

Los meniscos viables ¿pueden ser más fácilmente almacenados en un medio de cultivo alternativo? Estudio *in vitro*

P.E. Gelber^{1,2}, R. Torres³, N. García Giralt⁴, X. Pelfort^{2,3}, F. Abat¹, C. Álvarez Gómez¹, J.C. Monllau^{1,2}

¹ Servicio de Ortopedia y Traumatología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. ² Unidad de Artroscopia y Rodilla. ICATME-Institut Universitari Dexeus. Barcelona. ³ Servicio de Ortopedia y Traumatología. Parc de Salut Mar. Barcelona. ⁴ URFOA-IMIM. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona

Correspondencia:

Dr. P.E. Gelber

Servicio de Ortopedia y Traumatología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
C/ Sant Quintí, 89. 08041 Barcelona

Correo electrónico: pablogelber@gmail.com

Objetivo: El trasplante de aloinjertos meniscales (TAM) viables es complejo desde el punto de vista logístico. El objetivo fue comparar la estructura colágena y la viabilidad celular en dos medios de cultivo.

Métodos: Se utilizaron 10 meniscos, que fueron divididos en 3 secciones. El metabolismo celular fue estudiado con la expresión génica de colágeno tipo I y II, y agregano. La red colágena fue valorada con la escala Collagen Meniscal Architecture (CMA) tras su análisis con microscopía electrónica.

Resultados: Colágeno I se expresó más en FBS que ITS ($p = 0,036$). Colágeno II se expresó más en el GC. No se observaron diferencias con la escala CMA.

Conclusiones: ITS es tan efectivo como el FBS para preservar la red colágena. La expresión genética de las proteínas estudiadas fue similar en el grupo ITS que en el GC. ITS podría ser una mejor alternativa que FBS o suero del receptor como suplemento para preservar meniscos.

Viable meniscal allograft can be more easily store with an alternative medium culture medium

Purpose: Viable meniscal transplantation has been criticized as an expensive and logistically demanding technique. The purpose was to compare the standard culture medium with another more available and easier to perform culture medium.

Methods: Ten fresh lateral menisci were harvested. Each meniscus was divided into 3 sections. Cell metabolism was assessed with the gene expression (GE) of types I and II Collagen, and aggrecan. The Collagen Meniscal Architecture (CMA) scoring system was used to evaluate the degree of meniscal disarray.

Results: Type I collagen was expressed more in the FBS than in the ITS group ($p=0.036$). Type II collagen showed decreased expression in both cultured groups compared with the Cg. No differences were observed in the GE of aggrecan in either group and when the CMA was applied.

Conclusions: ITS-supplemented medium is at least as effective as the FBS-supplemented medium to preserve the collagen net architecture. GE of the studied proteins was similar in the ITS group to that observed in the Cg. ITS might be a better alternative as a medium supplement for preserving meniscal tissue than FBS or host serum.

Palabras clave: Menisco. Aloinjerto. Trasplante viable. Fetal bovine serum. Conservación meniscal.

Key words: Meniscus. Allograft. Viable transplantation. Fetal bovine serum. Meniscus preservation.

INTRODUCCIÓN

El primer trasplante de aloinjerto meniscal aislado fue realizado en 1984 por Milachowky *et al.*⁽¹⁾. En relación con las técnicas de preservación del aloinjerto meniscal, hay diferentes métodos normalmente utilizados. La congelación simple es aceptada como una simple y eficaz manera de conservar aquellos tejidos que sólo requieren retener sus propiedades biomecánicas, ya que en modelos animales se ha demostrado que la ultraestructura colágena no es alterada⁽²⁾. En cambio, Gelber *et al.*⁽³⁾ más recientemente han refutado esta afirmación, demostrando que cuando se evalúa ultraestructuralmente, el proceso de congelación conduce a un daño sustancial. Por otra parte, la criopreservación sí que ha demostrado fehacientemente que no altera la arquitectura colágena⁽⁴⁾. Aunque siempre se ha esgrimido que la principal ventaja teórica de la criopreservación sería que no destruye el componente celular, esto ha sido recientemente cuestionado, ya que fueron observados diferentes rangos de supervivencia celular con dicha técnica^(4,5). Los aloinjertos frescos o viables, por su parte, pueden ser ventajosos, dado que no sólo no destruye el componente celular, sino que lo mantiene metabólicamente activo con su correspondiente producción de proteoglicanos y fibras colágenas. Por ello, se podría esperar una función celular cercana a la normal desde el mismo momento de su implantación⁽⁵⁻⁷⁾. Verdonk y Khon⁽⁵⁾ demostraron que el menisco se puede conservar de forma fiable a 4 °C en medios de cultivos estériles hasta por 14 días, sin una pérdida de viabilidad celular importante.

Los aloinjertos de menisco frescos han demostrado mantenerse viables tras dos semanas en el medio de cultivo Dulbecco Eagle Modificado (DMEM; Gibco Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) suplementado con 20% de suero autólogo^(5,8). En estudios *in vitro*, el suero autólogo es reemplazado con FBS (*fetal-bovinum-serum*), el cual ha demostrado su efectividad para preservar la red colágena meniscal y la viabilidad celular por 2 semanas⁽⁹⁾. La composición exacta del FBS no es bien conocida y presenta una gran variabilidad dependiendo de la fuente del suero. La insulina-transferrina-selenio (ITS) es un producto usado frecuentemente para suplementar medios de cultivo de condrocitos⁽¹⁰⁻¹²⁾. Es un suplemento controlado, disponible en cualquier

laboratorio, con una composición bien conocida y que puede ser potencialmente un medio adecuado para mantener tejido meniscal viable para uso clínico, evitando la necesidad de incubarlo con suero del receptor, con la consiguiente disminución de los requerimientos logísticos del método.

El objetivo de este estudio fue valorar el tejido meniscal en términos de metabolismo celular y red colágena, comparando el estándar del laboratorio suplementado con un 20% de FBS frente a otro suplementado con ITS al 1%, después de 4 semanas desde su obtención desde el donante. Nuestra primera hipótesis fue que un medio de cultivo suplementado con ITS mantendría la red colágena meniscal y viabilidad celular hasta por 4 semanas después de su obtención. La segunda hipótesis fue que esta capacidad de la solución con ITS sería al menos tan efectiva como la suplementada con FBS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del injerto

Fueron obtenidos 10 meniscos laterales en condiciones estériles durante artroplastias totales de rodilla (6 hombres, 4 mujeres). El grupo de estudio tenía una media de edad de 71 años. Fue obtenido el consentimiento informado de cada paciente siguiendo los términos impuestos por nuestro comité ético. El cuerpo de cada menisco fue dividido en 6 secciones en condiciones estériles y una de dichas secciones fue preparada para su análisis con microscopía electrónica de transmisión (MET) como grupo control (GC). Las otras 5 secciones se colocaron en medio de cultivo con DMEM y fueron remitida al laboratorio.

Cultivo de los meniscos

Otra sección no cultivada y también seleccionada como GC fue incubada durante una hora con RNAlater (Qiagen) a 4 °C y luego criopreservada a -80 °C para la valoración de su expresión génica (EG). Las otras 4 secciones se colocaron en tubos de centrifugación de 15 mL y el medio de cultivo era luego añadido. Se cultivaron los meniscos con DMEM suplementado según los casos con 20% de FBS o 1% de ITS, por 28 días.

Dos de dichas secciones se usaron para cuantificación del ARN (GE FBS y GE ITS). Las restantes

Tabla 1							
VIABILIDAD CELULAR VALORADA MEDIANTE EXPRESIÓN GÉNICA DE TRES PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL MENISCO							
		GC	FBS	ITS	p- [*] GC vs. FBS	p- [*] GC vs. ITS	p- [*] GC vs. ITS
AGG	Media (SD) Med (P25-P75) Mín-Máx	1,37 (1,14) 1,27 (0,4-1,9) 0,17-4,0	1,33 (1,14) 1,35 (0,22-2,45) 0,02-2,7	1,32 (0,96) 1,19 (0,41-2,04) 0,00-3,14	0,878	0,953	0,959
Col I	Media (SD) Med (P25-P75) Mín-Máx	3,30 (4,50) 1,5 (0,59- 5,59) 0,17-13,00	4,81 (4,18) 5,30 (0,41-8,17) 0,14-10,8	1,23 (1,11) 1,00 (0,7-1,3) 0,03-4,0	0,441	0,484	0,036
Col II	Media (SD) Med (P25-P75) Mín-Máx	2,08 (2,44) 0,75 (0,25- 3,79) 0,00-7,28	0,68 (1,27) 0,00 (0,00-0,91) 0,00-4,10	0,24 (0,52) 0,00 (0,00-0,25) 0,00-1,42	0,086	0,012	0,144

* Wilcoxon test. AGG: agregano; Col I: colágeno tipo I; Col II: colágeno tipo II en los tres grupos del estudio; GC: grupo control; FBS: meniscos cultivados con 20% de FBS; ITS: meniscos cultivados con 1% de ITS.

dos secciones se fijaron con glutaraldehído al 2% para su análisis con MET (MET FBS y GE ITS).

Aislamiento de ARN y expresión génica

Las secciones GE FBS y GE ITS se suspendieron en 1 mL de Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc.), homogeneizado con T8 Ultra-Turrax homogeneizador (IKA) y finalmente el ARN se extrajeron siguiendo las instrucciones del Tri Reagent. El ARN se utilizaba para sintetizar ADN siguiendo el protocolo del reactante Taq-Man[®] Reverse (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.). Después de su dilución en agua pura y 1 µL de la solución resultante, se determinó la EG de agregano (AGC1), colágeno tipo I (COL1A1) y colágeno tipo II (COL2A1) con PCR Real-Time (Applied Biosystems). Los resultados fueron analizados con SDS TM Software 2.3 (Applied Biosystems).

Microscopía electrónica de transmisión

El estado de la arquitectura meniscal colágena se analizó con MET y sus cambios clasificados según una escala previamente descrita por Gelber *et al.*^(3,4).

Cuarenta mm³ de cada sección meniscal se analizaron con MET (Philips, modelo #CM100, Holanda).

Se midieron por un observador independiente, 400 fibras colágenas en secciones longitudinales y transversales de cada menisco.

De acuerdo a la escala Collagen Meniscal Architecture (CMA)⁽³⁾, los meniscos se clasificaron entre 0 a 7 puntos y, dependiendo del mismo, se consideraban como normales (grado I 0-2 puntos) a desestructuración severa (grado III 5-7 puntos).

Análisis estadístico

Las variables de viabilidad celular se presentan como media ± desviación estándar, mediana, percentiles 25 y 75, máximo y mínimo, y fueron comparados usando el test no paramétrico de Wilcoxon. ANOVA con comparaciones múltiples de Tukey se usó para las comparaciones de las mediciones de la ultraestructura colágena. Se utilizó el *software* SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE. UU.) y el nivel de significación estadístico se estableció en 0,05.

RESULTADOS

La **Tabla 1** resume los datos estadísticos de cada proteína estudiada en cada uno de los 3 grupos. No se observaron diferencias en relación con la EG de agregano. El colágeno I fue más expresado en el grupo ITS que FBS ($p = 0,036$), pero no se encontraron diferencias comparándolos con el GC. El colágeno II demostró una disminución de su expresión en ambos medios de cultivo, tendiendo en ambos grupos a 0.

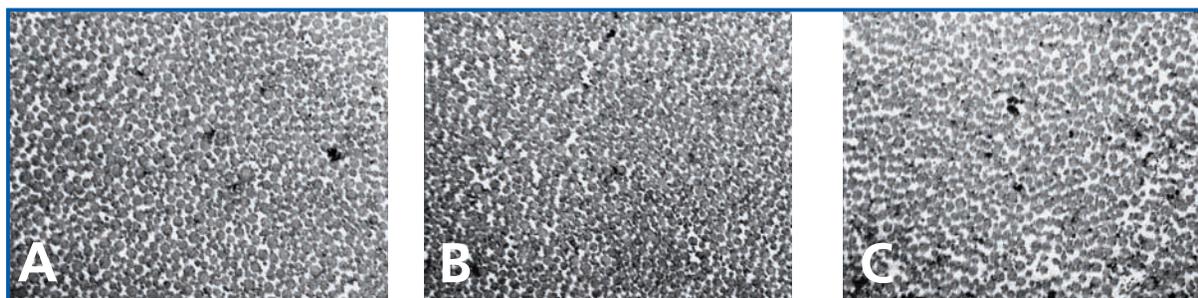


Figura 1. Imágenes de MET en un menisco clasificado como de grado I en la escala CMA. Se observa un ligero aumento del diámetro de las fibras en cortes transversales de las secciones cultivadas, respecto al grupo control. A: muestra control; B: muestra cultivada con 20% de FBS; C: muestra cultivada con 1% de ITS.

Tabla 2		
MEDIA EXPRESADA EN NANÓMETROS DE LAS FIBRAS COLÁGENAS EN SECCIONES LONGITUDINALES Y TRANSVERSALES EN LOS DIFERENTES GRUPOS DEL ESTUDIO		
	Transversal	Longitudinal
CG	14,37 ± 4,05	12,30 ± 3,77
ITS	14,60 ± 3,29	13,11 ± 3,81
FBS	15,32 ± 4,39	12,64 ± 3,31
p-*		
CG vs. ITS	0,677	0,005
CG vs. FBS	0,002	0,385
FBS vs. ITS	0,025	0,160

* Valor de p obtenido de comparaciones múltiples de Tukey. GC: grupo control; FBS: meniscos cultivados con 20% de FBS; ITS: meniscos cultivados con 1% de ITS.

La **Tabla 2** describe los hallazgos estadísticos en relación con el tamaño de las fibras de colágeno, observándose un ligero aumento en ambos grupos de estudio en comparación con el GC (**Figura 1**).

Utilizando los criterios de la escala CMA, ocho de los meniscos del GC clasificaron como grado I y los otros dos como grado II. En los meniscos cultivados, fueron siete tipo I y tres tipo II. Tampoco se encontraron diferencias con el aspecto de puntuación de la escala.

DISCUSIÓN

El principal hallazgo de este estudio fue que los meniscos cultivados en un medio suplementa-

do con ITS mostraron una EG más similar al GC que al grupo de FBS y que la estructura colágena no fue alterada, lo que confirmó nuestras dos hipótesis. Sin embargo, el colágeno I, la proteína más importante de la matriz extracelular⁽¹³⁾, estaba incrementada en el grupo FBS. No se observaron diferencias en el nivel de producción de agregano, el proteoglicano más importante del menisco. El colágeno II, que se encuentra principalmente en la parte más interna del menisco⁽¹³⁾ y de la cual no se conoce su real importancia, disminuyó de forma sustancial en ambos grupos cultivados.

Éste es uno de los primeros estudios en los que se valora la EG en los meniscos después de un periodo de cultivo. Verbruggen *et al.*⁽⁹⁾ compararon el metabolismo celular de meniscos humanos cultivados en medio con suero de cabra fetal, concluyendo que las células permanecían viables sólo por un periodo de 2 semanas. En este estudio, el metabolismo celular se valoró mediante el grado de sulfatación incorporado en los proteoglicanos recientemente sintetizados, a diferencia del presente trabajo, donde dicha viabilidad se evaluaba mediante la EG. Ésta expresa la exacta producción de las proteínas en un momento específico, siendo por tanto un método mucho más sensible.

La arquitectura de la red colágena se valoró con la escala CMA y con la medición de las fibras colágenas en secciones transversales y longitudinales. Excepto un ligero aumento en el tamaño de las fibras en los medios cultivados, no se encontró ninguna otra diferencia en el estudio por MET. Esto es coincidente con otros estudios que definen una falta de alteración de la ultraestructura colágena^(8,9) después de 4 semanas.

Dos de los métodos de preservación meniscal más utilizados son la criopreservación y la congelación simple. La criopreservación ha demostrado no alterar la ultraestructura meniscal y mantener proporciones variables de células vivas^(4,14). La congelación simple presenta al respecto estudios contrapuestos^(3,15). El hecho fundamental que determina el éxito del trasplante meniscal es la habilidad de las células del receptor para repoblar el injerto para sintetizar matriz extracelular⁽¹⁶⁾. Arnozky *et al.*⁽¹⁷⁾ demostraron que este fenómeno es lento e incompleto y, Verdonk *et al.*⁽¹⁸⁾, que es posible encontrar ADN del donante hasta durante 64 meses tras el trasplante. Por otro lado, Jackson *et al.*⁽¹⁹⁾ sugirieron que el repoblado celular es precoz, concluyendo que esto determina la no necesidad de trasplantar células viables. Aunque resultados a largo plazo de supervivencia del menisco trasplantado no han mostrado grandes diferencias^(8,20-22), muchas variables distribuidas de forma heterogénea hacen que sea difícil comparar estos estudios entre sí. Aunque no es posible establecer una ventaja clínica de los meniscos viables, el hecho de que la repoblación celular ocurre tardíamente podría determinar que un

injerto sin células viables condujera a un deterioro estructural, al menos temporal, situando a los meniscos viables en una posición ventajosa en relación con otras técnicas de preservación meniscal.

La principal limitación del estudio es la gran variabilidad observada en cada menisco, que podría atribuirse a que los meniscos fueron obtenidos de pacientes de edad avanzada. Otra explicación podría ser que la viabilidad celular se determinó mediante la EG en lugar de la acumulación sintetizada durante las 4 semanas del cultivo.

Estos resultados sugieren que un medio suplementado con ITS puede utilizarse para mantener meniscos viables en lugar de uno suplementado con FBS o suero del receptor.

En conclusión, los medios suplementados con ITS son al menos tan eficaces como los que utilizan FBS como suplemento para preservar la red colágena meniscal. La EG de las proteínas estudiadas fue similar en el grupo ITS que en el GC a 4 semanas. Desde un punto de vista lógico, ITS podría ser una mejor alternativa como medio para suplementar tejido meniscal que el FBS o el suero del receptor.

BIBLIOGRAFÍA

- Milachowski KA, Kohn D, Wirth CJ. Homologous meniscus transplantation. Experimental and clinical results. *Int Orthop* 1989; 13: 1-13.
- Shibuya S. Meniscus transplantation using a cryopreserved allograft. Histological and ultrastructural study of the transplanted meniscus. *J Orthop Sci* 1999; 4: 135-41.
- Gelber PE, González G, Lloreta JL, et al. Freezing causes changes in the meniscus collagen net: a new ultrastructural meniscus disarray scale. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008; 16: 353-9.
- Gelber PE, González G, Torres R, et al. Cryopreservation does not alter the ultrastructure of the meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009; 17: 639-44.
- Verdonk R, Khon D. Harvest and conservation of meniscal allografts. *Scand J Med Sci Sports* 1999; 9: 158-9.
- Arnozky SP, Milachowski KA. Meniscal allografts: Where do we stand? In: Ewing JW. ed *Articular cartilage and knee joint function: Basic science and arthroscopy*. New York: Raven; 1990. p. 129-36.
- Chen J, Iosifidis M, Zhu J, et al. Vanadate ingestion enhances the organization and collagen fibril diameters of rat healing medial collateral ligaments. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006; 14: 750-5.
- Verdonk P, Demurie A, Almpvist KF, et al. Transplantation of viable meniscal allograft. Survivorship analysis and clinical outcome of one hundred cases. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 715-24.
- Verbruggen G, Verdonk R, Veys EM, et al. Human meniscal proteoglycan metabolism in long-term tissue culture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1996; 4: 57-63.
- Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, et al. Insulin- Transferrin-Selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. *Eur Cells Mater* 2005; 9: 58-67.
- García-Giralt N, Izquierdo R, Nogués X, et al. A porous PCL scaffold promotes the human chondrocytes redifferentiation and hyaline-specific extracellular matrix protein synthesis. *J*

- Biomed Mater Res A 2009; 85: 1082-89.
12. Kisiday JD, Kurz B, et al. Evaluation of medium supplemented with insulin-transferrin-selenium for culture of primary bovine calf chondrocytes in three-dimensional hydrogel scaffolds. *Tissue Engineering* 2005; 11: 141-51.
 13. Cheung HS. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res* 1987; 16: 343-56.
 14. DeBeer P, Decorte R, Delvaux S, et al. DNA analysis of a transplanted cryopreserved meniscal allograft. *Arthroscopy* 2000; 16: 71-5.
 15. Fabbriciani C, Lucania L, Milano G, et al. Meniscal allografts: cryopreservation versus deep-frozen technique. An experimental study in goats. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1997; 5: 124-34.
 16. Wada Y, Amiel M, Harwood F, et al. Architectural remodeling in deep frozen meniscal allografts after total meniscectomy. *Arthroscopy* 1998; 14: 250-7.
 17. Arnoczky SP, Dicarolo EF, O'Brien SJ, et al. Cellular repopulation of deep-frozen meniscal autografts: an experimental study in the dog. *Arthroscopy* 1992; 8: 428-36.
 18. Verdonk P, Almqvist KF, Lootens T et al. DNA fingerprinting of fresh viable meniscal allografts transplanted in the human knee. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10 (Suppl A): S43-S44.
 19. Jackson DW, Whelan J, Simon TM. Cell survival after transplantation of fresh meniscal allografts. DNA probe analysis in a goat model. *Am J Sports Med* 1993; 21: 540-50.
 20. Raht E, Richmond JC, Yassir W, et al. Meniscal allograft transplantation. Two-to eight-year results. *Am J Sports Med* 2001; 29: 410-4.
 21. Van Arkel ER, De Boer HH. Human meniscal transplantation. Preliminary results at 2 to 5-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br* 1995; 77: 589-95.
 22. Wirth CJ, Peters G, Milachowski KA, et al. Long-term result of meniscal allograft transplantation. *Am J Sports Med* 2002; 30: 174-81.