64460 Monterrey, N.L. Correo electrónico: dedaloz@bancodehueso.org

INTRODUCCIÓN

La ingeniería tisular es la rama de la bioingeniería cuyo principio es la utilización de un sustrato celular vivo, aunado al diseño y manipulación del medio extracelular para crear bioimplantes con la finalidad de reparar, reemplazar, mantener u optimizar el funcionamiento de órganos o tejidos lesionados.

El deterioro funcional de un órgano o tejido es un problema médico grave y de alto costo, ya que la sustitución de estas estructuras involucra, entre otros, múltiples factores de orden científico, económico y ético. Y no obstante que la cirugía trasplantológica ha contribuido en forma importante a resolver estos problemas, la gran demanda de órganos y tejidos para trasplante se ha visto limitada por el número restringido de donadores. Para subsanar este problema, se han realizado diversas investigaciones en ingeniería celular y biocirugía que han conducido, además de los trasplantes, a la utilización de células autólogas vivas cultivadas *in vitro* para reconstruir órganos o tejidos, así como a la regeneración de tejidos.

El término ingeniería tisular se propuso en 1987 durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias,¹ aunque muchas de las técnicas empleadas en la misma se habían desarrollado muchos años antes. Para su desarrollo, esta disciplina se ha valido de logros conseguidos en otras ramas de la ciencia, como la biología celular, la bioquímica, la biología molecular y el estudio de biomateriales, los cuales se han aplicado a la ingeniería de nuevos tejidos, siendo su campo de acción la terapéutica médica y quirúrgica.

LA INGENIERÍA TISULAR EN LA REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO

El factor que distingue a las técnicas de ingeniería tisular es la inclusión de células vivas dentro del tejido implantado, y de ellas, las más utilizadas en la reparación de cartílago son:

- Los injertos osteocondrales.
- Trasplante de condrocitos, solos o en combinación con algún tipo de material biocompatible.

Existen otras líneas de investigación relacionadas que se encuentran en diferentes etapas de aplicación:

- Factores de crecimiento.
- Células madre o tallo: Trasplante de una población celular capaz de diferenciarse hacia condrocitos, células pluripotenciales.
- Terapia génica: El uso de células como plataforma para la entrega de productos genéticos que aumenten la reparación o genes modificados por ingeniería genética.

INJERTOS OSTEOCONDRALES

- Injertos en mosaico (mosaicoplastia). Esta técnica fue desarrollada y perfeccionada en Hungría en los años noventa por Hangody.^{2,3} Los primeros trabajos experimentales se realizaron en 1991 y las primeras intervenciones clínicas en 1992. Es un procedimiento único, en el cual se extraen autoinjertos osteocondrales cilíndricos de los sitios donadores y se transportan a nichos preparados en el sitio receptor. Los lugares más comúnmente usados como donantes son, en orden de preferencia: el área patelofemoral no sometida a carga, el área medial, lateral, el borde de la tróclea femoral y la periferia de la escotadura intertroclear. Los orificios cilíndricos son de una profundidad y diámetro apropiados a los injertos tomados, con lo que se restaura la curvatura original de la articulación. Estudios experimentales han mostrado que para obtener buenos resultados debe de ser reparado al menos 70% del defecto y a las 10 semanas el área injertada debe contener 60 a 70% de cartílago hialino y 30 a 40% de fibrocartílago.⁴
- Aloinjertos osteocondrales. La extracción, procesamiento y preservación de injertos óseos son procedimientos bien establecidos. Sin embargo, la técnica para aplicar injertos de cartílago es poco utilizada por la dificultad de mantener viables los condrocitos, aunque en la actualidad se están proponiendo técnicas de criopreservación que mantienen la viabilidad de las células condrales.⁵ Lo atractivo de los injertos osteocondrales criopreservados es la posibilidad de disponer en cualquier momento de un segmento osteocartilaginoso procedente de una zona de carga y del tamaño necesario. Pero existen varios factores que limitan la aplicación de este valioso recurso: Wayne et al. estudiaron el efecto del almacenamiento de injertos osteocondrales durante 60 días a 4°C y concluyeron que para mantener la viabilidad de las células del cartílago no son aconsejables periodos largos de almacenamiento a menos que se modifiquen las condiciones de preservación.⁶ En esa misma línea, Baver y Gross observaron que los injertos osteocondrales frescos no congelados eran más viables que los condrocitos congelados,⁷ por lo que la dificultad de contar con injertos frescos ha obligado a buscar la forma de mantener la arquitectura microscópica de la superficie articular durante la congelación. Este tipo de injertos está indicado en pacientes jóvenes, con limitación funcional y una lesión localizada; por ejemplo, en artrosis postraumática, en defectos osteocondrales focales y en una osteocondritis disecante. Este procedimiento es de mayor utilidad cuando el defecto es único y focal. La edad avanzada y las alteraciones en las funciones cognitivas son consideradas contraindicaciones relativas, ya que se ha visto en series grandes que una de las principales causas de fracaso es el apoyo temprano de la extremidad, por lo que se requiere la colaboración del paciente para evitar este factor adverso. Un problema es que, al igual que con la utilización de cualquier otro aloinjerto, existe el riesgo de transmitir enfermedades infectocontagiosas, lo que puede abatirse con el cumplimiento de los protocolos establecidos en los bancos de hueso que descartan infecciones, neoplasias y enfermedades degenerativas,

además de que se realiza una muestra de sangre que incluye la detección de sífilis, hepatitis B y C, VIH y citomegalovirus.⁸ Sin embargo, quedan otros puntos a considerar: por ejemplo, la respuesta inmunológica, ya que los aloinjertos osteocondrales son inmunogénicos debido al contenido de diferentes proteínas y elementos medulares que contienen; no obstante que la criopreservación disminuye la respuesta inmunológica, no logra suprimirla del todo.⁹ También es importante tomar en cuenta otro factor adverso de la criopreservación: la citotoxicidad de los agentes crioprotectores utilizados, que disminuyen la viabilidad de los condrocitos.¹⁰

Además de los factores mencionados, están los propios del paciente y otros como la técnica de extracción, el instrumental utilizado, la técnica quirúrgica para el diseño del nicho receptor, así como la técnica para su implantación. El diseño del cilindro del injerto debe quedar nivelado con el cartílago que lo rodea para evitar movimientos o la formación de una interfaz entre el tejido óseo del donante y del receptor, con lo que se evita la necesidad de cualquier tipo de fijación, puesto que el injerto queda insertado a presión.

La presencia de cualquier espacio entre las porciones óseas o de un espacio o desnivel entre las superficies cartilaginosa predispone al desarrollo de tejido conectivo fibroso que engloba la porción cartilaginosa y en muchos casos la sustituye casi por completo, pudiendo llegar hasta la porción ósea.

Si se consideran los malos resultados de los protocolos de criopreservación para cartílago intacto que se usan en la actualidad, se pueden determinar los posibles factores de fracaso, que en términos generales pueden ser: la falta de contacto entre las células cartilaginosa y el agente crioprotector o la toxicidad del mismo.

En la experiencia propia,¹¹ en el estudio experimental con este tipo de aloinjertos criopreservados en diferentes condiciones e implantados y después para ser analizados histopatológicamente mediante estudios inmunohistoquímicos, se encontró como resultado predominante la sustitución de la superficie articular por un tejido fibrocartilaginosa con una vida de los condrocitos limitada, aunque la prevalencia del tejido cartilaginosa en los diferentes grupos fue variable, lo cual puede estar relacionado directamente con el método de criopreservación. Esto coincide con los reportes de Lexer, en 1908, quien encontró que la complicación más frecuente es la transformación del cartílago trasplantado en fibrocartílago.¹²

Consideramos que muchos aspectos de la criopreservación continúan inexplorados, entre los que se encuentran: las concentraciones, temperaturas y tiempos de exposición exactas para disminuir los efectos tóxicos de los crioconservadores, la temperatura ideal de almacenaje del cartílago articular y la capacidad del cartílago para cumplir su función una vez implantado después de la congelación. Un punto importante a resolver en un futuro es la determinación del método criopreservador más adecuado para conservar la mayor porción cartilaginosa viable.

- Cultivo e implantación de condrocitos autólogos. Debido a las limitaciones de los tejidos donadores ya mencionadas, se han propuesto fuentes alternas de material biológico para la reparación de estas lesiones; una de ellas es la colocación de condrocitos autólogos cultivados *in vitro*, que es una de las primeras biotecnologías aplicadas a la cirugía ortopédica. Los estudios originales de ésta fueron realizados en conejos, habiendo obtenido 82% de buenos resultados.¹¹ Sin embargo, el primer reporte de aislamiento de condrocitos fue hecho por Smith desde 1965, antes de su aplicación clínica.¹³ Green, en 1977, reportó la implantación experimental de condrocitos sembrados en la matriz ósea de ratones atímicos; esta experiencia fue mostrando que el grado de viabilidad celular posterior a la implantación está íntimamente relacionado con la alta densidad celular.¹⁴

Lo que podría ser conocido como la primera generación de la técnica de implantación se atribuye a Brittberg et al. en 1994.¹⁵ Estos autores tomaron cartílago de zonas expuestas a mínima carga en la mitad superior del cóndilo femoral medial de la rodilla afectada y después de ser digerido con colagenasa, fue filtrado y resuspendido en un medio de cultivo suplementado con suero del paciente, con lo que las células se consideraron listas para su implantación después de 14 a 21 días. En el momento de la implantación, el sitio de la lesión condral se escindió hasta observar tejido cartilaginoso de apariencia normal; el defecto fue cubierto con periostio obtenido de la cara medial de la tibia proximal y suturado en el borde del defecto. Los condrocitos cultivados fueron inyectados debajo del parche y se iniciaron movimientos activos y sin carga, 2 a 3 días después de la intervención.

Se han publicado resultados muy variados según la patología. Sin embargo, en términos generales, los resultados fueron buenos en 75% de los pacientes, estableciendo una relación entre la morfología del cartílago hialino y los buenos resultados. Se han propuesto tres teorías para explicar los mecanismos de reparación con el trasplante de células cultivadas: 1) los condrocitos implantados repueblan el defecto y producen una nueva matriz de cartílago. El parche de periostio funciona como un cierre hermético que aísla las células y permite que se incuben, diferencien y rellenen el defecto; 2) los factores de crecimiento son capaces de estimular los condrocitos cultivados para que se dividan; y 3) el parche de periostio estimula los condrocitos en el cartílago adyacente, en el hueso subcondral o en el periostio, para entrar en el defecto y repararlo. Esta técnica incorpora varios de los procedimientos: lavado, abrasión, injerto de periostio y trasplante celular.

Algunas de las desventajas reportadas son las adherencias articulares, la hipertrofia del parche de periostio y la pérdida celular debido al medio acuoso en que se incluyen las células, y por lo mismo, la distribución heterogénea de éstas en el defecto.

Además de la inyección directa, la implantación puede llevarse a cabo en matrices sembradas con células, lo que podría denominarse como la segunda generación de la implantación como matrices, pues han sido usados diferentes biomateriales, desde láminas de colágeno porcino (MACI) I ó III, alginato,

hidrogeles de colágeno, fibrina autóloga, etcétera. Los resultados reportados con cada uno de ellos varían de autor a autor, pero en general son semejantes en cuanto a los buenos resultados que se obtuvieron con la técnica original.

FACTORES DE CRECIMIENTO

La investigación sobre el uso de factores de crecimiento para mejorar la regeneración cartilaginosa es un tópico de interés para numerosos investigadores, ya que en la actualidad son muchas las interrogantes sin contestar sobre el uso de estos potentes moduladores naturales de la conducta celular. Sin embargo, la incógnita de mayor interés es sin lugar a dudas qué factor de crecimiento utilizar. Se ha comprobado que son varios los que tienen influencia sobre la línea condral: TGF- β , CTGF, IGF, EGF,¹⁶ todos con capacidad de estimular algún aspecto de la biología condral y probablemente de mejorar la calidad del tejido de reparación. Otro punto álgido en este campo es el referente a cuál es el medio a utilizar para hacer llegar los factores de crecimiento al sitio de la lesión y cuál es el tiempo de expresión y la dosis necesaria para que cumpla la función deseada. Deben de ser usados *in vitro* o *in vivo*. Hay mucho que investigar acerca del tema, y lo más importante es que esto se realice dentro del marco científico, sin abusar ni caer en modismos terapéuticos con afán de creer que por ser un tema de actualidad pueda representar el Santo Grial de los problemas musculoesqueléticos.

CÉLULAS MADRE

Uno de los campos de investigación más innovadores de la ingeniería tisular aplicada a la ortopedia es el desarrollo de células pluripotenciales dirigidas hacia una diferenciación condrogénica. Descritas por primera vez por Caplan,¹⁷ las células madre mesenquimales son con mucho las más ampliamente utilizadas; consisten en células pluripotenciales provenientes de otros tejidos diferentes al cartilaginoso, como el adiposo,¹⁸ el muscular,¹⁹ el periostio,²⁰ etcétera. El beneficio de su uso radica, en primer lugar, en que no requieren una toma de biopsia para cultivo de un sitio, si bien no necesario funcionalmente, sí expuesto al proceso de reparación secundario a la biopsia.

Estas células, en teoría, pueden ser tomadas de un sitio más accesible, menos mórbido y con la ventaja de que su toma no afectará el microambiente del tejido y que éste puede reemplazarlas rápidamente.

En teoría, si estas células son expuestas al microambiente articular, serán capaces de diferenciarse hacia células cartilaginosas funcionales. En algunas condiciones pueden requerir estimulación con medios suplementarios para llevar esto a cabo.²¹

TERAPIA GÉNICA

Una línea de investigación complementaria a la de los factores de crecimiento es la terapia génica, es decir, el uso de plataformas celulares como medio de transporte de material genético modificado con el fin de lograr la expresión de un factor

de crecimiento o una conducta celular en particular, controlando desde esta célula la expresión genética del factor deseado y sus interrelaciones con otros del microambiente celular. En investigaciones experimentales se han utilizado plasmidos como vehículos para introducir los genes modificados a las células, cualquiera que sea el vehículo. Hay mucho que investigar antes que esta estrategia forme parte del arsenal terapéutico del ortopedista.^{22,23}

BIBLIOGRAFÍA

1. Skalak R, Fox F. *Tissue engineering*. New York: Liss, 1998.
2. Hangody L, Kárpáti Z. A new surgical treatment of localized cartilaginous defect of the knee. *Hungarian J Orthop Trauma* 1994; 37: 237-8.
3. Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, et al. Basic science: Autogenous osteochondral graft technique for replacing knee cartilage defects in dogs. *Orthop Inter Ed* 1997; 53: 175-81.
4. Cole BJ, Malek MM. *Articular cartilage lesions: a practical guide assessment and treatment*, New York, Springer – Verlag, 2004: 74.
5. Tomford WW, Duff GP, Mankin HJ. Experimental freeze preservation of chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res* 1985; 197: 11-4.
6. Wayne JS, Amiel D, Kwank MK, Woo SL, Fierer A, Meyers MH. Long-term storage effects on canine osteochondral allografts. *Acta Orthop Scand* 1990; 61: 539-45.
7. Baver RJ, Gross AE. *Fresh small-fragment osteochondral allografts in the knee joint*. In: Aichroth PM, Cannon WD (eds). *Knee Surgery. Current Practice*. Londres, Martin Dunitz, 1992: 464-71.
8. Tomford WW. Current Concepts Review: Transmission as disease through Transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg* 1995; 77A: 1742-54.
9. Friedlaender GE, Mankin HJ, Langer F. *Immunology of osteochondral allografts: background and general considerations*. En: Friedlaender GE, Mankin HJ, Shell KW (eds) *Osteochondral allografts: biology, banking and clinical applications*. Boston, Little Brown, 1983: 133-40.
10. Tomford WW, Fredericks GR, Mankin HJ. Cryopreservation of intact articular cartilage. *Trans Orthop Res Soc* 1982; 7: 176.
11. Álvarez E. Injertos osteocondrales a presión conservados a -80°C. Efecto de la criopreservación con dimetilsulfóxido (DMSO). Estudio experimental en corderos. *Rev Mapfre Med* 2002; 13(2): 90-8.
12. Lexer E. Substitution of whole or half joint from freshly amputated extremities by freeplastic operation. *Surg Gynecol Obstet* 1908: 6601-7.
13. Smith AU. Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals. *Nature* 1965: 205: 783-784.
14. Green WT. Basic science and pathology. *J Orthop Res* 1977; 124: 237-50.
15. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte implantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-95.
16. Coutts RD, Healey RM, Ostrand R, Sah RL, Goomer R, Amiel D. Matrices for cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001; 39 (Suppl): S271-S279.
17. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-50.
18. Erickson G, Franklin D, Gimble J, Guilak F. Adipose tissue-derived stromal cells display a chondrogenic phenotype in culture. *Trans Orthop Res Soc* 2001: 198.
19. Grande DA, Southerland SS, Manji R, Schwartz RE, Lucas PA. Repair of articular cartilage defects using mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 1995; 1(4): 345-353.
20. O'Driscoll S, Marx R, Beaton D, Miura Y, Gallay S, Fitzsimmons J. Validation of a simple histological – histochemical cartilage scoring system. *Tissue Eng* 2001; 7: 313.
21. Papadaki M, Mahmood T, Gupta P, et al. The different behaviors of skeletal muscle cells and chondrocytes on PEGT/PBT block copolymers are related to the surface properties of the substrate. *J Biomed Mater Res* 2001; 54: 47.
22. Baragi VM, Renkiewicz RR, Qui L, et al. Transplantation of adenovirally transduced allogenic chondrocytes into articular cartilage defects *in vivo*. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5: 275-82.
23. Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P, et al. Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 2000: 379(Suppl): S214-S219.