

ORIGINAL

Efecto del almacenamiento de menisco a 4°C sobre la morfología y la capacidad de respuesta celular a los factores TGF- β 1, IGF-1, aFGF, bFGF y BMP-7 en cultivo en monocapa

Effect of meniscus storage at 4°C upon cell morphology and capacity to respond to growth factors TGF- β 1, IGF-1, aFGF, bFGF and BMP-7 in monolayer culture

Íñigo Izal ¹, Raúl Esparza ², Purificación Ripalda ¹, Francisco Forriol ²

¹ Laboratorio de Ortopedia Experimental, Universidad de Navarra, Pamplona. ² Hospital FREMAP, Majadahonda, Madrid

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo del trabajo: Estudiar la viabilidad del almacenamiento de menisco a 4°C.

Material y método: Se obtuvieron fragmentos de menisco procedentes de corderos sanos en condiciones de esterilidad. Como control, se utilizaron fragmentos de tejido digeridos inmediatamente después de la extracción del menisco, el resto se almacenaron a 4°C sumergidos en medio de cultivo durante 15 y 30 días. Tras el almacenamiento, se realizó la digestión del material utilizando tripsina, colagenasa y dispasa y se cultivaron las células en monocapa. Se estudió la morfología celular al microscopio óptico y la respuesta a los factores de crecimiento TGF- β 1, IGF-1, aFGF, bFGF y BMP-7 mediante ensayos de proliferación.

Resultados: La respuesta celular a bFGF e IGF-1 se incrementó tras los 15 días de tratamiento, para volver a descender tras los 30 días. La capacidad de respuesta tras el tratamiento con BMP-7 descendió a los 15 días y volvió a ser similar al control a los 30 días. Los factores aFGF y TGF- β no modificaron la respuesta que se produjo en las células.

Conclusiones: Tras el almacenamiento a 4°C las células sufren cambios morfológicos y bioquímicos que las lleva a modificar su sensibilidad a algunos factores de crecimiento.

Palabras clave:

Aloinjertos meniscales, criopreservación, factores de crecimiento.

Abstract

Aim: To evaluate the viability of meniscus storage at 4°C.

Material and method: Meniscus fragments were obtained from healthy goats under sterile conditions.

As control, use was made of tissue fragments digested immediately after meniscus harvesting; the rest were stored immersed at 4°C in culture medium for 15 and 30 days. Following storage, the material was digested using trypsin, collagenase and dispase, with monolayer culture of the cells. Cell morphology was evaluated under the light microscope, and cell response to growth factors TGF- β 1, IGF-1, aFGF, bFGF and BMP-7 was assessed by proliferation tests.

Results: The cell response to bFGF and IGF-1 increased after 15 days of treatment, followed by a decrease after 30 days. The response capacity after BMP-7 treatment decreased after 15 days and returned to control levels after 30 days. Factors aFGF and TGF- β did not modify cell response.

Conclusions: Following storage at 4°C, the cells undergo morphological and biochemical changes that modify their sensitivity to certain growth factors.

Key words:

Meniscal allografts, cryopreservation, growth factors.

Correspondencia

I. Izal Azcárate
Laboratorio de Ortopedia Experimental
Universidad de Navarra. Irunlarrea, 1. 31080, Pamplona
inizal@unav.es

I Introducción

El tratamiento de lesiones en el menisco sigue siendo un problema para el que no existe una solución eficaz en la clínica. En ocasiones, cuando las lesiones se producen en la zona más periférica, vascular, se consiguen buenos resultados, cosa que no ocurre en la porción avascular del menisco que requiere tratamientos agresivos [1,2], como son la resección o el trasplante meniscal.

La criopreservación afecta la viabilidad celular; se han estudiado diferentes técnicas para mejorar las condiciones de conservación tisular, especialmente para el cartilago [3-9], sin conseguir los efectos deseados. Sin embargo, en el menisco, a pesar de que se han desarrollado nuevas técnicas de trasplante, efectuado trabajos experimentales [10-15] y se ha discutido sobre las ventajas de la utilización de aloinjertos de menisco frescos, no se han publicado resultados sobre los efectos de la criopreservación en sus células.

Wada et al [12] logró mejores resultado con el implante de aloinjertos congelados en ratas inmunocompetentes que con los aloinjertos frescos, apuntando a un posible efecto inmunosupresor por parte de la criopreservación [12]. En cuanto al efecto de la congelación sobre la estructura y fisiología del tejido, Arcnoczky et al [16] describieron una disminución acentuada de la actividad biosintética y encontraron una supervivencia únicamente del 10% de las células del tejido. Por su parte, Gellber et al [17] dieron a conocer una alteración de la red de colágeno meniscal y Lewis et al [18] describieron que al realizar diferentes ciclos de congelación - descongelación se comprometía la capacidad mecánica del menisco, especialmente en los ensayos a compresión.

Los efectos descritos en estos trabajos desaconsejarían utilizar la congelación para la preservación de los aloinjertos, teniendo mayor susceptibilidad a sufrir lesiones una vez implantados [14].

Nuestra hipótesis de trabajo es que el almacén de los meniscos a 4°C podría suponer una alternativa factible que evitaría los daños celulares por la congelación, como se ha visto en el cartilago [19,20]. El objetivo del trabajo es analizar el efecto que tiene el almacenamiento a 4°C sobre el comportamiento de las células del tejido meniscal.

I Material y métodos

Animales y diseño experimental

Se utilizaron meniscos procedentes de corderos de raza híbrida navarra de 3 meses de edad y unos 25 kg de peso. Fueron sacrificados mediante inyección de T61 (Intervet,

Madrid, España) por vía intravenosa (0,3 mL/kg) tras lo cual se extrajo la articulación completa.

Los meniscos fueron obtenidos en condiciones de esterilidad. Los fragmentos de menisco que se utilizaron como grupo control fueron digeridos en el momento de su extracción. El resto de fragmentos fueron sumergidos en medio de cultivo y almacenados en nevera a 4°C durante 15 y 30 días respectivamente.

Todas las muestras fueron sometidas a la extracción de células tras lo cual se determinó la viabilidad celular y su tasa de proliferación. Finalmente se estudió su respuesta a distintos factores de crecimiento mediante ensayos de proliferación.

Extracción y cultivo celular

Los meniscos, una vez extraídos, fueron troceados y digeridos con tripsina (0,2 mg/mL) (Merck, Whitehouse Station, USA), colagenasa (0,5 mg/mL) (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA) y dispasa (0,5 mg/mL) (Gibco-BRL), preparadas en medio de cultivo DMEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino, penicilina / estreptomycin (Gibco-BRL) y L-cisteína (Sigma, St Louis, USA), durante unas 16 horas, a 37°C. Tras la digestión, las células fueron recogidas por centrifugación (5 min, 400 g) y lavadas con PBS. Finalmente fueron sembradas en frascos de 75 cm² y cultivadas a 37°C y 5% de CO₂, realizando cambios de medio cada 3-4 días. Se analizó su morfología al microscopio óptico (cámara Sight 2S-2M, Nikon, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan).

Ensayos de proliferación (ensayos MTS)

El estudio de la capacidad de respuesta a distintos factores de crecimiento se efectuó sembrando células de menisco en placas de 96 pocillos (20.000 células por pocillo) sometidas a un tratamiento de 24 h de los factores de crecimiento TGF-β1 (Peprotech, Rozky Hill, USA), IGF-1 (Peprotech), aFGF (Peprotech), bFGF (R&D Systems, Minneapolis, USA) y BMP-7 (Stryker Biotech, Hoptkinton, MA, USA) a 50 ng/mL en medio sin suero.

Tras el tratamiento se añadieron 20 µL de MTS (Promega Madison, USA) por pocillo y se realizó una lectura de absorbancia a 492 nm, una hora después, utilizando un lector de placas (Tecan Männedorf, Switzerland).

Para cada grupo (fresco, almacenamiento durante 15 días y almacenamiento durante 30 días) se calculó y representó el tanto por uno de la absorbancia con respecto a células sin tratamiento. Para el análisis estadístico se realizaron tests no paramétricos de U de Mann-Whitney utilizando el software SPSS 15.0 para Windows (Chicago, IL, USA).

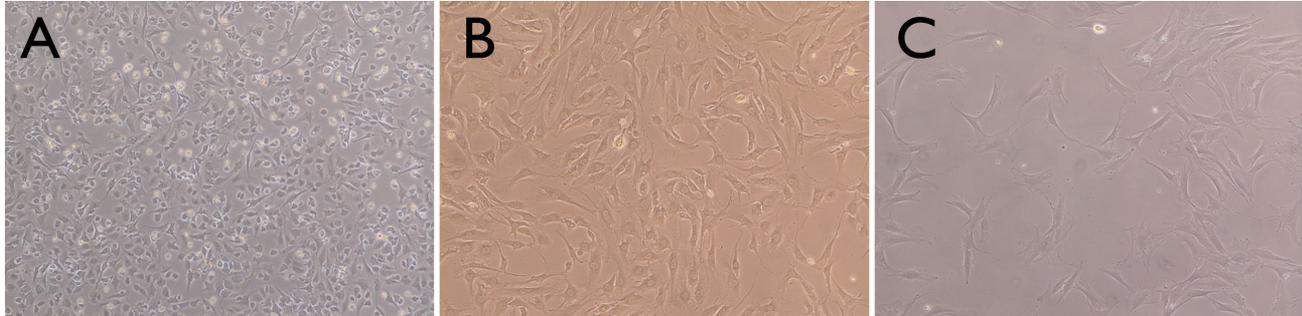


Fig. 1. Morfología de las células procedentes de los fragmentos de menisco tras el periodo de almacenaje a 4°C al microscopio óptico invertido (x10). A, células procedentes de tejido procesado inmediatamente después de su obtención. B y C, células procedentes de tejido almacenado a 4°C durante 15 y 30 días respectivamente. Se puede observar un progresivo cambio en la forma de las células, más pequeñas y redondeadas al principio y mayores y con aspecto de fibroblasto tras el tiempo de almacenamiento.

Resultados

Morfología celular

Tras la digestión de los fragmentos frescos de menisco, se analizó la morfología celular del grupo control hallando células pequeñas y redondas. Por el contrario, los fragmentos almacenados a 4°C, durante 15 y 30 días, generaron células progresivamente más grandes y alargadas, con un aspecto similar al fibroblasto (Figura 1).

Respuesta a factores de crecimiento

Se analizó la modificación de la tasa de proliferación celular mediante tratamiento con factores de crecimiento TGF-β1, IGF-1, aFGF, bFGF y BMP-7 (Figura 2). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la respuesta frente a los factores aFGF y TGF-β en los tres grupos de células. Sin embargo, las células almacenadas a 4°C sí que mostraron diferencias en su respuesta a los factores bFGF e IGF-1.

Tras el almacenamiento durante 15 días, observamos un aumento significativo en la respuesta a los dos factores ($p=0,01$). En el caso de bFGF, la respuesta se mantuvo superior ($p=0,01$) a los 30 días con respecto al control (si bien significativamente inferior al grupo de 15 días, $p=0,01$). En el caso de IGF-1, las células del tejido almacenado durante 30 días mostraron una disminución significativa de su respuesta ($p=0,016$) frente al control. Finalmente, el tratamiento con BMP-7 redujo significativamente la respuesta celular en el grupo de 15 días de almacenamiento con respecto al tejido fresco ($p=0,01$) que volvió a ser una respuesta similar al mismo grupo tras el mantenimiento durante 30 días.

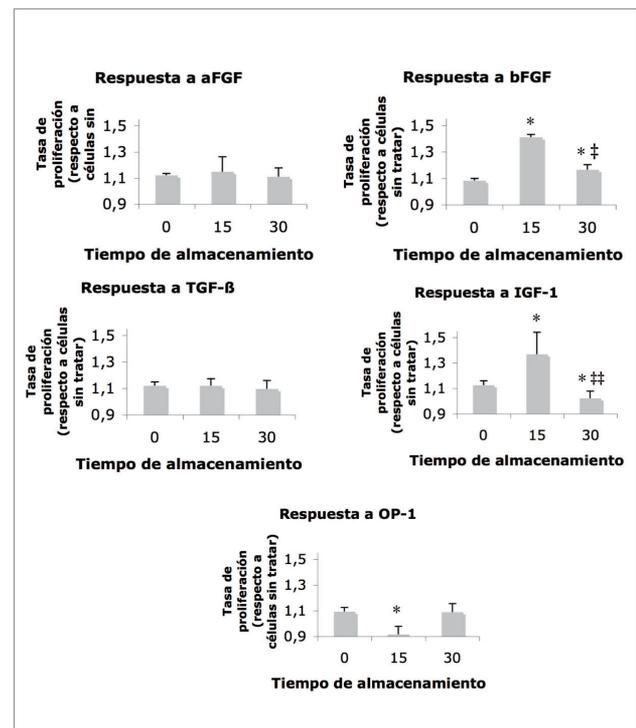


Fig. 2. Respuesta celular al tratamiento con factores de crecimiento. Se realizaron ensayos de MTS sobre células con los factores de crecimiento a una concentración de 50 ng/mL y durante 24 horas. Tras el tiempo de incubación se realizó la tinción con MTS y se calculó la respuesta refiriendo el valor obtenido para el mismo valor obtenido para células sin tratamiento ($n=6$). Todos los ensayos fueron repetidos para comprobar su reproducibilidad. (*) $p<0,05$ con respecto a células sin tiempo de almacenamiento. (‡) $p<0,05$ con respecto a células procedentes de tejido almacenado durante 15 días a 4°C. (‡‡) $p<0,01$ con respecto a células procedentes de tejido almacenado durante 15 días a 4°C.

I Discusión

El almacenamiento de tejido meniscal a 4°C sería una alternativa a la congelación del tejido para evitar daños en la estructura, biomecánica y fisiología del mismo [16-18]. No existen hasta la fecha estudios que demuestren el estado ni la viabilidad de las células de meniscos almacenados a esta temperatura. La idea inicial de nuestro trabajo fue que los meniscos conservados a 4°C y tratados con factores de crecimiento, podrían mejorar la viabilidad celular y preservar las condiciones estructurales del menisco, lo cual es de utilidad en los trasplantes de meniscos alogénicos.

Además del descenso en el número de células viables presentes en los tejidos almacenados también, hemos observado un cambio sustancial en su morfología. Si tras la extracción del tejido procedente del animal obtuvimos células redondeadas, supuestamente similares a las células en un entorno tridimensional, tras los dos tiempos de conservación analizados mostraron un cambio significativo, siendo más alargadas y similares al típico cultivo primario de fibroblastos. Este mismo fenómeno se ha observado y está ampliamente descrito en el cartílago [21-25]. Los condrocitos sufren un proceso de dediferenciación en el cultivo en monocapa que los transforma gradualmente en fibroblastos, incapaces de generar nueva matriz extracelular una vez son cultivados tridimensionalmente.

Este dato podría, no obstante, estar relacionado con el descenso de viabilidad celular en los fragmentos conservados. Al obtener menos células viables tras la digestión del tejido, es necesario que sufran un mayor número de duplicaciones hasta alcanzar la confluencia en la misma superficie de cultivo, con lo que a pesar de que no se realice ningún pase, las células correspondientes a los tejidos almacenados durante 15 y, sobre todo, de 30 días serían células más viejas, habiendo sufrido un mayor número de duplicaciones. Por ello, el efecto observado podría ser debido, al menos en parte, a la proliferación *in vitro* y del periodo de almacenamiento.

Los factores de crecimiento utilizados han sido elegidos por los efectos que han demostrado sobre las células de menisco [26-31]. Los factores aFGF y TGF- β elevaron la proliferación de igual forma en los 3 grupos de células estudiados. Sin embargo, el almacenamiento a 4°C produjo cambios en la fisiología de las células ya que su respuesta varió sustancialmente. Tras los 15 días de almacenaje, las células de menisco fueron más susceptibles al tratamiento con IGF-1 y con bFGF y, por el contrario, mostraron una menor sensibilidad al factor BMP-7. Curiosamente tras los 30 días de almacenaje, la respuesta a bFGF e IGF-1 volvió a descender, manteniéndose por encima del control para bFGF y por debajo en el caso de IGF-1. La BMP-7 volvió a generar una respuesta similar a la observada en las células de tejido fresco.

Estos datos demuestran que se producen cambios en el metabolismo celular tras un tiempo a 4°C y que estos cambios pueden variar según el tiempo que el tejido permanece a baja temperatura.

El aumento de la sensibilidad celular a bFGF e IGF-1 [26-28,30-31] podría ser reflejo del intento de las células de sobreponerse a los cambios degenerativos que sufriría el menisco [16-18]. Durante el almacenamiento a bajas temperaturas, si bien el tejido contiene células viables, sufre una alteración en la composición y características de la matriz extracelular, lo que dispara los mecanismos intracelulares que inducen a expresar más receptores celulares, para responder de forma más activa a los factores presentes y restaurar en parte, el daño aparecido en el tejido.

En nuestro modelo, el intento de sensibilización de las células meniscales para facilitar la reparación y el mantenimiento del tejido está limitado en el tiempo. Superados los 30 días de almacenamiento, a baja temperatura, las células vuelven paulatinamente a su estado natural, disminuyendo su capacidad de respuesta, en algunos casos incluso por debajo del que muestran inicialmente.

Consideramos clave el análisis de estos cambios que sufren las células y no sólo el número de éstas, pues ellas son las que se encargarán de mantener en condiciones correctas la matriz extracelular del menisco una vez implantado y, por tanto, permitirán el desarrollo de su función en la rodilla. I

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Duart J, Ripalda P, Izal I, Forriol F. Estimulación de la reparación de las lesiones longitudinales en la zona avascular de menisco. Estudio experimental en corderos. *Patología Aparato Locomotor* 2004; 2:189-98.
2. Sgaglione NA, Steadman JR, Shaffer B, Miller MD, Fu FH. Current concepts in meniscus surgery: resection to replacement. *Arthroscopy* 2003; 19 (suppl 1): 161-88.
3. Buckwalter JA, Mow VC, Ratcliffe A. Restoration of injured or degenerated articular cartilage. *J Am Acad Orthop Surg* 1994; 2:192-201.
4. Gole MD, Poulsen D, Marzo JM, Ko SH, Ziv I. Chondrocyte viability in press-fit cryopreserved osteochondral allografts. *J Orthop Res* 2004; 22:781-7.
5. Jomha NM, Anoop PC, McGann LE. Intramatrix events during cryopreservation of porcine articular cartilage using rapid cooling. *J Orthop Res* 2004; 22:152-7.
6. Hsieh YS, Yang SF, Chu SC, Chen PN, Chou MC, Hsu MC, et al. Expression changes of gelatinases in human osteoarthri-

- tic knees and arthroscopic débridement. *Arthroscopy* 2004; 20:482-8.
7. Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online* 2004; 9:164-70.
 8. Rendal ME, Maneiro E, Rodríguez-Cabarcos M, Lopez de Ullibarri I, Andion C, Blanco FJ. Effect of cryopreservation on human articular chondrocyte viability, proliferation, and collagen expression. *Cryobiology* 2001; 42:2-10.
 9. Schachar NS, Cucheran DJ, McGann LE. Metabolic activity of bovine articular cartilage during refrigerated storage. *J Orthop Res* 1994; 12:15-20.
 10. Fabbriani C, Lucania L, Milano G, Schiavone Panni A, Evangelisti M. Meniscal allografts: cryopreservation vs deep-frozen technique. An experimental study in goats. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1997; 5:124-34.
 11. Mora G, Alvarez E, Ripalda P, Forriol F. Articular cartilage degeneration after frozen meniscus and Achilles tendon allograft transplantation: experimental study in sheep. *Arthroscopy* 2003; 19:833-41.
 12. Wada Y. Meniscal transplantation using fresh and cryopreserved allografts an experimental study in the genetically defined rat. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1993; 67:677-83.
 13. Jackson DW, McDevitt CA, Simon TM, Arnoczky SP, Atwell EA, Silvino NJ. Meniscal transplantation using fresh and cryopreserved allografts. An experimental study in goats. *Am J Sports Med* 1992; 20:644-56.
 14. Arnoczky SP, DiCarlo EF, O'Brien SJ, Warren RF. Cellular repopulation of deep-frozen meniscal autografts: an experimental study in the dog. *Arthroscopy* 1992; 8:428-36.
 15. Arnoczky SP, Warren RF, McDevitt CA. Meniscal replacement using a cryopreserved allograft. An experimental study in the dog. *Clin Orthop Rel Res* 1990; 252:121-8.
 16. Arnoczky SP, McDevitt CA, Schmidt MB, Mow VC, Warren RF. The effect of cryopreservation on canine menisci: a biochemical, morphologic, and biomechanical evaluation. *J Orthop Res* 1988; 6:1-12.
 17. Gelber PE, Gonzalez G, Lloreta JL, Reina F, Caceres E, Monllau JC. Freezing causes changes in the meniscus collagen net: a new ultrastructural meniscus disarray scale. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008; 16:353-9.
 18. Lewis PB, Williams JM, Hallab N, Viridi A, Yanke A, Cole BJ. Multiple freeze-thaw cycled meniscal allograft tissue: A biomechanical, biochemical, and histologic analysis. *J Orthop Res* 2008; 26:49-55.
 19. Schachar NS, Cucheran DJ, McGann LE. Metabolic activity of bovine articular cartilage during refrigerated storage. *J Orthop Res* 1994; 12:15-20.
 20. Williams RJ, Dreese JC, Chen CT. Chondrocyte survival and material properties of hypothermally stored cartilage: an evaluation of tissue used for osteochondral allograft transplantation. *Am J Sports Med* 2004; 32:132-9.
 21. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer A. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro, I. Dedifferentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1960; 46:1533-42.
 22. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Muller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977; 267:531-2.
 23. Thorogood P, Bee J, von der Mark K. Transient expression of collagen type II at epitheliomesenchymal interfaces during morphogenesis of the cartilaginous neurocranium. *Dev Biol* 1986; 116:497-509.
 24. Mayne R, Vail MS, Mayne PM, Miller EJ. Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73:1674-8.
 25. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30:215-24.
 26. Izal I, Ripalda P, Acosta CA, Forriol F. In vitro healing of avascular meniscal injuries with fresh and frozen plugs treated with TGF-beta1 and IGF-1 in sheep. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1:426-34.
 27. Pangborn CA, Athanasiou KA. Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. *J Orthop Res* 2005; 23:1184-90.
 28. Imler SM, Doshi AN, Levenston ME. Combined effects of growth factors and static mechanical compression on meniscus explant biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12:736-44.
 29. Buma P, Ramrattan NN, van Tienen TG, Veth RP. Tissue engineering of the meniscus. *Biomaterials* 2004; 25:1523-32.
 30. Zaleskas JM, Kinner B, Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ, Spector M. Growth factor regulation of smooth muscle actin expression and contraction of human articular chondrocytes and meniscal cells in a collagen-GAG matrix. *Exp Cell Res* 2001; 270:21-31.
 31. Narita A, Takahara M, Ogino T, Fukushima S, Kimura Y, Tabata Y. Effect of gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2 on human meniscal cells in an organ culture model. *Knee* 2009 (en prensa).

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.