

Efecto de un factor de crecimiento (OP-1®) en la reparación de la zona avascular del menisco

F. Forriol, P. Ripalda

Laboratorio de Ortopedia Experimental. Universidad de Navarra. Pamplona

Correspondencia:

Francisco Forriol Departamento COT. CUN
Av. Pío XII s/n
31008 Pamplona

Objetivo: Estudiar el efecto de la OP-1® (BMP-7) en la reparación de la zona avascular del menisco.

Material y metodología: Se utilizaron 24 corderos, de 4 meses de edad y un peso medio de 30-35 kg, divididos en 6 grupos, de 4 animales cada uno, según el tratamiento seguido y el tiempo de evolución. Se establecieron dos grupos, uno control (pasta de celulosa Putty®) y otro con pasta y proteína OP-1® que evolucionaron durante 6, 12 y 25 semanas. Extraídos los meniscos, se efectuaron estudios de histología.

Resultados: La pasta de celulosa (Putty®) permaneció las primeras 6 semanas y, posteriormente, se reabsorbió y desapareció. En todas las muestras con OP-1® (BMP-7) se visualizó la penetración celular desde la superficie meniscal y la formación de un tejido fibroso en el interior de los orificios, a partir de la 12ª semana. Animales tratados con OP-1® mostraron a las 25 semanas un tejido de reparación muy semejante al del menisco normal.

Conclusiones: Aunque se precisan nuevos estudios, la proteína morfogénica BMP-7 (OP-1®) puede ser un material adecuado para ser implantado artroscópicamente y directamente en la articulación de la rodilla, para la reparación meniscal y del cartílago.

Palabras claves: Menisco. Reparación. BMP 7. OP-1®.

Los meniscos tienen enorme facilidad para lesionarse y escasa capacidad para la reparación. Se han encontrado roturas meniscales en más del 65 % de individuos asintomáticos que son evaluados con la resonancia magnética (RM)⁽¹⁾. La meniscectomía fue, durante muchos años, el tratamiento de elección de una rotura meniscal

Aim: To assess the effects of OP-1® (BMP-7) on meniscus avascular zone repair.

Material and methods: Twenty-four four-month-old sheep with a mean weight of 30-35 kg were used in the study. The animals were divided into six groups of four animals each according to the therapy used and the evolution period. Two experimental groups were established: in the control one Putty® cellulose paste was used, while in the study group cellulose paste with OP-1® protein was employed. The evolution period was 6, 12 and 25 weeks for the two experimental groups.

Results: The Putty® cellulose paste remained in place for the first six weeks, and later it was reabsorbed and disappeared. In all the samples with OP-1® (BMP-7) cell penetration from the meniscal surface was seen, with formation of fibrous tissue within the orifices from the 12th week onwards. After 25 weeks, the animals treated with OP-1® evidenced a repair tissue that was quite similar to that in the normal meniscus.

Conclusions: Although further studies are required, the morphogenic BMP-7 (OP-1®) protein might be an adequate material for direct arthroscopic implantation in the knee joint for meniscal and cartilage repair.

Key words: Meniscus. Repair. BMP-7. OP-1®.

con excelentes resultados clínicos a corto plazo, pero cada vez se pone mayor énfasis en reparar lesiones meniscales aunque sean complejas y se localicen en la zona avascular del menisco para evitar la degeneración del cartílago y del propio menisco^(2,3). Actualmente se acepta que las roturas longitudinales de la periferia vascular de-

ben ser reparadas ya que en la mayoría de los casos cicatrizan. Sin embargo, es dudosa la reparación meniscal en la zona avascular⁽⁴⁾.

La biotecnología puede aportar soluciones a la reparación del fibrocartilago. Las nuevas técnicas de reparación han intentado el raspado de la lesión, trefinación, terapia génica, factores de crecimiento, injertos de sinovial, fibrina, implantes de colágeno, corrientes de alta frecuencia, estimulación por láser o polímeros fotoactivos⁽⁵⁾.

Los factores de crecimiento, solos o combinados entre sí, pueden ser una solución técnicamente sencilla y biológicamente controlada, incorporados en el biomaterial adecuado. Como transportadores se recomiendan sustancias porosas y biodegradables que mantienen la concentración de los factores de crecimiento en el lugar de colocación⁽⁶⁾. El índice de degradación del biomaterial tiene que ser compatible con el índice de formación o reparación, de tal manera que la integridad mecánica de la reparación no se vea comprometida con la eliminación del material, acorde con el tipo de tejido a tratar.

El objetivo de este trabajo es, en un estudio preliminar, conocer el proceso de curación de una lesión cilíndrica en la zona avascular del menisco aportando BMP-7 (OP-1[®]) sobre una matriz de celulosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 24 corderos (*Ovis aries*) de raza híbrida, de 4 meses de edad y un peso medio de 30-35 kg, divididos en 6 grupos, de 4 animales cada uno, según el tratamiento seguido y el tiempo de evolución. El estudio se realizó en el menisco interno de la rodilla izquierda del animal. El trabajo contó con la aprobación de la Comisión Deontológica de la Universidad de Navarra para la experimentación animal.

En los animales se efectuaron dos orificios en la zona avascular de la mitad anterior del menisco. En el grupo de animales control se rellenaron los orificios con una pasta de celulosa (Putty[®]), y los otros se rellenaron de celulosa (Putty[®], Stryker Biotech, Hopkinton, Ma, EE UU) y BMP-7 (OP-1[®], Stryker Biotech, Hopkinton, Ma, EE UU). Según el relleno y el momento del sacrificio, se establecieron los siguientes grupos:

A. Grupos control: I: sacrificio del animal a las 6 semanas; II: sacrificio del animal a las 12

semanas; y III: sacrificio del animal a las 25 semanas.

B. Aporte de OP-1[®]: IV: sacrificio del animal a las 6 semanas; V: sacrificio del animal a las 12 semanas; y VI: sacrificio del animal a las 25 semanas.

Técnica quirúrgica

Se utilizó anestesia general sin intubación endotraqueal. Se canuló la vena cefálica presente en la extremidad anterior derecha. Una vez canulada, se conectó a un sistema de gotero a través del cual se suministró también fluidoterapia de mantenimiento con suero glucosado al 5%. La inducción anestésica se consiguió mediante la administración por vía intravenosa de tiobarbital (Abbott), 12 mg/kg; atropina (B. Braun), 0,5 mg/kg; y fentanil (Kern), 0,015 mg/kg.

La vía de abordaje elegida fue antero-medial, luxando externamente la rótula. Se seccionó parcialmente el ligamento lateral interno, llegando al plano capsular.

Con una trefina se efectuaron dos cilindros de cuatro milímetros de diámetro, en la zona avascular de la mitad anterior del cuerpo del menisco, atravesando todo el espesor del menisco.

El cierre de la artrotomía interna se efectuó con puntos sueltos de Dexon[®] 2/0, suturando el ligamento lateral interno y cerrando la piel con seda.

La OP-1[®] se presenta en envases de 1 cm³ en forma de polvo deshidratado. Previamente a su colocación se realizó la apertura del envase y se introdujo en el mismo 2 mL de una solución salina estéril (NaCl 0,9%). La mezcla se homogeneizó con una espátula metálica y se colocó relleno los orificios.

La pauta antibiótica utilizada fue de ketoprofeno 3 mg/kg, vía intramuscular (i.m.), cada 24 horas durante los 3 días posteriores a la intervención. Los animales deambularon libremente en su jaula y dispusieron de comida y agua *ad libitum* desde el primer día después de la intervención. Fueron controlados diariamente, para evaluar su deambulación y la evolución de la herida quirúrgica.

Los animales se sacrificaron según el grupo correspondiente. Antes de sacrificarlo, cada animal fue sedado con una dosis (i.m.) de ketamina (10 mg/kg) y xilacina (0,2 mg/kg). Seguidamente se le administró vía endovenosa (vena

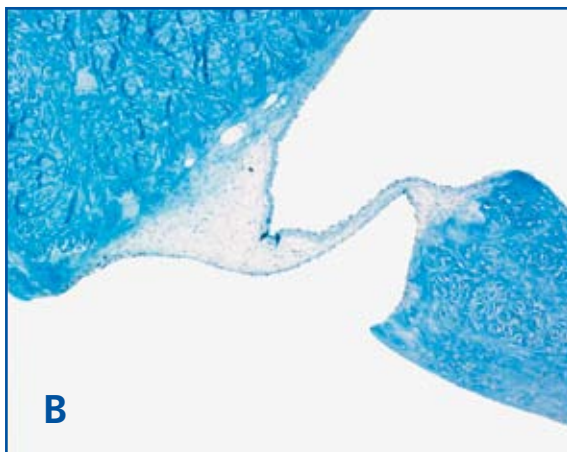
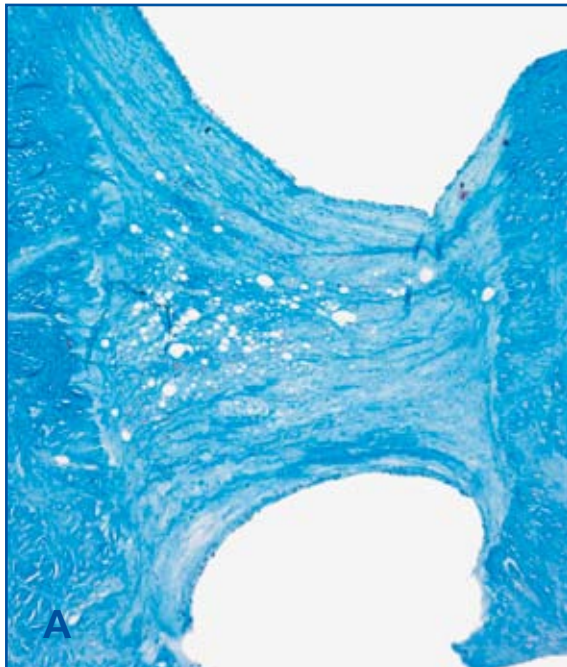


Figura 1. Grupo control, 6 semanas de evolución. Relleno parcial del orificio. A: tricrómico de Masson, $\times 4$; B: tricrómico de Masson, $\times 10$.

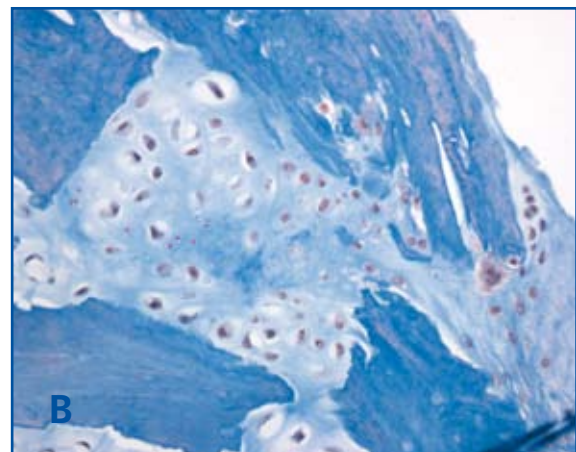
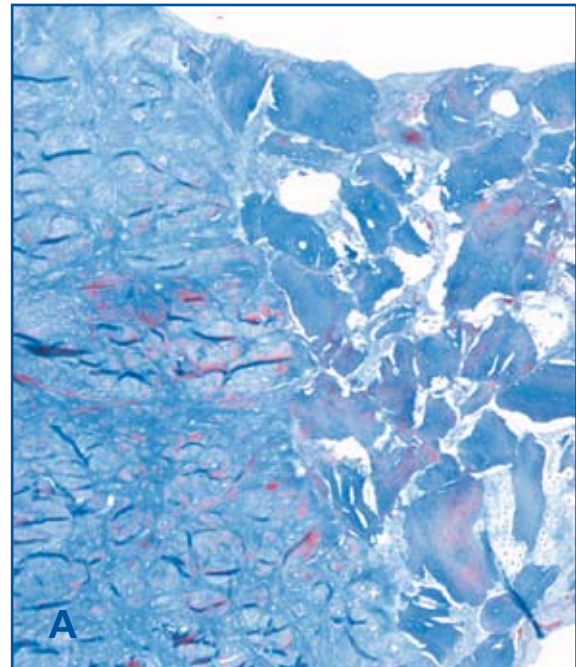


Figura 2. Grupo con OP-1®, 6 semanas de evolución. Relleno del orificio con restos de la pasta de celulosa e infiltrado celular. A: tricrómico de Masson, $\times 4$; B: tricrómico de Masson, $\times 10$.

safena) 1 g de tiobarbital y 20 mL de cloruro potásico (KCl).

Una vez extraído, el menisco se seccionaba radialmente delimitando la zona de la lesión. La fijación de las piezas se efectuó en formol, al 4%, tamponado con fosfatos, durante 24 horas. La deshidratación de las piezas se realizó mediante alcoholes de gradación creciente (70%, 80%, 96% y 100%), cambiando dichos alcoholes cada 12 horas, en agitación constante. Posteriormente se introdujeron en xileno durante 4 horas y se incluyeron en para-

fina a una temperatura de 60 °C. Finalmente, se realizaron cortes de 4 μ m de grosor en un microtomo convencional y se tiñeron con tricrómico de Masson y safranina-O.

RESULTADOS

El grupo control mostró, a las 6 semanas, los orificios rellenos de pasta en su interior en la mayoría de los meniscos. En la mayoría de los casos

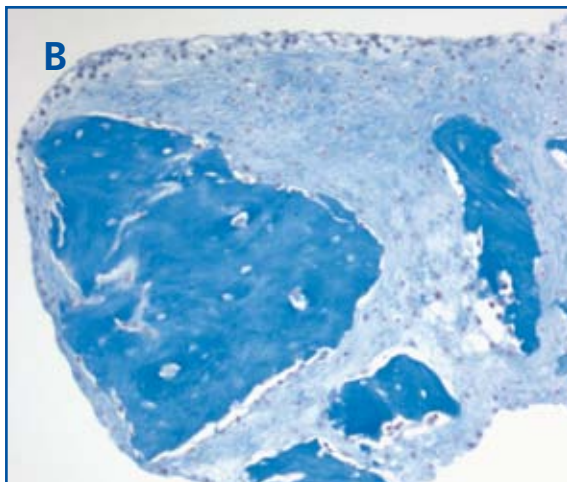
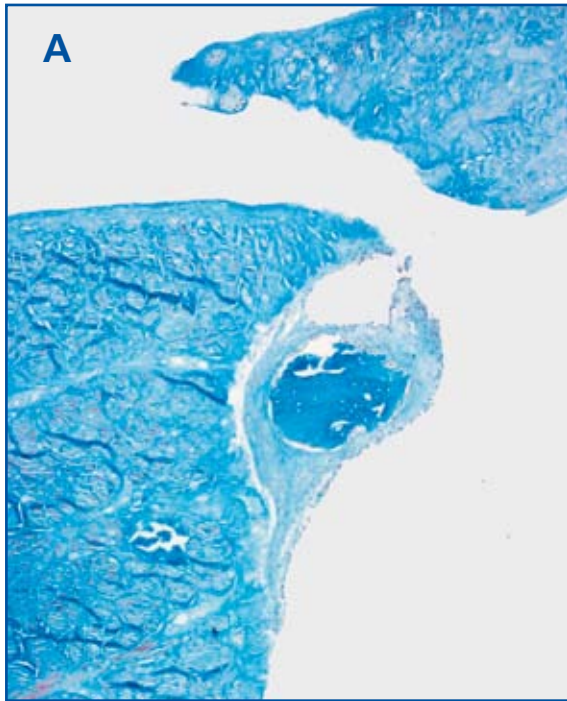


Figura 3. Fragmento suelto de pasta de celulosa con OP-1® e infiltrado celular. **A:** borde de la lesión con grupos isogénicos de condrocitos y un fragmento de pasta de celulosa rodeado por tejido fibroso e infiltrado celular (tricrómico de Masson, $\times 4$); **B:** (tricrómico de Masson, $\times 10$).

tratados con OP-1®, a diferencia del grupo control (**Figura 1**), se observó un buen relleno de la cavidad con la pasta con OP-1® y, además, se visualizó un importante infiltrado celular (**Figura 2**). En un caso tratado con OP-1® se observó la pérdida del contenido del orificio, quedando trozos de pasta sueltos con inducción de células y matriz a su alrededor (**Figura 3**).

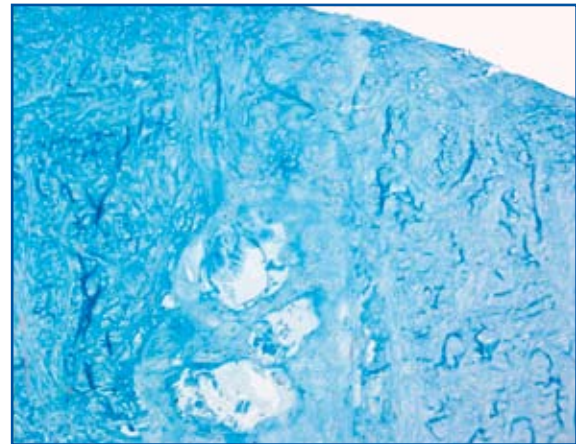


Figura 4. Grupo OP-1®, 12 semanas de evolución. Relleno del orificio con tejido fibroso e infiltrado celular y cavidades (tricrómico de Masson, $\times 4$). No se observan restos de la pasta de celulosa (Putty®).

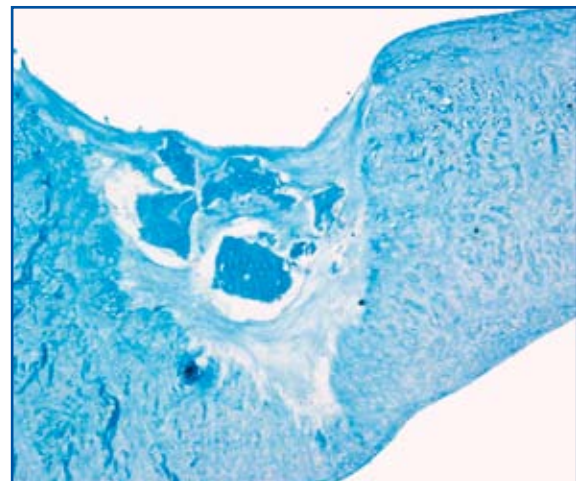


Figura 5. Grupo Op-1®, 12 semanas. Relleno del orificio con restos de pasta de celulosa (Putty®) rodeado de tejido fibroso (tricrómico de Masson, $\times 4$).

A las 12 semanas, en el grupo control las células de la superficie meniscal penetraron en el interior del orificio sin relleno completamente. Se apreció, en ocasiones, tejido fibroso acelular que unía ambos bordes. Por el contrario, en el grupo tratado con OP-1®, en algunos animales, ya no se visualizó la pasta (**Figura 4**) en su interior, dejando un orificio relleno de tejido fibroso consistente y celular o, en otros casos (**Figura 5**), trozos de pasta con importante infiltrado celular y de matriz extracelular.

Los orificios, aunque constituyen un modelo estable, sufren deformaciones durante la evo-

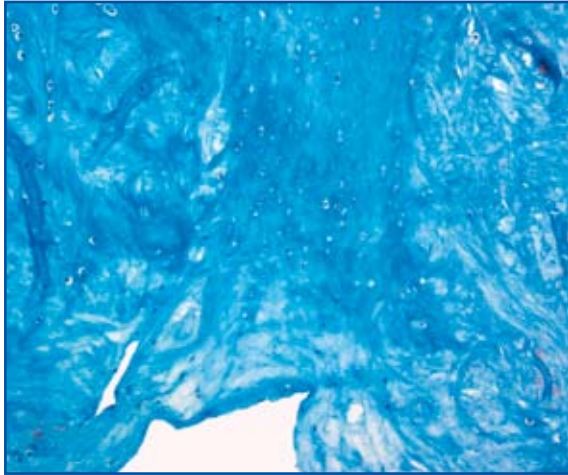


Figura 6. Grupo OP-1®, 25 semanas de evolución. Relleno del orificio con tejido fibroso celular (tricrómico de Masson, $\times 10$).



Figura 7. Grupo OP-1®, 25 semanas de evolución. Relleno parcial del orificio con tejido fibroso laxo celular (tricrómico de Masson, $\times 4$).

lución perdiendo en algunos casos su contenido y rompiéndose en otros, especialmente con los animales de mayor evolución de tiempo. A las 25 semanas en el grupo control había células superficiales del menisco que penetraron en el orificio uniendo los bordes del mismo con tejido fibroso de relleno de poca calidad. Por el contrario, los orificios rellenos de OP-1® mostraron en tres casos un relleno completo con tejido fibroso denso y células en su interior (Figura 6) muy semejante al tejido meniscal, aunque en otros casos el tejido fue de menor calidad (Figura 7).

La pasta de celulosa (Putty®) permaneció las primeras 6 semanas y, posteriormente, se reabsorbió hasta desaparecer en los grupos de mayor evolución. En los grupos rellenos con OP-1® se visualizó una importante penetración celular desde la superficie meniscal hasta el interior de los orificios aumentando el tejido fibroso, a partir de las 12 semanas.

DISCUSIÓN

Webber *et al.*⁽⁷⁻¹⁰⁾ colmaron de optimismo la cirugía meniscal al demostrar, en cultivos celulares, que los fibrocondrocitos proliferan y sintetizan matriz sin aporte sanguíneo, siempre que se encuentren en el medio adecuado. Para estos autores el coágulo de fibrina posee las características necesarias para guiar la respuesta meniscal intrínseca, sirviendo como andamio y

aportando los factores de crecimiento que ayudan a la respuesta celular. Resultados semejantes fueron confirmados por otros autores⁽¹¹⁻¹³⁾. El problema de la aplicación del coágulo de fibrina reside en su deficiente capacidad adhesiva y en que no puede estimular la reparación si no permanece fijo y en situación estable.

Cuando se produce un proceso reparador en el menisco, las células que aparecen durante las primeras 6 semanas son de estirpe fibroblástica. El origen celular es doble, a partir de los propios fibrocondrocitos meniscales⁽⁷⁻¹⁰⁾ y de las células sinoviales, que penetran desde una invaginación de la superficie meniscal, superior e inferior, y por células fibroblásticas que acceden a través de los pocos canales que crea la sutura. Las fibras colagénicas formadas son escasas y desorganizadas.

La sinovial y la unión menisco-capsular son, por otro lado, una porción rica en células mesenquimales capaces de migrar y rellenar, si se dan las condiciones oportunas, las roturas meniscales y, como señalan Kobayashi *et al.*⁽¹⁴⁾, muy adecuadas para realizar trasplante celular en zonas avasculares del menisco.

También la aplicación directa de proteínas humanas recombinantes puede estimular la reparación meniscal, pero su aplicación está limitada por su corta vida biológica y la necesidad de repetir las altas dosis del factor de crecimiento. Spindler *et al.*⁽¹⁵⁾ probaron que las células meniscales de la zona avascular no responden al PDGF, mientras que Tumia y Johnstone⁽¹⁶⁾ observaron

que el IGF-1 es capaz de estimular la actividad de los fibrocondrocitos en la zona avascular.

Los primeros trabajos clínicos efectuados con factores osteoinductivos (BMP-2 y BMP-7) han demostrado variabilidad en sus resultados que puede ser debido a la presencia de células con receptores adecuados y al momento en el que se coloca el factor de crecimiento y el *carrier* con el que se incorpora⁽¹⁷⁾.

La BMP-7 (OP-1[®]) tiene una función clara en la regulación de la matriz, pudiendo inhibir ciertos procesos degradativos⁽¹⁸⁾ con un efecto sobre el metabolismo de los condrocitos estimulando su síntesis, organizando y reteniendo las moléculas de la matriz⁽¹⁹⁾.

Sin embargo, según Chen *et al.*⁽²⁰⁾, el RNAm de la BMP-7 y 8 y del BMP-IB se expresa en el cartílago fetal pero no en el adulto; el RNAm de la BMP-3 se expresa en el cartílago fetal y en adulto pero no en el artrósico; y el TGF- β 1 se expresa en los cartílagos adulto y artrósico pero no en el fetal. Por el contrario, las BMP-1, 2, 4, 6, y 11 se expresan de forma similar tanto en los cartílagos fetales y adultos, tanto normal como artrósico. La BMP-9 y 10 no se expresaron en ningún grupo.

Nos parece que la utilización de sustancias inductoras celulares constituye el campo de mayor interés en la reparación del tejido meniscal. Siguiendo los resultados de Hidaka *et al.*⁽²¹⁾, probamos una proteína osteoinductora como es la BMP-7 (OP-1[®]) mezclada con un transportador de pasta de celulosa. La confirmación de reparación y curación de una lesión meniscal requiere la presencia de células viables, proliferación celular y producción de una matriz⁽⁵⁾, mientras que las zonas con baja celularidad son incompatibles con un proceso reparador.

Los factores de crecimiento y el aporte celular tienen un efecto directo sobre la reparación meniscal, y para reparar cualquier lesión meniscal es necesario el relleno de la misma con un material adecuado que permita la migración, el anclaje, la proliferación y la diferenciación de las células que intervienen en el proceso, como han demostrado Kambic *et al.*⁽²²⁾.

Aunque se precisan nuevos estudios, la proteína morfogénica BMP-7 (OP-1[®]) puede ser un material adecuado para ser implantado artroscópicamente y de forma directa en la articulación de la rodilla, para la reparación meniscal y del cartílago.

BIBLIOGRAFÍA

- Bhattacharyya T, Gale D, Dewire P, Totterman S, Gale E, McLaughlin S *et al.* The clinical importance of meniscal tears demonstrated by magnetic resonance imaging in osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg (Am)* 2003; 85-A: 4-9.
- Wright VJ, Fu FH. Management of meniscal injuries. *Current Opinion Orthopaedics* 2005; 16: 100-6.
- Nishida M, Higuchi H, Kobayashi Y, Takagishi K. Histological and biochemical changes of experimental meniscus tear in the dog knee. *J Orthop Sci* 2005; 10: 406-13.
- Guisasola I, Vaquero J, Forriol F. Knee immobilization on meniscal healing after suture: an experimental study in sheep. *Clin Orthop* 2002; 395: 227-33.
- Pollo FE, Jackson RW, Kane RR, Chang HM, Zhang J, Dieterichs CP, Riedel S. Sutureless avascular meniscal repair with a photoactive naphthalimide compound: a preliminary animal study. *Athroskopie* 2004; 20: 824-30.
- Seeherman H, Wozney J, Li R. Bone morphogenetic protein delivery systems. *Spine* 2002; 27 (Suppl): 16-23.
- Webber R, York J, Vanderschil-den J, Hough A. An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. *Am J Sports Med* 1989; 17: 393-400.
- Webber R, Zitaglio T, Hough A. Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response. *J Orthop Res* 1988; 6: 13-23.
- Webber RJ, Harris M, Hough AJ. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferation and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res* 1985; 3: 36-42.
- Webber RJ. In vitro culture of rabbit meniscal tissue. *Clin Orthop* 1990; 252: 114-20.
- Arnoczky S, Warren R, Spivak J. Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. *J Bone Joint Surg (Am)* 1988; 70-A: 1209-17.

- 12 McDevitt C, Mukherjee S, Kambic H, Parker R. Emerging concepts of the cell biology of the meniscus. *Current Opinion Orthop* 2002; 13: 345-50.
- 13 Van Trommel M, Simonian P, Potter H. Arthroscopic meniscal repair with fibrin clot of complete radial tears of the lateral meniscus in the avascular zone. *Arthroscopy* 1998; 14: 360-5.
- 14 Kobayashi K, Fujimoto E, Deie M, Sumen Y, Ikuta Y, Ochi M. Regional differences in the healing potential of the meniscus – an organ culture model to eliminate the influence of microvasculature and the synovium. *Knee* 2004; 11: 271-8.
- 15 Spindler KP, Mayes CE, Miller RR, Imro AK, Davidson JM. Regional mitogenic response of the meniscus to platelet-derived growth factor (PDGF-AB). *J Orthop Res* 1995; 13:201-7.
- 16 Tumia NS, Johnstone AJ. Regional regenerative potential of meniscal cartilage exposed to recombinant insulin-like growth factor-I in vitro. *J Bone Joint Surg (Br)* 2004; 86-B: 1077-81.
- 17 Termaat MF, den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJTM. Bone morphogenetic proteins. *J Bone Joint Surg (Am)* 2005; 87-A: 1367-78.
- 18 Merrihew Ch, Soeder S, Rueger DC, Kuettner KE, Chubinskaya S. Modulation of endogenous osteogenic protein-1 (OP-1®) by interleukin-1 in adult human articular cartilage. *J Bone Joint Surg (Am)* 2003; 85-A (Suppl 3): 67-74.
- 19 Chubinskaya S, Kuettner KE. Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 1323-40.
- 20 Chen AL, Fang C, Liu C, Leslie MP, Chang E, Di Cesare PE. Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage. *J Orthop Res* 2004; 22: 1188-92.
- 21 Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Cristal RG, Nixon AJ. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 2003; 21: 573-83.
- 22 Kambic HE, Futani H, McDevitt CA. Cell matrix changes and alpha-smooth muscle actin expression in repair of the canine meniscus. *Wound Repair Regen* 2000; 8: 554-61.