

Estudio piloto para la reconstrucción del ligamento cruzado anterior (LCA) con cultivos de fibroblastos autólogos sobre membranas de colágeno I/III

Pilot study on the anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction with autologous fibroblasts culture on collagen I/III membranes

López-Alcorocho Sánchez JM, Guillén García P, Rodríguez Íñigo E, Guillén Vicente I, Caballero Santos R, Guillén Vicente M, García Gómez F, Cuevas Sánchez P

Unidad de Investigación. Clínica CEMTRO, Madrid, España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Utilizar cultivos de fibroblastos sobre membranas de colágeno I/III para tratar la rotura del ligamento cruzado anterior (LCA).

Pacientes y métodos: Estudio prospectivo con 100 biopsias de LCA de pacientes con rotura de LCA con las que se realizaron cultivos primarios de fibroblastos. Tras alcanzar 20-30 millones, se transfirieron a membranas de colágeno I/III, donde se determinó su disposición mediante tinción con hematoxilina-eosina y la expresión de los genes colágeno de tipo I (Col-I), colágeno de tipo III (Col-III), tenascina-C y Sox-9 mediante PCR en tiempo real.

Resultados: A los 30 días de cultivo existía una correlación negativa entre la edad de los pacientes y la velocidad de crecimiento de los fibroblastos ($p=0,003$). La histología reveló que las células se disponían entre la malla formada por las fibras de las membranas, expresando Col-I, Col-III, Sox-9 y tenascina-C, características del ligamento.

Conclusión: Es posible el establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos derivados de LCA tanto *in vitro* como sobre membranas de colágeno I/III sin que pierdan sus características primarias de células de ligamento.

Palabras clave:

Ligamento cruzado anterior, fibroblastos, tenocitos.

Abstract

Objective: To study the possibility on the use of the *in vitro* cultured on I/III collagen membranes for the treatment of the broken anterior cruciate ligament (ACL).

Patients and methodology: Prospective study performed with 100 ACL biopsies from patients with broken ACL, in which primary cultures of fibroblasts were established. When a number of 20-30 million was reached, they were transferred to I/III collagen membranes, where the architecture of the cells was examined by hematoxylin-eosin stained and the expression of the collagen type I (Col-I), collagen type III (Col-III), tenascin-C and Sox-9 genes by real time PCR.

Results: A negative correlation between the age of the patients and the growth rate of the fibroblasts after 30 days of setting-up the culture ($p=0.003$) was observed. The histology revealed that the cells were disposed within the membrane fibers net, where the cells expressed the characteristic proteins of the ligament: Col-I, Col-III, Sox-9 and tenascin-C.

Conclusion: It is possible to establish the primary culture of the ACL-derived fibroblasts, both *in vitro* and onto collagen I/III porcine membranes without losing their primary features of the ligament cells.

Key words:

Anterior cruciate ligament, fibroblasts, tenocytes.

Correspondencia

JM López-Alcorocho Sánchez
Unidad de Investigación-Clinica CEMTRO.
Avda. Ventisquero de la Condesa, 42. 28035 Madrid, España.
e-mail: jm.lopez@amplifel.com

Introducción

La rotura del ligamento cruzado anterior (LCA) es una de las lesiones más frecuentes. La situación se complica aún más cuando además de la rotura del LCA existen lesiones asociadas en otras estructuras de la rodilla. Entre ellas se encuentran las lesiones meniscales, las condrales o las capsuloligamentarias [1].

En las personas que practican deporte de modo regular pero no profesional, la rotura de LCA y el cuadro de lesiones asociadas suponen una gran merma en su calidad de vida, pero es en el deportista profesional donde estas lesiones cobran una importancia clave. La razón fundamental estriba en el largo tiempo de recuperación, que puede oscilar desde seis hasta ocho meses [2]. Una de las primeras alternativas que se propusieron para el tratamiento fue la reparación del LCA roto, pero pronto se vio que ésta conducía inexorablemente al fracaso. En cambio, la reconstrucción busca evitar los episodios de inestabilidad [3] y el deterioro de la articulación, que pueden dar lugar a lesiones en el menisco y en el cartílago [4] y a cambios artrósicos precoces de difícil solución.

La práctica terapéutica habitual para el tratamiento de la rotura del LCA implica la utilización de una técnica quirúrgica invasiva, en la que se sustituye el LCA roto por otras estructuras biológicas autólogas anclados a la tibia y fémur, mediante una perforación, utilizando una estructura biológica, un tendón para suplir otra y un ligamento. Aunque ambas estructuras son muy semejantes en cuanto a su composición estructural y celular, no dejan de tener propiedades físicas y mecánicas diferentes, pues su función también lo es [1]. Por ello, la estructura tendinosa implantada asume el papel de ligamento, que requiere un periodo de integración que repercute directamente en el tiempo de recuperación del paciente [5].

Este estudio pretende demostrar el aislamiento y cultivo de células de LCA sobre membranas de colágeno I/III sin que éstas pierdan sus caracteres con vistas al futuro desarrollo de un método para la reconstrucción del LCA mediante el trasplante autólogo de fibroblastos cultivados.

Material y métodos

En el presente estudio se incluyeron biopsias de LCA de 100 pacientes (67 hombres y 33 mujeres) con un promedio de edad 35 (SD: 17) años; 78 de ellos tenían rotura de LCA, mientras que los otros 22 presentaban otra patología de rodilla que requirió intervención quirúrgica, momento en el que se tomó la biopsia de LCA. En todos los casos el proceso de selección de los pacientes fue aleatorio. Los pacientes que aceptaron participar en el estudio mostraron su conformidad firmando el consentimiento informado correspondiente.

Atendiendo al tiempo transcurrido entre el momento de producirse la lesión y la cirugía subsiguiente, las lesiones se dividieron en lesión aguda, cuando había transcurrido menos de un mes entre la lesión y la cirugía (49 casos), y lesión crónica, si el tiempo entre ambos eventos era superior al mes (29 casos).

Aislamiento de las células y establecimiento de los cultivos primarios

El primer paso del proceso consistió en trocear las muestras de LCA con una hoja de bisturí estéril y digerirlas durante toda la noche a 37° C con agitación, con varias concentraciones de colagenasa (Roche España, Madrid, España) 0,5 mg/ml, 1 mg/ml y 2 mg/ml. La mezcla de digestión se pasó a través de un filtro de nylon de 70 µm (Beckton Dickinson, San Agustín de Guadalix, España) y, tras centrifugar a 3.000 rpm, el precipitado se resuspendió en medio de cultivo DMEM (Lonza, Velviers, Bélgica) con 10% de FBS (de las siglas en inglés de suero fetal bovino) (Lonza).

El número de células viables se estimó mediante el método de exclusión del azul tripán, en cámara de Neubauer, en el que las células muertas aparecen teñidas de color azul. Las células se sembraron en frascos de cultivos que se mantuvieron a 37° C, con una humedad del 95% y una presión de CO₂ del 5%.

Los cultivos se revisaron diariamente, comprobando el aspecto macroscópico de la monocapa de células y cambiando el medio cada 3-4 días. Una vez que el cultivo estaba a un 80% de confluencia, las células se despegaron del frasco del cultivo con una solución de tripsina-EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y después de estimar el número de células mediante el método de exclusión del azul-tripán, se subcultivaron en varios frascos de cultivo. Este proceso se repitió otra vez más hasta alcanzar un número final de 20 millones.

Aplicación de las células sobre las membranas de colágeno

Los fibroblastos en cultivo se aplicaron para la restauración del LCA roto inmersos en membranas de colágeno I/III de origen porcino (Chondro Gide®, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza). Se comprobó si las células se mantenían en dichas membranas una vez cultivadas. También se estudió la densidad máxima de células que admitían las membranas. Para ello los cultivos celulares se aplicaron a densidades de 1 millón, 3 millones, 5 millones, 8 millones y 10 millones de células en 1 cm² de membrana. Tras esperar 15 minutos, las membranas con las distintas densidades celulares se incubaron una hora en tampón fosfato salino (PBS). Tras la incubación, se recogió el PBS correspondiente a cada densidad celu-

lar y se contaron las células presentes. La diferencia, expresada en porcentaje entre las células sembradas y las presentes en el PBS, proporcionó una estimación de la densidad de células que era capaz de soportar la membrana hasta alcanzar el punto de saturación de la misma.

Estudio molecular por PCR en tiempo real

El RNA total de las células en cultivo o sembradas en las membranas de colágeno I/III se aisló utilizando el reactivo TriZol (Invitrogen, Life Technologies, Alcobendas, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez resuspendido en agua estéril libre de RNA-sas, se cuantificó mediante el sistema Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Alcobendas, España) y se transcribió a DNA copia (cDNA) utilizando la enzima transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) (Promega Biotech Ibérica SL, Madrid, España). Se estudió la expresión de los genes del colágeno de tipo I (Col-I), colágeno de tipo III (Col-III), Sox-9 y tenascina-C por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real utilizando sondas UPL (*Universal Probe Library*) (Roche) en comparación con la expresión del gen constitutivo gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH).

Estudio histológico de las células en las membranas de colágeno I/III

La disposición de los fibroblastos en la membrana se estudió mediante tinción con hematoxilina-eosina.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 9.0 para Windows. Las variables continuas se expresaron como la media \pm la desviación típica (SD) o como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Las variables categóricas se expresaron mediante porcentajes. El coeficiente de correlación R^2 se estimó mediante el test de Spearman. Una vez comprobada la normalidad de las variables mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, las medias se compararon mediante la prueba t de Student (comparación de dos medias) o por medio del análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para comparar más de dos medias. En este último caso, las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test de Tukey. En todas las estimaciones y comparaciones realizadas un valor de probabilidad $p < 0,050$ (bilateral) se consideró estadísticamente significativo.

I Resultados

El número de células medio mínimo para que prospere el cultivo de fibroblastos fue de 21.442 ± 2.787 (media \pm SD);

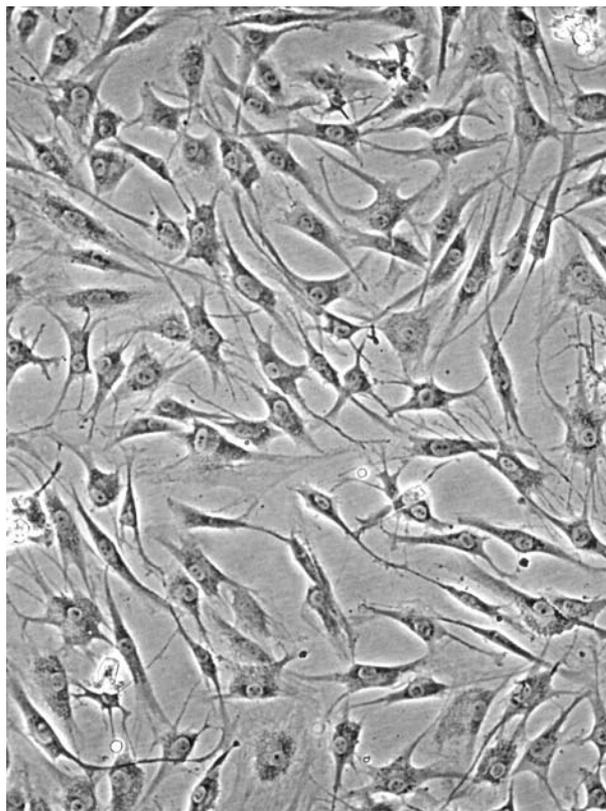


Fig. 1. Cultivo de fibroblastos en monocapa (x100).

es decir, se necesitó que la biopsia de LCA fuese lo suficientemente grande para rendir al menos ese número de células y que se pueda establecer el cultivo primario (Figura 1).

Después de que las células del cultivo primario alcanzaron un 80% de confluencia, se despegaron del frasco de cultivo mediante tratamiento con tripsina. Establecimos que dos subcultivos eran suficientes para alcanzar el número de células óptimo, que fijamos en 20 millones.

También estudiamos la relación entre la edad de los pacientes y la tasa de multiplicación celular en el primer pase (15 días desde el inicio del cultivo) y en el segundo (30 días desde el inicio del cultivo), determinadas como el índice del número de células al concluir el primer o el segundo pase respecto al número de células iniciales. Se comprobó que sólo existía una correlación negativa estadísticamente significativa entre la edad de los pacientes y la tasa de multiplicación celular en el segundo pase ($p=0,003$) (Figura 2). Con respecto al primer pase, aunque existía una tendencia de proporcionalidad inversa entre la tasa de multiplicación celular y la edad de los pacientes, no fue significativa ($p=0,091$).

Por último, se compararon las medias del número de células en el primer y segundo pase aisladas de las biopsias de los pacientes con rotura aguda o crónica de LCA frente a las

biopsias de LCA normal (Figura 3). En ambos pases pudimos comprobar que el número de células era siempre estadísticamente mayor en las biopsias aisladas de roturas de LCA agudas que en las de LCA normal. Otro dato significativo fue que en el caso de las biopsias de roturas de LCA crónicas el número de células en ambos pases era menor que en los otros dos grupos.

La tabla 1 recoge el porcentaje de células que permanecieron en la membrana tras aplicar una densidad de 1 millón, 3 millones, 5 millones, 8 millones y 10 millones de células en 1 cm² de membrana. Comprobamos que con densidades desde 1 hasta 5 millones de fibroblastos por cm², en la membrana permanecían el 100% de las células sembradas. Se estableció una

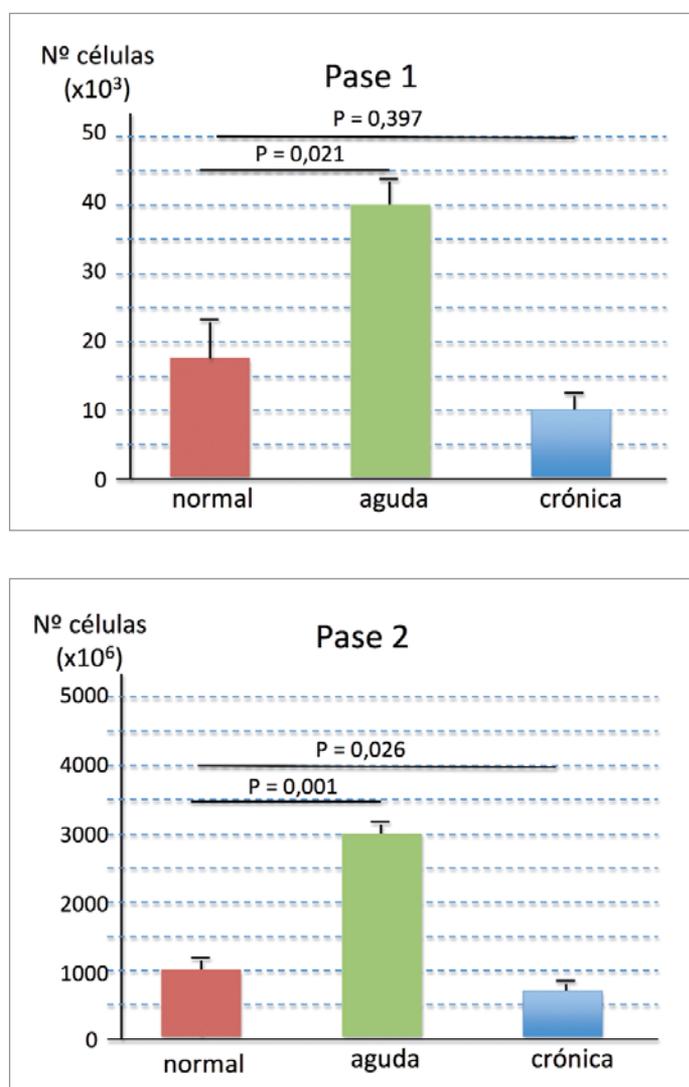


Fig. 2. Comparación del número de células en el a) primer y b) segundo pase, entre las biopsias tomadas de los pacientes con rotura aguda o crónica de LCA con respecto a los cultivos de células aisladas de LCA normal.

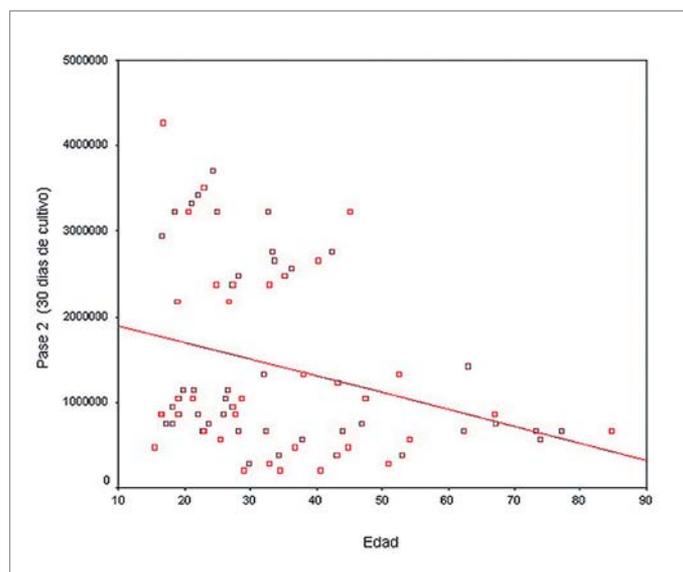


Fig. 3. Correlación negativa entre la tasa de división de los fibroblastos en cultivo en el segundo pase y la edad de los pacientes ($R^2=-0,333$; $p=0,003$; test de Spearman).

densidad de 5 millones de células por cm² como el punto de saturación, puesto que a partir de esta cantidad el número de células en la membrana disminuía hasta llegar a ser del 55% en las membranas sembradas con 10 millones de células.

Se realizó un estudio de la expresión relativa de los genes Col-I, Col-III, Sox-9 y tenascina-C en relación a la expresión del gen constitutivo GADPH, comparando las células en cultivo con las células en las membranas de colágeno I/III (Tabla 2). La expresión relativa de los cuatro genes fue similar en ambos casos ($p>0,050$).

Cuando las membranas de colágeno I/III sembradas con los fibroblastos cultivados se tiñeron con hematoxilina-eosina se comprobó que éstos se disponían entre la red que forman las fibras de colágeno de la membrana (Figura 4). A un mayor aumento se observó que las células se disponían en la

Tabla 1. Porcentaje de células que permanecen en la membrana de colágeno I/III después de haber sembrado distintas cantidades de fibroblastos por cm².

Densidad celular (células/cm ²)	% células en la membrana
1 millón	100%
3 millones	100%
5 millones	100%
8 millones	95%-98%
10 millones	55%-70%

Tabla 2. Promedio de expresión de los genes en los fibroblastos en cultivo en monocapa y en las membranas de colágeno I/III

	Colágeno I	Colágeno III	Sox-9	Tenascina-C
Cultivo	1,41 ± 0,67	132,47 ± 39,84	0,81 ± 0,36	6,66 ± 1,04
Membrana	1,64 ± 0,62	94,71 ± 42,16	0,33 ± 0,41	7,21 ± 0,16

membrana de colágeno formando grupos entre las fibras de la malla que forma la proteína (Figura 5).

I Discusión

La rotura del LCA representa uno de los mayores problemas de la traumatología y encontrar una solución al mismo es un gran reto en cuya solución no solo participan los profesionales de la medicina, conocedores en profundidad de lo que supone dicho problema, sino que se convierte en una tarea multidisciplinar en la que deben participar también biólogos, químicos, informáticos e incluso ingenieros. La conjunción de todos estos profesionales permitirá conocer con mayor detalle la estructura, composición y comportamiento biomecánico del ligamento para poder de este modo idear la mejor solución al problema [1][6].

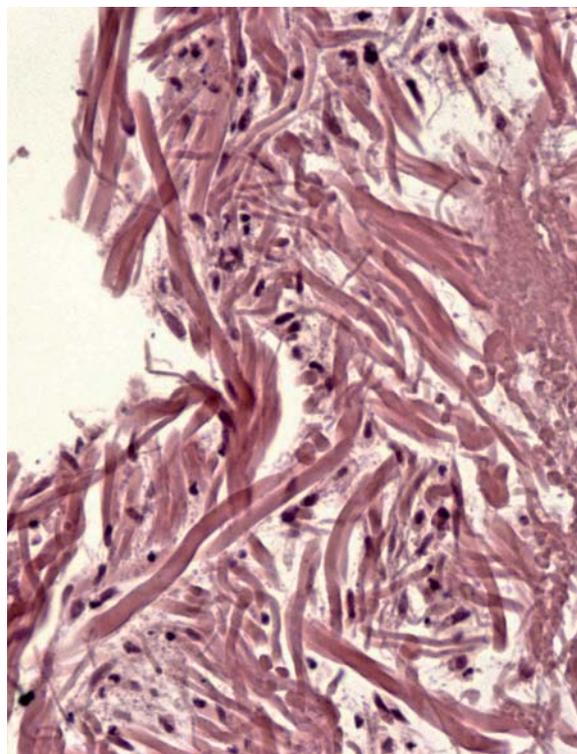


Fig. 4. Tinción con hematoxilina-eosina de fibroblastos embebidos en una membrana de colágeno I/III de origen porcino (x40).

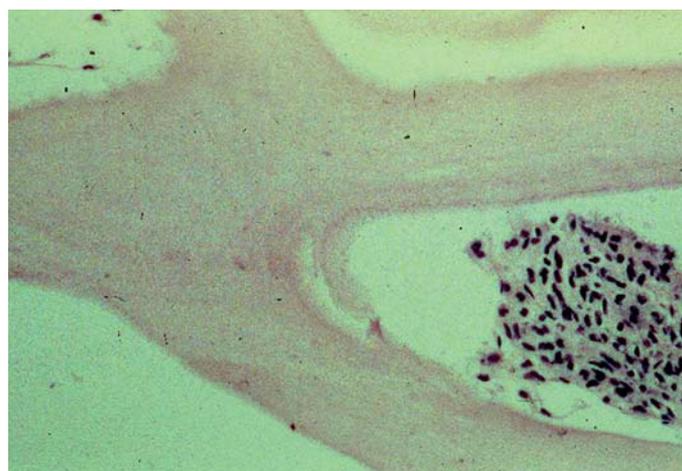


Fig. 5. Tinción con hematoxilina-eosina de fibroblastos embebidos en una membrana de colágeno I/III de origen porcino donde se observan las células agrupadas entre las fibras (x64).

En el presente estudio hemos aunado los conocimientos de varias disciplinas para comprobar si se puede utilizar la ingeniería tisular para el tratamiento de la rotura del LCA. En nuestro caso se ha ensayado si para el tratamiento es posible usar la combinación de las células propias del LCA, los fibroblastos, junto con un biomaterial, la membrana de colágeno I/III de origen porcino, que se viene utilizando con notable éxito desde hace algún tiempo para el tratamiento de las lesiones del cartílago articular.

Nuestros resultados demuestran que, al igual que para otros tipos celulares como por ejemplo los condrocitos, es posible aislar y cultivar *in vitro* los fibroblastos aislados de LCA con rotura aguda o crónica o de LCA normal, empleando técnicas estándar de cultivos de células humanas [7-9]. Un resultado notable del presente estudio es que existe una correlación negativa entre la tasa de crecimiento de las células en cultivo y la edad de los pacientes. Este hecho puede deberse a que en los pacientes más jóvenes, donde todavía pueden existir estructuras biológicas en crecimiento, podrían encontrarse activados genes promotores de la división celular que en cambio estarían suprimidos en pacientes de mayor edad. Esto desencadenaría una respuesta más rápida de división celular cuanto menor fuera la edad del paciente. Recien-

temente, Klatte-Schulz *et al.* [10] han obtenido unos resultados similares, demostrando que la edad de los pacientes puede influir en los cultivos en dos o tres dimensiones de células aisladas del tendón del músculo supraespinoso. Estos autores postulan que las células de los pacientes más jóvenes se pueden beneficiar más que las de los pacientes mayores al ser tratadas con los factores morfogenéticos óseos dos o siete (BMP-2 o BMP-7), lo cual indicaría una mayor actividad celular en los pacientes más jóvenes.

En el presente trabajo hemos comprobado que la tasa de división celular es mayor en las células aisladas de los pacientes con rotura aguda de LCA con respecto a las aisladas de los pacientes con LCA normal y mucho mayor que las aisladas de los pacientes con rotura crónica. El hecho de que en las roturas de LCA agudas las células se multipliquen más rápidamente que en el LCA normal, y sobre todo que en las roturas crónicas, podría ser explicado porque en un primer momento, ante la rotura de la estructura ligamentosa, el organismo reaccionaría secretando diferentes citoquinas proinflamatorias que actuarían promoviendo la síntesis de diversos factores de crecimiento y de diferenciación celular [11]. Estos factores se unirían a las células de la estructura lesionada a través de receptores de membrana específicos y actuarían en el núcleo de las células promoviendo, por un lado, la división celular y, por otro, la síntesis de matriz extracelular, con el fin de mantener la integridad de la estructura biológica.

En nuestros experimentos de cultivo de las células en las membranas de colágeno I/III de origen porcino hemos demostrado que éstas son capaces de soportar sin saturarse hasta 5 millones de fibroblastos por cm². Además, estas células se disponen en grupos en la membrana y en principio mantienen el mismo fenotipo que los fibroblastos, expresando Col-I, Col-III, Sox-9 y tenascina-C.

En conclusión, la combinación de fibroblastos obtenidos de biopsias de LCA junto con las membranas de colágeno I/III de origen porcino se podrían emplear para el tratamiento de la rotura de LCA. Sin embargo, este es sólo un comienzo, pues primero habría que realizar ensayos en animales pequeños, como podrían ser roedores, para después pasar a un modelo animal mayor, como perros u ovejas, antes de pasar a la realización de ensayos clínicos en humanos. No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la idea del empleo de la terapia celular para el tratamiento de este tipo de lesiones, siendo un primer paso para el desarrollo de un modelo de tratamiento que suponga, en primer lugar, el empleo de una cirugía lo menos invasiva posible y, en segundo lugar, un acortamiento en el tiempo de recuperación, que por tanto impliquen una mejora en la calidad de vida del paciente. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jiménez Collado J, Guillén García P, Sobrado Pérez J. Rodilla: morfogénesis, anatomía clínica y vías de acceso. Madrid: Ed. MAPFRE 1994; 161-70.
2. Shirakura K, Terauchi M, Kizuki S, Moro S, Kimura M. The natural history of untreated anterior cruciate tears in recreational athletes. *Clin Orthop Rel Res* 1995; 317:227-36.
3. Neumann RD. Anterior cruciate ligament injuries. En: Brown DE, Neumann RD (eds). *Orthopedic Secrets*. St. Louis: Mosby, 1994; 264-9.
4. Apley G, Solomon L. The Knee. En: Apley G, Solomon L (eds.). *Apley's system of orthopaedics and fractures*. 7^a ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1993; 432-70.
5. Ardern CL, Webster KE, Taylor NF, Feller JA. Return to sport following anterior cruciate ligament reconstruction surgery: a systematic review and meta-analysis of the state of play. *Br J Sports Med* 2011; 45:596-606.
6. Platzer W. Huesos, ligamentos, articulaciones. En: Kahle W, Leonhardt H, Platzer W (eds.). *Atlas de Anatomía*. Barcelona: Ediciones Omega SA, 1977; 196-203.
7. Guillén García P. Defectos condrales: tratamiento con implante de condrocitos (ICA) cultivados. Madrid: Ed. MAPFRE 1996.
8. Guillén García P. Injerto de meniscos y condrocitos autólogos. *Revista Argentina AAOT*, 2000.
9. Gigante A, Bevilacqua C, Rivenuto A, Mattioli-Belmonte M, Greco F. Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007; 15:88-92.
10. Klatte-Schulz F, Pauly S, Scheibel M, Gerhardt C, Schmidmaier G, Wildemann B. Influence of age on the cell biological characteristics and the stimulation potential of male human tenocyte-like cells. *Eur Cell Mater* 2012; 24:74-89.
11. Bigoni M, Sacerdote P, Turati M, Franchi S, Gandolla M, Gaddi D, *et al.* Acute and late changes in intraarticular cytokine levels following anterior cruciate ligament injury. *J Orthop Res* 2013; 31:315-21.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.