

# Efecto de FGF-a, IGF-1, TGF- $\beta$ y OP-1 sobre la proliferación y expresión génica de los condrocitos de cartílago articular de oveja joven, viejo y artrósico

F. Forriol

---

C. Acosta

---

I. Izal

---

P. Ripalda

---

Laboratorio de Ortopedia Experimental.  
Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología.  
Clínica Universitaria. Facultad de Medicina.  
Universidad de Navarra.

## Correspondencia:

Francisco Forriol. Departamento Cirugía Ortopédica y Traumatología. CUN. Avda. Pío XII, s/n. 31009 Pamplona.  
Teléfono: 948 25 54 00. E-mail: fforriol@unav.es

**Objetivo:** estudiamos el comportamiento de los condrocitos obtenidos de cartílago de diferentes condiciones y el efecto que tienen sobre las células algunos factores de crecimiento.

**Material y métodos:** se extrajeron y cultivaron condrocitos del cartílago articular de la rodilla de ovejas jóvenes, viejo y artrósico. Las células cultivadas fueron tratadas con factores de crecimiento (FGF-a, IGF-1, OP-1<sup>®</sup> y TGF- $\beta$ ). Se estudió la tasa de proliferación, mediante ensayos con BrdU, y la expresión génica, mediante ensayos de RT-PCR.

**Resultados:** las células del grupo de cartílago joven tenían una forma redondeada o poligonal, mientras que las células de cartílago viejo y artrósico eran alargadas y fusiformes.

Los condrocitos jóvenes mantuvieron una proliferación superior a la de las células viejas y artrósicas ( $p = 0,002$ ). La FGF-a y la IGF-1, poten-

**Objective:** we studied the behaviour of the chondrocytes harvested from cartilage in different conditions and the effect certain growth factors had on the cells.

**Materials and methods:** knee joint cartilage chondrocytes from young, old and arthritic sheep were extracted and cultured. The cultured cells were then treated with growth factors (FGF-a, IGF-1, OP-1<sup>®</sup> and TGF- $\beta$ ) The rate of proliferation was recorded using BrdU and the gene expression using RT-PCR.

**Results:** the cells from the young cartilage were rounded and polygonal while the old and arthritic cartilage cells were long and fusiform.

The proliferation of young chondrocytes was greater than that of the old and arthritic cells ( $p = 0.002$ ). The FGF-a and IGF-1 enhanced the proliferation rate in the three study groups

cieron la tasa de proliferación en los tres grupos de estudio ( $p < 0,01$ ). La OP-1® aumentó la proliferación únicamente sobre células jóvenes ( $p = 0,015$ ) y el TGF- $\beta$  en células jóvenes ( $p = 0,002$ ) y artrósicas ( $p = 0,004$ ). La combinación de los factores FGF-a e IGF-1 aumentó el efecto ( $p = 0,002$ ) que eran capaces de producir por separado.

Los ensayos de expresión génica en los tres grupos de células sin tratamiento revelaron la elevada expresión de MMP-2 en condrocitos viejos y artrósicos y de TGF- $\beta$  y colágeno tipo I en condrocitos artrósicos.

Los tratamientos con factores de crecimiento no tuvieron efecto en el grupo de células artrósicas. En el grupo de células jóvenes, todos los factores estimularon la expresión de colágeno tipo II. El TGF- $\beta$  estimuló la expresión de agregano y de sí mismo, mientras que la OP-1® estimuló la producción de agregano y el FGF-a la expresión de TGF- $\beta$ . En el grupo de células viejas sólo TGF- $\beta$ , FGF-a e IGF-1 elevaron la expresión de colágeno tipo II.

**Conclusión:** en el trasplante de condrocitos autólogos la calidad y edad del cartílago donante están relacionados con la proliferación celular, y el comportamiento de las células en cultivo puede mejorar con determinados factores de crecimiento.

**Palabras clave:** trasplante de condrocitos, envejecimiento celular, factores de crecimiento.

## Introducción

Es cada vez mayor el interés por desarrollar nuevas técnicas que reparen las lesiones del cartílago articular. Un cambio de mentalidad, en los últimos años, pues con las lesiones articulares la filosofía era efectuar gestos mínimos y dejarla evolucionar hasta que se pudiera indicar una sustitución articular.

Aualmente se realizan, en los Estados Unidos, unas 500.000 cirugías del cartílago<sup>(1)</sup>. Sin embargo, la frecuencia de las lesiones traumáticas del cartílago y las lesiones osteocondrales son desconocidas. Se calcula que un 10% de los pacientes que presentan una lesión traumática aguda de rodilla con hemartros tienen una lesión osteocondral<sup>(2)</sup> y otras dos publicaciones<sup>(3,4)</sup> muestran que la incidencia de los defectos articulares en la población es del 5%, mientras que en grupos con trabajos intensos y actividades deportivas alcanza entre el 22 y el 50%. Curl *et al.*<sup>(3)</sup>, en más de 31.000 artros-

( $p \geq 0,01$ ). OP-1® only increased proliferation of the young cells ( $p = 0,002$ ) and TGF- $\beta$  increased proliferation of the young ( $p = 0,002$ ) and arthritic cells ( $p = 0,004$ ). The combination of factors FGF-a and IGF-1 increased the effect ( $p = 0,002$ ) they were capable of producing on their own.

The gene expression tests conducted on the three groups of untreated cells revealed that the elevation of MMP-2 expression in old and arthritic chondrocytes, and an elevation of TGF- $\beta$  and type I collagen expression in arthritic chondrocytes.

Growth factor treatment had no effect on the group of arthritic cells. In the young cells all the growth factors stimulated type II collagen expression. TGF- $\beta$  stimulated aggrecan expression and itself whilst the OP-1® stimulated aggrecan production and FGF-a stimulated the expression of TGF- $\beta$ . In the group of old cells only TGF- $\beta$ , FGF-a and IGF-1 raised type II collagen expression.

**Conclusion:** when transplanting autologous chondrocytes the age and quality of the donor cartilage does influence cell proliferation, and the behaviour of the cultured cells can be enhanced using certain growth factors.

**Key words:** transplanting chondrocytes, age and quality of cartilage, growth factors.

copias de rodilla, observaron lesiones condrales en el 63% de los intervenidos. En los pacientes menores de 40 años, un 5% tenían un Outerbridge grado IV en el cóndilo femoral interno. Por su parte, Hjelle *et al.*<sup>(4)</sup> evaluaron prospectivamente 1.000 artroscopias por lesión osteocondral encontrando, en un 61% de los casos, lesiones del cartílago con una extensión media de 2 cm<sup>2</sup>.

Aroen *et al.*<sup>(5)</sup> analizaron las artroscopias realizadas en 1.005 rodillas en tres centros hospitalarios. Las radiografías preoperatorias mostraron un 13% de articulaciones con signos degenerativos. Encontraron patología condral, de diversa consideración, en el 66% de los casos y un defecto condral, en el 20% de las rodillas, el 11% se correspondía con lesiones profundas (ICRS grado 3 y 4) y un 6% de todas las rodillas con defectos superiores a 2 cm<sup>2</sup>. Shelbourne *et al.*<sup>(6)</sup>, en 2.270 reconstrucciones de ligamento cruzado anterior (LCA) encontraron 125 lesiones articulares (Outerbridge grados III y IV) con el menisco intacto. Tam-

bién se encontraron en un 23% de las lesiones agudas del LCA y en un 54% de las lesiones crónicas del LCA, laxitud o inestabilidad<sup>(7,8)</sup>.

Es necesario conocer las lesiones de cartílago de forma temprana, para actuar preventivamente e intentar reparar la pérdida de tejido, aunque no está claro que todas las lesiones condrales deban ser reparadas. Sin embargo, carecemos de resultados de larga evolución que justifiquen la mejora con tratamientos comparado con la historia natural del proceso.

El objetivo de nuestro estudio es comparar el comportamiento *in vitro*, analizando la proliferación y la expresión génica, de condrocitos obtenidos del cartílago articular de ovejas jóvenes, viejas y meniscectomizadas, estudiando el efecto que tienen sobre las mismas algunos factores de crecimiento.

## Material y métodos

### Operación y animales

Como fuente de tejido se utilizaron tres corderos (raza híbrida Navarra), de 3 meses de edad y un peso medio de 30-35 kg para los grupos de tejido joven y artrósico y una oveja de 5 años de edad para el grupo de tejido viejo.

El tejido artrósico se obtuvo realizando una meniscectomía interna total en cada rodilla, de dos corderos jóvenes, dejando la evolución durante 2 meses, sacrificando posteriormente al animal.

El sacrificio de los animales se realizó bajo anestesia general con pentobarbital sódico e inyección endovenosa de 5 meq de KCl, tras lo cual se extrajo, en condiciones estériles, la articulación de la rodilla completa y posteriormente el cartílago.

### Extracción de células

El tejido fue colocado en placas de cultivo y troceado con cuchillas estériles. Se añadió pronasa y dispasa (Sigma<sup>®</sup>, 0,5 mg/mL) en medio de cultivo (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-cisteína, penicilina/estreptomina como agentes bactericidas y hepes como amortiguador de pH (Gibco-BRL<sup>®</sup>) y se realizó la digestión, durante la noche, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. El contenido de las placas fue filtrado con gasas estériles y centrifugado a 1.500 rpm y 4 °C, durante 5 minutos. El precipitado de células obtenido fue lavado 3 veces, centrifugando de la misma forma y resuspendiendo en medio de cultivo. Finalmente, el precipitado resuspendido, tras el último lavado, se almacenó en fras-

cos de 75 cm<sup>2</sup>. Las células se mantuvieron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, realizando cambios de medio cada 2-3 días.

### Tratamiento con factores de crecimiento

Los tratamientos con los factores de crecimiento FGF-a (Peprotech<sup>®</sup>), IGF-I (Peprotech<sup>®</sup>), OP-1<sup>®</sup> (Stryker Biotech, Hopkinton, Ma, Estados Unidos) y TGF- $\beta$  (Peprotech<sup>®</sup>) fueron realizados en todos los casos a una concentración de 50 ng/mL, en medio de cultivo sin suero durante 24 horas.

### Ensayos de proliferación

Para los ensayos de proliferación celular se utilizó el sistema *Biotrak*<sup>®</sup> (Amersham-Biosciences<sup>®</sup>), utilizando placas de 96 pocillos con 6 repeticiones por cada tratamiento. Cada experimento fue repetido para confirmar la reproducibilidad y todos fueron realizados con células en pases 1 a 3. Tras el correspondiente tratamiento se añadió bromodeoxiuridina (BrdU) y se realizó una incubación de 2 horas, tras lo cual se fijaron las células y se bloquearon durante 30 minutos, a temperatura ambiente. El anticuerpo anti BrdU fue utilizado a una dilución 1/100 e incubado durante 1 hora y media. El revelado se llevó a cabo mediante TMB hasta la aparición de color. La reacción fue detenida utilizando ácido sulfúrico 1 M y la placa se analizó en un espectrofotómetro adaptado para placas, midiendo la absorbancia a 450 nm.

### Ensayos de RT-PCR

Se recogieron las células de un frasco de 75 cm<sup>2</sup>, mediante centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos y a 4 °C. El precipitado fue resuspendido en 1 mL del reactivo Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) y se extrajo el RNA siguiendo las indicaciones del fabricante. El precipitado final fue resuspendido en 20 mL de agua tratada con DEPC.

Tras la determinación de la concentración de RNA mediante espectrofotometría, se realizaron ensayos de RT-PCR con el sistema *Superscript Platinum RT-PCR System*<sup>®</sup> (Invitrogen). Se utilizó 1 ng de RNA por cada reacción y 20 nmoles de cada uno de los dos cebadores. Finalmente, se programó un termociclador *Omni-gene*<sup>®</sup> (Hybaid, Franklin, EEUU) para realizar la siguiente reacción:

50 °C, 30 minutos, 94 °C, 2 minutos, 1 ciclo.

94 °C, 1 minuto, Tm, 1 minuto, 72 °C, 1 minuto, 30 ciclos.

72 °C, 10 minutos, 1 ciclo.

TABLA 1  
Cebadores utilizados en las reacciones de PCR

Gen	Sec Fw (5'-3')	Sec Rv (5'-3')	Tm (°C)
$\beta$ -actina	TCTACAACGAGCTGCGTGTG	CGTGAGGATCTTCATGAGGT	58
MMP-2	CCCTGTGTCTTCCCCTTCAC	CCTGTTTGCAGAGCTCAGG	60
TGF- $\beta$	TGGACACCAACTACTGCTTC	CAGCTGCACTTGCAGGAGCG	59
Col2a1	GATCCGCAACATGGAGACTGGCGA	CAAGAAGCAGACAGGCCCTATGTCCAC	59
Col 1	CACAAGGAGTCTGCATGTCT	G TTCACCAGGCTCACCAGCA	59
Agrecano	ACGCCATCTGCTACACA	AAGGCTCCTCAGGTTCTGG	59

Los cebadores empleados y su temperatura de *annealing* o Tm se ven reflejados en la **Tabla 1**. Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa y fotografiados y analizados en un sistema Gel Doc 2000<sup>®</sup> (Bio-Rad).

### Estadística

Los datos obtenidos en los ensayos de proliferación fueron comparados utilizando los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney, con el programa SPSS 9.0 para Windows<sup>®</sup>. El primero se utilizó para determinar las diferencias entre todos los tratamientos, y el segundo para las diferencias entre cada tratamiento. Se consideró un valor inferior a 0,05 como significativo e inferior a 0,01 como muy significativo.

## Resultados

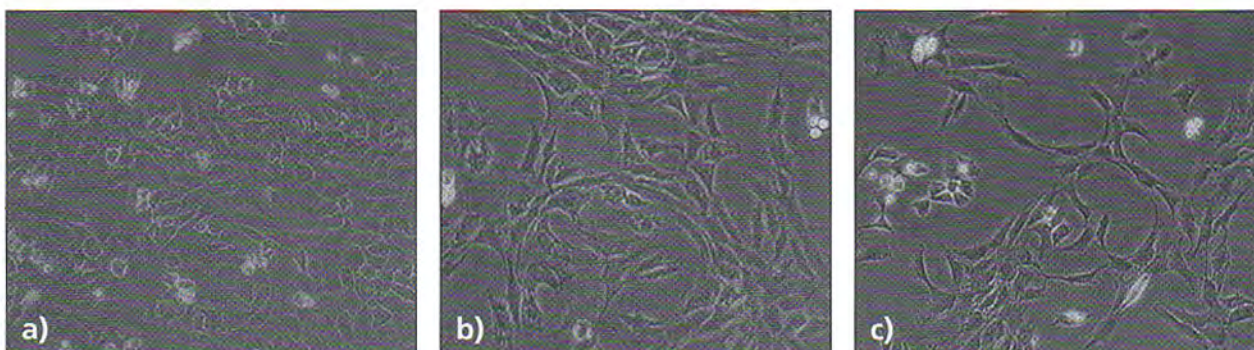
Tras la extracción de células, se analizó la morfología mediante microscopio óptico invertido y se to-

maron fotografías de los 3 grupos en pase 0. Las células obtenidas en el grupo de cartílago joven conservaron una forma redondeada o poligonal, mientras que las correspondientes a los grupos de células de cartílago viejo y artrósico perdieron su forma original y adquirieron una morfología alargada y con prolongaciones típicas de células fibroblásticas (**Figura 1**).

### Proliferación

Los ensayos de proliferación realizados con BrdU mostraron cómo los condrocitos jóvenes mantuvieron una proliferación significativamente superior a la de las células viejas y artrósicas ( $p = 0,002$ ), mientras que estos dos últimos grupos no difirieron entre sí de forma significativa ( $p > 0,05$ ) (**Figura 2**).

El tratamiento con los distintos factores de crecimiento demostró que el FGF-a y el IGF-I potenciaron de forma significativa la tasa de proliferación en los tres grupos de estudio ( $p < 0,01$ ). La proteína osteogénica OP-1<sup>®</sup>, por su parte, sólo potenció la proliferación celular en el grupo de células procedentes de cartílago joven ( $p = 0,015$ ), mientras que el TGF- $\beta$



**Figura 1.** Morfología del cultivo celular. a) Células de cartílago joven. b) Células de cartílago viejo. c) Células de cartílago artrósico.

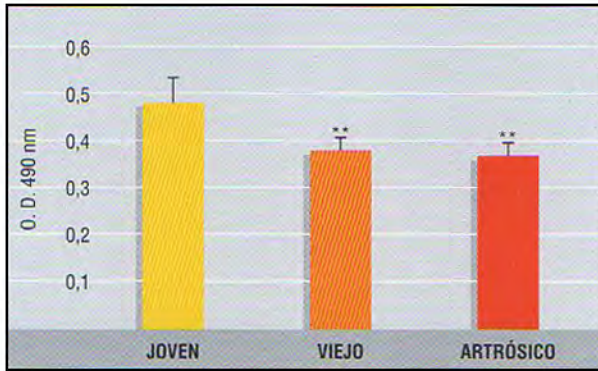


Figura 2. Ensayos de proliferación con BrdU.

aumentó la proliferación en células jóvenes ( $p = 0,002$ ) y artrósicas ( $p = 0,004$ ), pero no en las células viejas ( $p > 0,05$ ) (Figura 3).

La combinación de los factores FGF-a e IGF-I estimuló de forma significativa el efecto ( $p = 0,002$ ) que fueron capaces de producir por separado (Figura 3).

### Expresión génica

Los ensayos de expresión génica fueron realizados mediante experimentos de RT-PCR. Los resulta-

dos de los 3 grupos de células, sin ningún tipo de tratamiento, revelaron cómo la MMP-2 elevó su expresión en condrocitos viejos y artrósicos, mientras que el TGF-β y el colágeno tipo I lo hicieron en condrocitos artrósicos. Únicamente el colágeno de tipo II disminuyó su expresión en células procedentes de cartílago viejo (Figura 4).

Para analizar la estimulación de la expresión de matriz extracelular se ensayaron los genes correspondientes a TGF-β, colágeno de tipo II y agregano. Los tratamientos con factores de crecimiento modificaron la expresión tal y como se observa en la Figura 5. En el grupo de células jóvenes todos los factores ensayados fueron capaces de estimular la expresión de colágeno de tipo II. El TGF-β produjo además una estimulación de la expresión de agregano y de sí mismo, mientras que la OP-1<sup>®</sup> fue capaz de estimular la producción de agregano, y el FGF-a la expresión de TGF-β.

En el grupo de células viejas únicamente TGF-β, FGF-a e IGF-I elevaron la expresión de colágeno de tipo II. El TGF-β logró estimular la expresión de agregano y de sí mismo, y el FGF-a potenció también la expresión de TGF-β. Las células procedentes de tejido artrósico no resultaron sensibles a ningún tratamiento utilizado. La proteína osteogénica OP-1<sup>®</sup> sólo

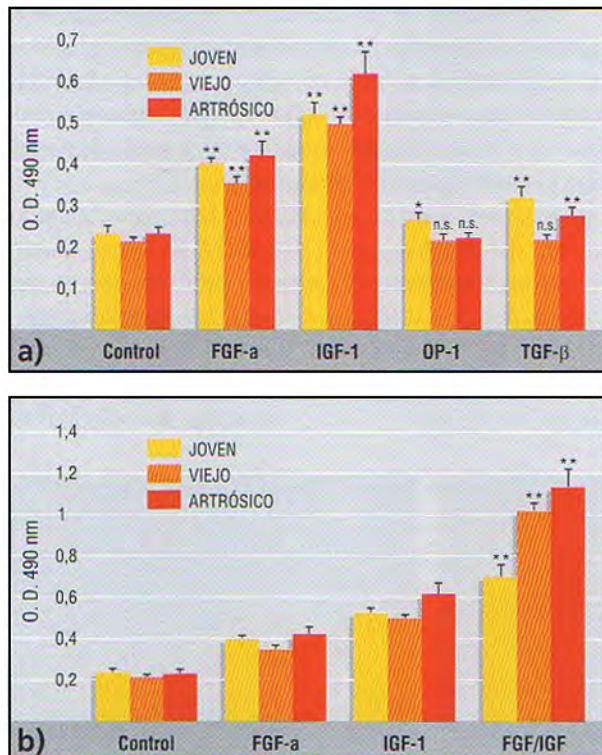


Figura 3. a) Tratamiento con diferentes factores de crecimiento. b) Tratamiento con la combinación de FGF-a/IGF-I, comparado con el tratamiento aislado con cada uno de los factores.

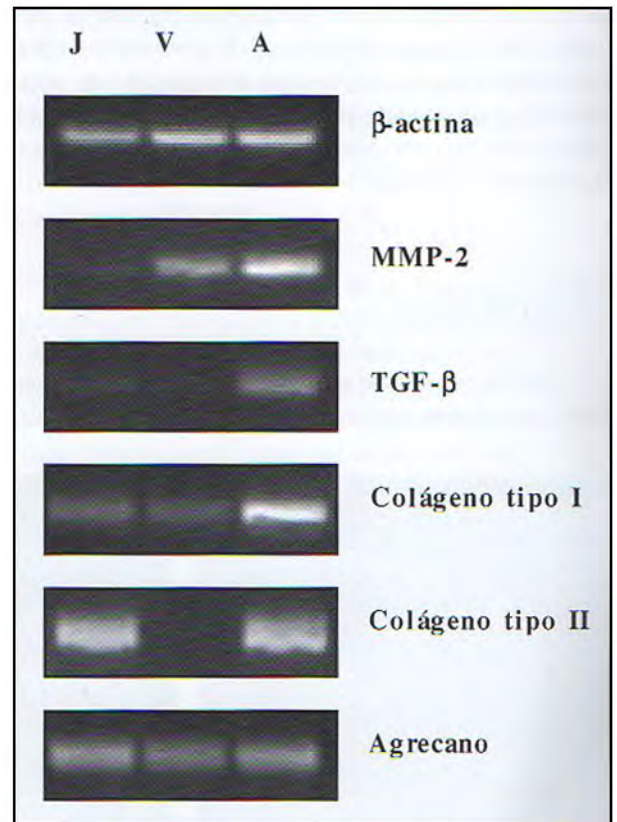


Figura 4. Ensayo de expresión génica (RT-PCR) (J = joven, V = viejo, A = artrósico).

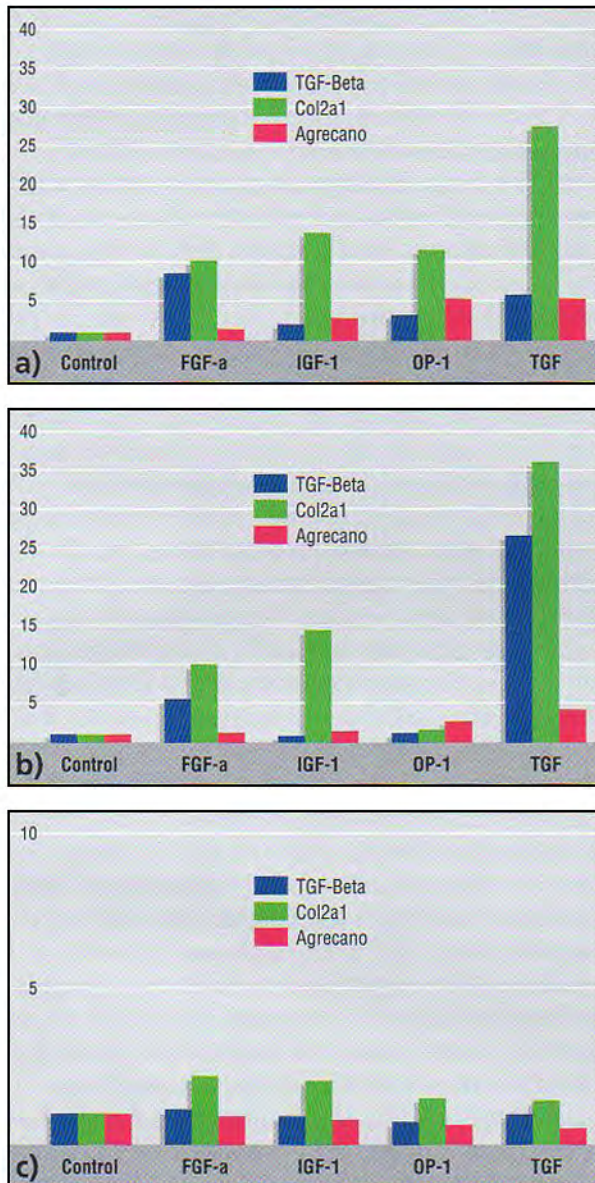


Figura 5. Estimulación de la expresión de la matriz extracelular mediante factores de crecimiento. a) Células cartilago joven. b) Células de cartilago viejo. c) Células de cartilago artrósico.

fue capaz de producir un efecto significativo en la expresión génica en células jóvenes.

## Discusión

El trasplante de condrocitos autólogos cultivados «in vitro» (ACI) ha sido una de las primeras biotecnologías aplicadas en cirugía ortopédica. Los estudios originales de esta técnica fueron realizados en conejos,

con un 82% de buenos resultados, y numerosos estudios han demostrado sus resultados clínicos beneficiosos<sup>(9-14)</sup>.

La técnica, publicada por Brittberg *et al.*<sup>(15)</sup>, recoge cartilago de zonas de descarga, en la mitad superior del cóndilo femoral medial, de la rodilla afectada. Después de ser digerido con colagenasa, es filtrado y resuspendido en un medio de cultivo suplementado con suero del paciente, y las células están listas para su implantación después de 14-21 días. Es una técnica compleja, cara y que presenta ciertos inconvenientes que necesitan ser mejorados.

En el momento de la implantación se debe limpiar la lesión condral hasta observar tejido cartilaginoso normal. El defecto se recubre con periostio, obtenido de la cara medial de la tibia proximal, y suturado en el borde del defecto. Los condrocitos cultivados son inyectados debajo del parche que se cierra herméticamente con fibrina. Se recomiendan movimientos activos y sin carga, 2-3 días después de la intervención.

El número de células a implantar es importante, LeBaron y Athanasiou<sup>(16)</sup> han señalado que los moldes de poliláctico y poliglicólico con una densidad menor de 10 millones de células/mL forman poco cartilago. En clínica<sup>(14)</sup> se deben trasplantar 30 millones de células/mL.

La indicación de esta técnica es para grandes defectos articulares en el cóndilo femoral y la tróclea, incluyendo la osteocondritis disecante, en pacientes desde la adolescencia hasta los 50 años de edad. Los resultados obtenidos en las lesiones rotulianas y tibiales tampoco han sido buenos<sup>(17)</sup>. Por el contrario, no está indicada como tratamiento en las artrosis moderadas o graves, ni tampoco en presencia de lesiones óseas bipolares, ni tampoco en pacientes con una infección o en el proceso agudo de una artritis inflamatoria.

Más de 6.000 pacientes han sido sometidos a esta técnica con seguimientos de hasta 14 años y se han publicado resultados muy variados según la patología. Los resultados publicados han sido buenos en un 75% de los pacientes. Las células cultivadas y trasplantadas pueden curar la lesión por diversos mecanismos: 1) los condrocitos implantados repueblan el defecto y producen una nueva matriz de cartilago. El parche de periostio aísla las células y permite que se incuben, diferencien y rellenen el defecto; 2) los factores de crecimiento orgánicos son capaces de estimular los condrocitos cultivados para que se dividan; o 3) el periostio estimula los condrocitos en el cartilago adyacente, en el hueso subcondral o en el periostio, para entrar en el defecto y reparar el mismo.

Experimentalmente<sup>(18)</sup> se ha demostrado la capacidad de los condrocitos trasplantados para formar car-

tílago en los defectos condrales, aunque Breinan *et al.*<sup>(19)</sup>, en perros, no encontraron diferencias comparando el trasplante de periostio únicamente con el ACI recubierto de periostio con 12 y 18 meses de evolución.

Peterson *et al.*<sup>(11)</sup> publicaron sus primeros 100 pacientes, con seguimiento entre 2 y 9 años. El 92% con lesión aislada de fémur y el 89% con defectos osteocondrales tuvieron resultados satisfactorios. Además, 30 de 31 pacientes mantuvieron el mismo grado de satisfacción con la técnica a los siete años y medio como al principio.

Bahuaud *et al.*<sup>(20)</sup> encontraron que tras el ACI, en una población militar, volvieron a su actividad un 84% de los intervenidos. Otras series<sup>(21,22)</sup> han observado resultados clínicos similares, y un 75% de las biopsias realizadas encontraron un tejido de reparación hialino.

Comparando el ACI con la mosaicoplastia se han encontrado un 88% de buenos resultados con el ACI y un 69% con la mosaicoplastia, con un seguimiento de 19 meses. Sin embargo, en la revisión artroscópica al año de la intervención, el ACI presentó un 82% de buenos resultados, descendiendo el grupo de mosaicoplastia al 34%<sup>(23)</sup>.

Minas y Chiu<sup>(13)</sup> recogen 235 pacientes tratados con ACI, con un 87% de éxitos, 6 años después de la intervención. La mayoría de los pacientes tenían lesiones complejas con otras alteraciones o eran pacientes con lesiones degenerativas tempranas, con osteofitos y pérdida del espacio interarticular. Este tipo de pacientes no obtuvo los mejores baremos clínicos y funcionales; sin embargo, fueron los que mostraron mayor satisfacción con sus resultados.

Brittberg *et al.*<sup>(14)</sup>, en una revisión de 244 pacientes tratados con ACI, y una evolución entre 2 y 10 años, en lesiones del cóndilo femoral o en osteocondritis disecante encontraron un 84 y un 90% de buenos y excelentes resultados, mientras que el porcentaje disminuyó a un 74% en otras localizaciones. Además, señalaron que los efectos fueron duraderos. En 61 pacientes, con una evolución media de 7 años, a los dos años, 50 de los 61 pacientes seguían teniendo un resultado bueno o excelente. Los fracasos fueron del 16%, a los 7 años de evolución, y todos ocurrieron en los dos primeros años.

Gillogly<sup>(17)</sup> también encontró, en 112 pacientes tratados con ACI, un 91% de buenos y excelentes resultados con seguimientos superiores a los cinco años. En los pacientes que tenían seguimientos superiores a los dos años vieron un aumento del baremo funcional observando que no descendía en años posteriores. No se vieron diferencias en relación con el sexo, el tamaño del defecto femoral o entre defectos aislados o asociados a otras lesiones. Sin embargo, señala mejores re-

sultados cuando se tratan lesiones agudas, con evolución inferior a un año que en las lesiones crónicas.

Henderson *et al.*<sup>(24)</sup>, revisando 22 pacientes de los 135 trasplantes de condrocitos efectuados, observaron una buena integración del cartílago con el hueso subcondral y con el cartílago del paciente, demostrando, en un 70% de los casos, cartílago hialino en las biopsias. Sin embargo, en su casuística un 13% de los casos necesitaron ser reintervenidos, generalmente, por la extrusión del parche perióstico.

Sin embargo, también se han dado a conocer otros resultados que nos parecen de interés. Knutsen *et al.*<sup>(25)</sup>, en 80 pacientes con lesión focal del cóndilo femoral y tamaños entre 2 y 10 cm<sup>2</sup>, fueron tratados en cuatro hospitales de forma aleatoria. Comparando el ACI con las microfracturas, vieron que al año los resultados fueron mejores, aunque no estadísticamente significativos, en los pacientes tratados con microfracturas que con ACI.

Por su parte, Horas *et al.*<sup>(26)</sup>, en un estudio prospectivo, en 40 pacientes con una lesión focal del cartílago del cóndilo femoral, con evolución de dos años, tratados con injertos cilíndricos osteocondrales autólogos o con ACI, concluyen que ambos tratamientos disminuyeron los síntomas de forma similar. Histológicamente los defectos tratados con ACI formaron en un primer momento fibrocartílago, mientras que los cilindros osteocondrales trasplantados retuvieron su carácter hialino.

Un estudio internacional multicéntrico, el Cartilage Registry Report<sup>(27,28)</sup>, encontró que el 78% de los defectos tratados con ACI mejoran sus resultados. Entre las complicaciones señalan las adherencias intraarticulares como la más frecuente (2%), seguida de la laminación y la pérdida del implante, sin olvidar la hipertrofia del periostio<sup>(14)</sup>.

Micheli *et al.*<sup>(29)</sup>, en otro estudio multicéntrico de ACI recubierto de periostio y un seguimiento de 3 años, en 50 pacientes con una edad media de 36 años y un defecto medio de 4,2 cm<sup>2</sup> encontraron una supervivencia del implante del 94%.

La técnica del trasplante de condrocitos está muy difundida para reparar defectos condrales y osteocondrales. Los condrocitos se obtienen del propio paciente. Pero no todos los pacientes tienen la misma calidad de cartílago y, por lo tanto, sus células tendrán una capacidad reparadora distinta. La edad y el estado del cartílago articular son, desde nuestro punto de vista, dos variables fundamentales.

En nuestros resultados la proliferación de los condrocitos disminuye tanto en cartílago viejo como en degenerado o artrósico. Así mismo, la expresión de algunos genes también está modificada. Es el caso de la metaloproteinasa MMP-2, que eleva su expresión al al-

terarse el cartílago, bien sea por la edad, por la artrosis. Por su parte, tanto el colágeno de tipo I como el factor de crecimiento TGF- $\beta$ , son sobreexpresados en células procedentes de cartílago artrósico.

En los últimos años han cobrado interés los estudios que definen la respuesta bioquímica del cartílago a los factores de crecimiento y se ha comprobado que estos agentes estimulan la síntesis de la matriz extracelular del cartílago, inhiben y activan las proteasas<sup>(30-32)</sup>. El mecanismo de acción no está definido, pero se relaciona con la interacción de los factores de crecimiento con los receptores de superficie de las células diana, poniendo en marcha cascadas de señales que culminan con la activación de genes nucleares que determinan la proliferación, la diferenciación y la muerte celular.

El factor de crecimiento IGF-I está considerado como el principal factor anabólico en el cartílago. Los condrocitos del cartílago articular expresan receptores para IGF-I fundamentalmente en las zonas media y profunda<sup>(33)</sup>. El IGF-I estimula el ADN y la síntesis de colágeno en el cartílago de crecimiento, en el cartílago inmaduro y, también, en el cartílago articular maduro. Los IGF, especialmente el IGF-I, estimulan las síntesis de proteoglicanos, colágeno II e integrinas, a la vez que inhiben la destrucción de la matriz extracelular, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta y favorecen la adhesión de los condrocitos, a la fibronectina y al colágeno II<sup>(32)</sup>. Se desconoce si son sintetizados localmente o en el hígado, y son más efectivos cuando se administran conjuntamente con otros factores, exceptuando a la insulina.

El factor de crecimiento TGF- $\beta$  es muy abundante en el cartílago. En cultivo, ha demostrado potenciar la proliferación y la síntesis de matriz de las células del cartílago<sup>(33,35)</sup>. Otros estudios sugieren la implicación del TGF- $\beta$  en la maduración y diferenciación de condrocitos modulando su proliferación y aumentando la actividad fosfatasa alcalina<sup>(36-38)</sup>. También existen otros factores que, si bien menos estudiados, podrían tener efectos beneficiosos y mejorar las posibilidades de los condrocitos. Tal es el caso de proteínas de la familia de las BMPs, del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) o del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

La combinación de técnicas de ACI con la potenciación de la capacidad del condrocito de proliferar y de producir matriz extracelular podría eliminar algunos de los problemas que presenta la implantación de

condrocitos. Normalmente, los condrocitos poco diferenciados o jóvenes presentan mejor respuesta a los factores tróficos, mientras que los condrocitos fetales son más sensibles a los factores tróficos anabolizantes<sup>(39-41)</sup>. Presentamos la conveniencia de utilizar condrocitos de cartílago joven o en buen estado frente a condrocitos procedentes de un cartílago dañado o viejo. Podríamos potenciar sus capacidades reparadoras gracias a tratamientos combinados con alguno de los factores de crecimiento estudiados. En concreto, la combinación FGF-a e IGF-I estimula la proliferación, mientras que un tratamiento con TGF- $\beta$  potencia la producción de matriz extracelular.

El trasplante de condrocitos es la confirmación del interés de las llamadas biotecnologías en la reparación articular. Sin embargo, requiere mejorar y solucionar algunos de los problemas que plantea, conocer la calidad de los condrocitos que se cultivan para mejorar su proliferación y anclaje, así como su capacidad para expresar una matriz extracelular semejante al cartílago hialino. Mejorar la técnica de obtención de las células y, sobre todo, de implantación desarrollando las matrices adecuadas para ser colocadas con el artroscopio simplificarán la técnica y abaratarán sus costes.

La actividad de los factores de crecimiento utilizados, FGF-a, IGF-I, TGF- $\beta$  y OP-1<sup>®</sup>, varía según el estado del cartílago del que proceden las células. La proteína osteogénica OP-1<sup>®</sup> únicamente ejerce su efecto sobre células de cartílago joven, mientras que FGF-a, IGF-I o la combinación de ambas resultan potentes estimuladores de la proliferación celular, independientemente del estado del cartílago. Por su parte, si atendemos a la expresión de matriz extracelular, hemos comprobado que las células procedentes del cartílago artrósico no fueron sensibles a ninguno de los factores de crecimiento con las concentraciones utilizadas. Aunque tanto en células jóvenes como viejas el TGF- $\beta$  resultó el mejor estimulador de la expresión de la matriz.

Estos resultados demuestran que con el ACI la calidad y edad del cartílago donante está relacionada con la proliferación celular y que el comportamiento de los condrocitos *in vitro* puede mejorar con determinados factores de crecimiento.

## Agradecimientos

A Stryker-Biotech por el suministro de OP-1<sup>®</sup>.



## Bibliografía

- Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, Porti D, Pergolizzi RG, Grande DA. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin orthop* 2000; 379 (Supl): 171-8.
- Noyes F, Bassett R, Grood E, Butler DL. Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee: incidence of anterior cruciate tears and other injuries. *J Bone Joint Surg (Am)* 1980; 62-A: 687-95.
- Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31.516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 1997; 13: 456-60.
- Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1000 knees arthroscopies. *Arthroscopy* 2002; 18: 730-4.
- Aroen A, Loken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, et al. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med* 2004; 32: 211-5.
- Shelbourne KD, Jari S, Gray T. Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee. A natural history study. *J Bone Joint Surg (Am)* 2003; 85-A (suppl 2): 8-16.
- Indelicato PA, Bittar ES. A perspective of lesions associated with ACL insufficiency of the knee. A review of 100 cases. *Clin Orthop* 1985; 198: 77-80.
- Zamber RW, Teitz CC, McGuire DA, Frost JD, Hermanson BK. Articular cartilage lesions of the knee. *Arthroscopy* 1989; 5: 258-68.
- Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akelund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. *Biomechanics and long-term durability. Am J Sports Med* 2002; 30: 2-12.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation. *J Bone Joint Surg (Am)* 2003; 85-A (Suppl 2): 17-24.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Janssan E, Lindahl A. Two to nine year outcomes after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 2000; 374: 212-34.
- Minas T, Peterson L. Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation. *Clin Sports Med* 1999; 18: 13-44.
- Minas T, Chiu R. Autologous chondrocyte implantation. *Am J Knee Surg* 2000; 13: 41-50.
- Brittberg M, Peterson L, Sjörgen-Larsson E, Tallheden T, Lindahl A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-A (Suppl 3): 109-15.
- 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.
- LeBaron RG, Athanasiou KA. Ex vivo síntesis of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; 21: 2575-87.
- Gillogly SD. Treatment of large full-thickness chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *Arthroscopy* 2003; 19 (Suppl 1): 147-53.
- Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 1989; 7: 208-18.
- Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg (Am)* 1997; 79-A: 1439-51.
- Bahuaud J, Maitrot RC, Bouvet R, Kerdiles N, Tovaglia-ro F, Synave J et al. Implantation of autologous chondrocytes for cartilaginous lesions in young patients. A study of 24 cases. *Chirurgie* 1998; 123: 568-71.
- Haugegaard M, Lundsgaard C, Vibe-Hansen H. Treatment of cartilage defects with autologous chondrocyte implantation. Preliminary results. *Acta orthop scand* 1998; 2: 11-5.
- Richardson J, Catterson B, Evans E, Ashton B, Roberts S. Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg (Br)* 1999; 81-B: 1.064-8.
- Bentley G, Biant LC, Carrington M, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg (Br)* 2003; 85-B: 223-30.
- Henderson I, Tuy B, Oakes B. Reoperation after autologous chondrocyte implantation. Indications and findings. *J Bone Joint Surgery (Br)* 2004; 86-B: 205-11.
- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, et al. Autologous chondrocyte implantation versus microfracture. A prospective randomised Norwegian multicenter trial. 4<sup>th</sup> International Cartilage Research Soc Symposium 2002; June 15-18, Toronto, Canada.
- Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg (Am)* 2003; 85-A: 185-92.
- Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, et al. Histological assessment of

- cartilage repair. A report by the histology endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg (Am)* 2003; 85-A: 45-57.
28. Mandelbaum B, Browne J, Fu F, Micheli L, Mosely B, Erggelet C. Current concepts on articular cartilage lesions of the knee. *Am J Sport Med* 1998; 26: 853-61.
  29. Micheli LJ, Browne JE, Erggelet C, Fu F, Mandelbaum B, Moseley JB, et al. Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experiences and minimum of 3-year follow-up. *Clin J Sport Med* 2001; 11: 223-8.
  30. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factor I and II peptide messenger ribonucleic and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrine Rev* 1989; 10: 68-91.
  31. Seyedin SM, Rosen DM. Matrix proteins of the skeleton. *Current Opinion Cell Biol* 1990; 2: 914-9.
  32. Takigawa M, Okawa T, Pan H, Aoki C, Takahashi K, Zue J, et al. Insulin-like growth factors I and II are autocrine factors in stimulation proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective receptors on a clonal human chondrosarcoma derived cell line HCS-2/8. *Endocrinology* 1997; 138: 4390-400.
  33. Reed MJ, Vernon RB, Abrass IB, Sage EH. 1994. TGF-beta-1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J Cell Phys* 1994; 158: 169-79.
  34. Smith RJ, Justen JM, Nidy EG, Sam LM, Bleasdale JE. Platelet-derived growth factor potentiates cellular responses of articular chondrocytes to interleukin-1. *Arthr Rheum* 1991; 34: 697-706.
  35. Fortier LA, Nixon AJ, Mohammed HO, Lust G. Altered biological activity of equine chondrocytes cultured in a three-dimensional fibrin matrix and supplemented with transforming growth factor beta-1. *Am J Vet Res* 1997; 58: 66-70.
  36. Burton-Wurster N, Lust G. Fibronectin and proteoglycan synthesis in long term cultures of cartilage explants in Ham's F12 supplemented with insulin and calcium: Effects of the addition of TGF-beta. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283: 27-33.
  37. Pelton RW, Moses HL. The beta-type transforming growth factor. *Mediators of cell regulation in the lung. Am Rev Respir Dis* 1990; 142: S31-S35.
  38. Chen JK, Hoshi H, McKeehan WL. Stimulation of human arterial smooth muscle cell chondroitin sulfate proteoglycan synthesis by transforming growth factor beta. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991; 27: 6-12.
  39. Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA. Age-related decline in chondrocytes response to insulin-like growth factor binding proteins. *J Orthop Res* 1997; 15: 491-8.
  40. Nixon AJ, Lillich JT, Burton-Wurster N, Lust G, Mohammed HO. Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultures with insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-I and transforming growth factor. *J Orthop Res* 1998; 16: 531-41.
  41. Schafer SJ, Luyten FP, Yanagishita M, Reddi AH. Proteoglycan metabolism is age related and modulated by isoforms of platelet-derived growth factors in bovine articular cartilage explants cultures. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 431-8.