

Protocolos para el diseño *in vitro* de cartílago articular animal basados en métodos de ingeniería de tejidos

Protocols for the *in vitro* design of animal articular cartilage based on tissue engineering methods

Diego Correa, Julia Arroyo**, Adolfo Llinás***, Helena Groot****, Juan Carlos Briceño******

RESUMEN

El cartílago articular es la estructura que recubre las superficies óseas en las articulaciones. Tiene funciones biomecánicas específicas que lo hacen el tejido más importante en el mantenimiento de la homeostasis articular. Se lesiona con mucha frecuencia generando consecuencias discapacitantes. Infortunadamente cuenta con una muy escasa capacidad de autorreparo por lo cual se han generado múltiples tratamientos con éxitos parciales, dado el hecho de que el tejido de reparo que se crea es biomecánicamente subóptimo con relación al nativo. Por lo anterior, la ingeniería de tejidos ofrece una alternativa basada en la creación de un nuevo tejido con características biológicas y biomecánicas similares a las originales. En este trabajo se describen los protocolos por seguir para la creación de un tejido cartilaginoso que intente cumplir con tales fines. Se describen los pasos para obtener condrocitos animales, su posterior cultivo celular, la siembra de los mismos en las matrices fabricadas como soporte, la estimulación mecánica de los implantes en creación como base demostrativa del papel que las deformaciones mecánicas en los condrocitos tienen en el resultado final de los implantes, y finalmente la evaluación estructural y biomecánica de los tejidos creados. Por último se exponen algunos resultados alcanzados hasta la fecha por el grupo de autores, en donde se validan experimentalmente algunas de las metodologías propuestas.

Palabras clave: Condrocitos, biopolímeros, biomecánica, cultivos celulares, mecanobiología.

ABSTRACT

The articular cartilage is the structure that covers the joint ends. It has some specific tasks crucial to the correct joint physiology. It may experience a large amount of injuries that could generate considerable disabilities. Unfortunately its selfrepair capacity is too limited; therefore, many treatments have been developed with partial success, given the suboptimal biomechanical behavior of the resultant tissue. Given that, Tissue Engineering offers an alternative, based on the design of a new tissue with biological and biomechanical features which resembles the native tissue. In this work, the authors describe the methodologies followed to accomplish that goal, studying the chondrocytes harvesting, the cellular cultures, the scaffold seeding processes, the mechanical stimulation and the structural and biomechanical evaluation.

Finally, exposed some of the preliminary results, as a experimental validation of the methods proposed are.

Key words: Chondrocytes, biopolymers, biomechanics, cell cultures, mechanobiology.

* MD, MSc. Grupo de Ingeniería Biomédica, Departamento de Ingeniería Mecánica, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, Cra 1 E No. 18 A – 70, Tel.: 3324322; Fax: 3324323. e-mail: die-corr@uniandes.edu.co

** MSc. Laboratorio de Genética humana, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. e-mail: jarroyo@uniandes.edu.co

*** MD. Banco de Huesos y Tejidos (Fundación Cosme y Damián), Bogotá, Colombia. e-mail: allinas@impsat.net.co

**** MSc. Laboratorio de Genética humana, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. e-mail: hgroot@uniandes.edu.co

***** PhD. Grupo de Ingeniería Biomédica, Departamento de Ingeniería Mecánica, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, Cra 1 E No. 18 A – 70, Tel.: 3324322; Fax: 3324323. e-mail: jbriceno@uniandes.edu.co

INTRODUCCIÓN

El cartílago articular es un tejido avascular y aneural que recubre las superficies óseas de las articulaciones, con cinco propósitos principales: proveer a la articulación las características de uso para el movimiento, disminuir la fricción entre las superficies de contacto, proveer de lubricación, absorber impactos mecánicos y distribuir las cargas aplicadas en el hueso subyacente. Está compuesto principalmente de células (condrocitos) y de una matriz extracelular que le imprime —gracias a su composición electroquímica— las propiedades mecánicas necesarias para su funcionamiento biomecánico particular. Esta matriz se compone de un 65-80 % de agua con iones cargados (Na, Ca, Cl, K), de un 10-20 % de colágeno (principalmente tipo II), de un 4-7 % de proteoglicanos (cuerpos proteicos con glicosaminoglicanos: condroitin y keratán sulfato, unidos por una cadena de ácido hialurónico), y un muy pequeño porcentaje de otros constituyentes como lípidos, fosfolípidos, proteínas y glicoproteínas. Es un tejido que se lesiona con alta frecuencia, generando tanto sintomatología discapacitante como alteraciones funcionales articulares. Su gran punto débil radica en la muy escasa capacidad de autorreparo luego de una lesión, dada su estructura avascular, lo cual le limita el acceso de material biológico de reparo.

Las lesiones de esta estructura se dividen de acuerdo con su extensión en amplias y focales, y según su profundidad, en superficiales y profundas (comprometen hueso subcondral). Las lesiones superficiales no tienen opción de autorreparo, mientras que en las profundas existe una migración de células a partir de la médula ósea subyacente a la lesión, las cuales se diferencian en condrocitos productores de cartílago (fibrocartílago) con características histológicas y propiedades mecánicas que difieren del cartílago hialino original.

A raíz de esto se ha evolucionado en los tratamientos ortopédicos, los cuales tienen siempre por objetivo principal el de tratar de imitar biológica y mecánicamente el cartílago articular indemne. Los tratamientos previos al desarrollo de la ingeniería de tejidos se basaban en el reparo del tejido (por ejemplo: alo y autoinjertos, dragado del hueso subcondral, flaps de periosteo, etc.), situación que desencadenaba en el sitio de lesión un proceso de cicatrización que no le imprimía al cartílago articular características idóneas para su función.

A raíz del conocimiento de estas fallas se desarrollaron técnicas que procuran, en vez del reparo tisular, promover un proceso denominado regeneración biológica, en el cual se trata de imitar la secuencia del desarrollo embrionario en la formación de los tejidos, ofreciendo como resultado final un tejido "idéntico" al inicial. En los últimos años se han involucrado a los biopolímeros como elementos cruciales para el correcto crecimiento de los tejidos *in vitro* gracias a que ofrecen estructuras tridimensionales que simulan el microambiente propio del tejido nativo. En este estudio se involucra con esta motivación una matriz polimérica fibrosa de ácidos poliláctico y poliglicólico y una biológica de submucosa intestinal, las cuales permitirán la adhesión celular y el posterior crecimiento del tejido en formación. Recientemente se ha estudiado dentro de una disciplina naciente, denominada mecanobiología, el papel que desempeña la estimulación mecánica al cultivo celular en la formación de matriz extracelular por parte de los condrocitos, observando entre los resultados de estas investigaciones el hecho de que las propiedades biomecánicas de los implantes son superiores en los tejidos estimulados durante su desarrollo en comparación con los no estimulados (Buschman *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1994).

Este estudio tiene por objetivo central el diseñar las metodologías de cultivo de condrocitos en monocapa para obtener densidad poblacional alta, de sembrado en la matriz polimérica para generar implantes cartilaginosos, de estimulación mecánica a los cultivos celulares y de evaluación biomecánica y estructural de los tejidos formados finalmente.

METODOLOGÍA

Cultivos celulares

Se extraen muestras de cartílago articular de los patillos tibiales y cóndilos femorales de rodillas de conejos Nueva Zelanda de 25 días de nacidos, a quienes previamente se les ha practicado eutanasia con éter inhalado, haciendo parte del protocolo que fue evaluado y aprobado por el comité de ética de investigación de la Universidad de los Andes. De estas muestras se aíslan los condrocitos enzimáticamente (colagenasa tipo II de SIGMA); se les realiza pruebas de viabilidad celular con tinción azul de Trypan (GIBCO) en cámara de Neubauer. Luego se cultivan en DMEM (SIGMA) suplementado con suero bovino fetal (SIGMA), penicilina-estreptomicina (GIBCO),

glutamina (GIBCO), bicarbonato de sodio y anfotericina B (GIBCO), en cajas de Petri de 100 x 20 mm (FALCON). Se dejan en cultivo en incubadora a 37°C, 5% CO₂ y atmósfera húmeda, cambiando el medio de cultivo cada tres días. Se realizan pases luego de evidenciar adhesión al fondo del plato de cultivo y visualizar confluencia celular en el mismo. El objetivo de estos cultivos es lograr generar línea celular y una densidad apropiada necesaria para la siembra en la matriz polimérica.

Siembra en la matriz polimérica

Una vez se tiene gran densidad celular de condrocitos, éstos se siembran en cilindros de 1 cm de diámetro por 2 mm de espesor de matriz polimérica que actualmente se encuentra en fabricación con fibras de Vicryl (JOHNSON & JOHNSON) en PGA – PLA 50:50 (BIRMINGHAM POLYMERS), y en matrices biológicas de submucosa intestinal (SIS), fabricadas en la Universidad de los Andes (Tabima *et al.*, 2002). Estos cilindros de matriz/células son puestos en cajas de Petri de vidrio, especialmente diseñadas con las dimensiones requeridas. Por las características fenotípicas de este tipo celular, es indispensable sembrar a altas densidades (1'000.000 células por mm³ de polímero). Este cultivo se extiende por ocho semanas en las mismas condiciones de la incubadora.

Estimulación mecánica de los cultivos celulares

Los implantes en formación son expuestos a cargas mecánicas en compresión gracias a un sistema especialmente diseñado para este fin (véase figura 1) que se compone de un motor eléctrico de 15 V, al cual se le incorpora una biela con un pistón compresor que comprime el implante cíclicamente. Dentro de la gran gama de posibilidades de cargas compresivas se escogió la dinámica (sinusoidal) a una frecuencia de 0,01 Hz y con una amplitud del 15% del espesor del implante. El protocolo de estimulación es de 24 horas continuas al inicio de la siembra en el polímero, y posteriormente tres horas diarias durante el tiempo del cultivo.

Evaluación biomecánica

Para evaluar el comportamiento viscoelástico de los implantes fabricados, se diseñó primero una metodología en la cual se miden propiedades mecánicas

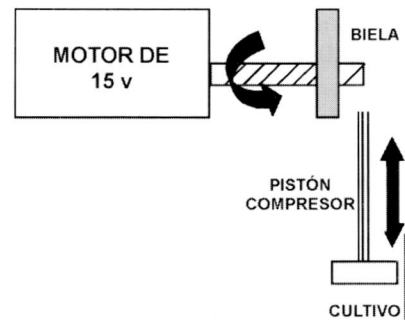


Figura 1: Sistema de estimulación mecánica

de cilindros osteocondrales obtenidos de platillos tibiales de rodillas de bovinos donados por el matadero local, extraídos con una sierra copa, y mantenidos a 4°C en cierre hermético hasta el momento de la prueba, cuando se les adiciona PBS (*Phosphate Buffer Saline* – GIBCO) a temperatura ambiente. Los resultados se comparan con la literatura para validación experimental (Chen *et al.*, 2001; Mow *et al.*, 1980; Schinagl *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001). Esta metodología se aplica posteriormente en la medición de las mismas propiedades mecánicas de los implantes fabricados *in vitro*.

El acercamiento a las características viscoelásticas se realiza a partir de una prueba de relajación de esfuerzos a compresión utilizando el modelo de cámara confinada (Mow *et al.*, 1980) adaptado para este trabajo (véase figura 2). Los parámetros utilizados para esta prueba se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Parámetros de la prueba de relajación de esfuerzos a compresión

Porcentaje de deformación inicial (rampa)	10 % del espesor del tejido
Velocidad rampa (Vo)	0,01 mm/min
Duración rampa (to)	600 s
Duración total de la compresión	2.400 s
Precarga	0,30 N (300 s)

Se realizaron pruebas a diez cartílagos bovinos cuyas dimensiones fueron: diámetro: 10,5 mm (+/- 0,1 mm), espesor: 1,46 mm (+/- 0,26 mm) (media +/- desviación estándar). A partir de estas pruebas se generan curvas de esfuerzo vs. tiempo, en las cuales se obtiene el esfuerzo de equilibrio, a partir del

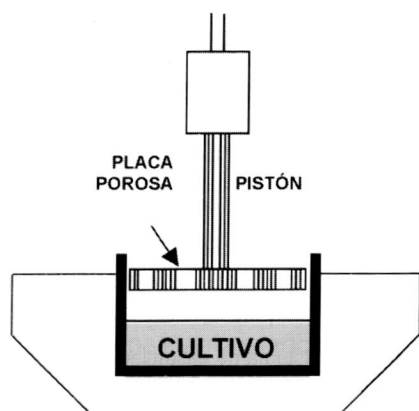


Figura 2: Esquema de la cámara confinada para prueba de relajación de esfuerzos a compresión (vista lateral)

cual se calcula el módulo agregado de equilibrio (HA), que corresponde a la propiedad mecánica de mayor importancia en la evaluación del comportamiento viscoelástico. El HA se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$HA = \sigma_{\text{equilibrio}} / \epsilon$$

HA= Módulo agregado de equilibrio (MPa)

$\sigma_{\text{equilibrio}}$ = esfuerzo hallado en la curva resultante (MPa)

ϵ = deformación inicial : $\epsilon = \frac{V_{\text{oto}}}{h}$, (h = espesor del tejido en mm).

Otra prueba mecánica que arroja datos útiles en la caracterización biomecánica es una prueba de tensión convencional, de la cual se obtienen la resistencia a la tensión y módulo de elasticidad en tensión. Las probetas que se utilizan se describen en la figura 3 (Woo *et al.*, 1976). Para esto se utiliza la máquina universal de pruebas mecánicas (modelo 8856, Instron Co, Canton, Massachusetts, 02021, USA) con mordazas para tejidos biológicos (2710-002, Instron Co, Canton, Massachusetts, 02021, USA).

Evaluación estructural

Los implantes fabricados además de ser evaluados mecánicamente se analizan estructuralmente por dos vías: 1) cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina para visualizar la arquitectura general de los tejidos, y 2) Tinción con Azul de Alcian para visualizar distribución de los Glicosaminoglicanos (GAG) en el tejido.

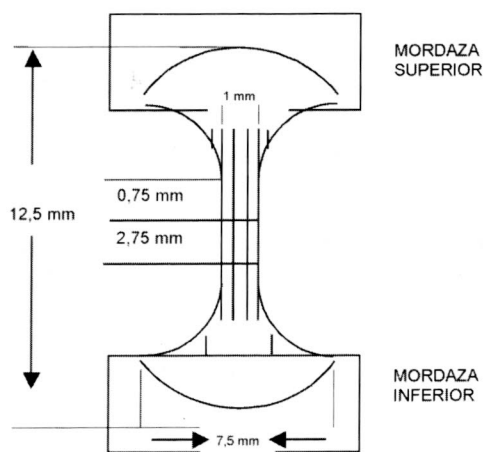


Figura 3: Probetas de cartilago articular bovino para pruebas de tensión.

RESULTADOS PARCIALES

Cultivos celulares

Hasta la fecha se han realizado seis experimentos de extracción de muestras de cartilago articular, siendo exitoso el tercero. En los tres primeros, la cantidad de tejido extraído de los conejos fue insuficiente (una sola rodilla) por lo cual los cultivos no prosperaron (conteo celular aprox. 65.000 células). En los últimos dos se presentó contaminación micótica, por lo cual a pesar de contar con buena cantidad celular fueron desechados. En el cuarto experimento se tomó mayor cantidad de muestra (dos rodillas) observando una población celular mayor (aprox. 150.000 células) y el fenómeno de cambio en la morfología de las mismas, pasando de cilíndricas a estrelladas al cabo del sexto día, posterior al inicio del proceso de adhesión al fondo del plato de cultivo. Al cabo del día 30 se evidenció confluencia celular en toda la caja de cultivo. En este punto se realizó el primer pase, a partir del cual la tasa de división celular se incrementó, conclusión hecha luego de observar confluencia celular más rápida en los platos secundarios (10 días). A la fecha se han realizado tres pases, con una población celular total estimada en 2'000.000 de células.

Siembra en la matriz polimérica

Actualmente las matrices poliméricas de Vicryl PGA-PLA 50:50 se encuentran en fabricación y caracterización tanto física como mecánica. Las matrices de SIS ya se fabrican y actualmente se están sembrando.

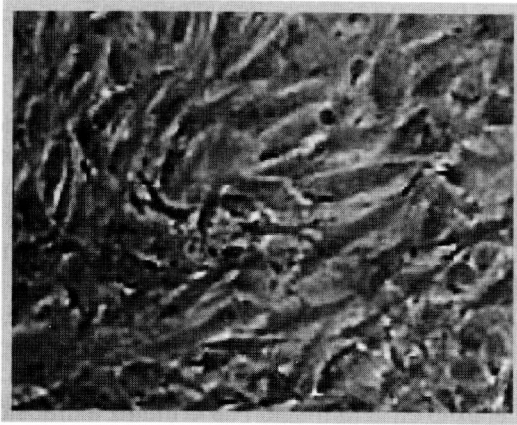


Figura 4: Cultivo celular confluyente (20X – Zoom 2)

do con fibroblastos de línea celular como parte de otro proyecto de investigación del grupo de Ingeniería Biomédica.

Estimulación mecánica de los cultivos

El mecanismo diseñado para estimular mecánicamente los cultivos según los parámetros expuestos en Metodología se encuentra actualmente en su fase final de construcción.

Evaluación biomecánica

De los diez tejidos sometidos a la prueba de relajación de esfuerzos, nueve exitosos arrojaron los siguientes datos:

Tabla 2. Resultados prueba de relajación de esfuerzos en compresión en cámara confinada

Tejido	Espesor tejido (mm)	ϵ	Esfuerzo equilibrio (MPa)	Ha (MPa)
1	1,5	0,066	0,020	0,303
2	1,7	0,059	0,022	0,372
3	2	0,050	0,010	0,200
4	1,3	0,077	0,013	0,169
5	1,3	0,077	0,011	0,143
6	1,5	0,066	0,010	0,151
7	1,1	0,090	0,087	0,966
8	1,3	0,077	0,010	0,130
9	1,5	0,066	0,025	0,378

Los datos obtenidos en los nueve experimentos generan un HA de $0,312 \pm 0,263$ MPa (media +/- desviación estándar).

La figura 5 muestra una curva típica de relajación de esfuerzos en compresión (tejido 4) en la cual se observan la curva inicial de incremento del esfuerzo generada por la rampa de deformación inicial, seguida por una de relajación del esfuerzo necesario para mantener la misma deformación, hasta el punto de equilibrio. Las pruebas a tensión convencional se están realizando actualmente.

Evaluación estructural

Se realizarán los cortes y las tinciones una vez se tengan los implantes fabricados, posterior al cultivo estimulado en las matrices polimérica y biológica.

CONCLUSIONES

Hasta el momento se han logrado implementar con éxito dos de las cinco metodologías planteadas inicialmente. Las otras tres se encuentran en sus etapas finales de desarrollo, y en ello se viene trabajando en la actualidad.

Los resultados observados luego de poner en práctica las metodologías de cultivo celular de condrocitos ratifican el hecho descrito por Watt (1988), quien argumenta que los cultivos celulares de este tipo de células son viables a densidades de cultivo

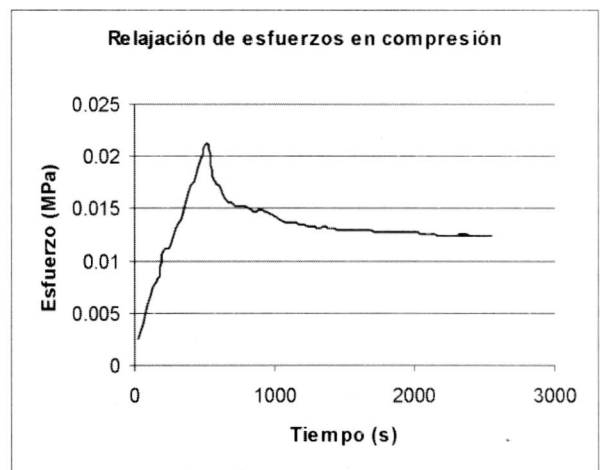


Figura 5: Curva típica de relajación de esfuerzos en compresión de cartílago articular bovino (tejido 4)

elevadas ($1'000.000$ células/ mm^3 o más). Aunque en este trabajo el alcance no permite dilucidar con precisión la causa de este hecho y sabiendo que requiere mayor investigación, se cree que este fenómeno se debe en gran medida a la inestabilidad fenotípica y al proceso de desdiferenciación que los condrocitos presentan en cultivo.

Una vez las células se adhieren al fondo del plato de cultivo cambian su morfología, hecho también descrito por autores en trabajos previos, lo que les permite reiniciar el proceso de división celular, el cual se ve acelerado cuando existe confluencia celular. Este hecho es explicado por el fenómeno de comunidad y de unión/señal intercelulares presente en este punto del cultivo.

A pesar de contar con gran número de células en el momento, es necesario que el proceso de división celular persista de esta forma dado el requerimiento de sembrar a altas densidades en la matriz polimérica para asegurar viabilidad biológica del futuro implante.

La evaluación biomecánica que se le realizó al tejido siguiendo la metodología diseñada para tal fin, arrojó datos muy interesantes. Primero, y como conclusión principal, se establece que el uso de la cámara confinada de compresión axial (Mow *et al.*, 1980) que se adaptó para este trabajo es una excelente alternativa para la simulación de las condiciones mecánicas *in vivo*, y que permite reproducir el fenómeno de relajación de esfuerzos que el cartílago articular animal experimenta al ser cargado y consecuentemente deformado axialmente.

Como se mencionó anteriormente, el módulo agregado de equilibrio corresponde a una de las cuatro propiedades mecánicas más importantes y estudiadas del cartílago articular. Esta propiedad permite calcular primero, el esfuerzo de transición que ocurre en el momento de transferencia del soporte de la carga axial de la fase líquida (fluyendo dentro del tejido) a la sólida (matriz extracelular de colágeno/proteoglicanos), y segundo, aproximarse a la resistencia mecánica de la matriz anteriormente mencionada. Los datos obtenidos de la prueba de relajación de esfuerzos realizada en los nueve tejidos mostraron que el resultado promedio del mismo se debe evaluar analizando el tejido como no homogéneo, y en el cual dicho módulo varía con el espesor del mismo. Como el porcentaje de defor-

mación inicial para todos los tejidos fue del 10%, se presume (avalado por autores) (Schinagl *et al.*, 1997) que esta deformación sólo se produjo en las capas más superficiales del tejido, y que los desplazamientos en las capas más profundas, incluyendo el hueso subcondral, se considera como cero. Por lo anterior, el HA promedio hallado en este estudio corresponde al calculado por Schinagl y colaboradores en su segunda capa dentro del cartílago articular (cerca de la superficie). Esta metodología permitirá evaluar esta misma propiedad mecánica en los implantes, y de esta forma estimar el éxito en la formación de la matriz extracelular por parte de los condrocitos sembrados en la malla polimérica tridimensional.

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Ingeniería Biomédica (GIB) por el respaldo, a través de una asistencia financiera del Fondo de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de los Andes, de recursos del premio de Colciencias al GIB (2000-2001) y de recursos del Programa de Apoyo a Doctorados Nacionales de Colciencias. Al Centro de Innovación Tecnológica (Citec) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de los Andes, en donde se han realizado las pruebas mecánicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Buschmann M. D., Gluzband, Y. A., Grodzinsky, A. J., Hunziker E. B. 1995. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J. Cell. Sci.* 108: 1497-1508.
- Chen, A.C., Bae, W. C., Schinagl, R. M., Sah, R. L. 2001. Depth and strain dependent mechanical and electromechanical properties of full thickness bovine articular cartilage in confined compression. *J. Biomech.* 34: 1-12.
- Kim, Y. J., Sah R. L., Grodzinsky, A. J., Plaas A. H., Sandy, J. D. 1994. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: Physical stimuli. *Arch Bioch and Bioph.* 311 (1): 1-12.
- Mow, V. C., Kuei, S. C., Lai, W. M., Armstrong, C. G. 1980. Biphasic Creep and Stress Relaxation of articular cartilage in compression: theory and experiments. *J. Biomech. Eng.* 102: 73-84.

Schinagl, R. M., Gurskis, D., Chen, A. C., Sah, R. L. 1997. Depth dependent confined compression modulus of full thickness bovine articular cartilage. *J. Orthop Res* . 15 (4): 499-504


Tabima, D. M., Briceño, J. C., y cols. 2002. Desarrollo de una metodología para la preparación y evaluación de matrices biodegradables para el crecimiento de células humanas. Tesis de MSc. en Ingeniería Mecánica. Universidad de los Andes.

Wang, C. C., Hung, C. T., Mow, V. C. 2001. An analysis of the effects of depth dependent aggregate

modulus on articular cartilage stress relaxation behavior in compression. *J. Biomech*. 34: 75-84.

Watt, F. 1988. Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. *J. Cell. Sci*. 89: 373-378.

Woo, S. L., Akeson, W. H., Jemmott, G. F. 1976. Measurements of nonhomogeneous directional mechanical properties of articular cartilage in tension. *J. Biomech*. 9: 785-791.



Presenta:
Su nueva Division de
Productos Biologicos
a base de:

- **Trichoderma lignorum**
- **Verticillium lecanii**
- **Beauveria bassiana**
- **Metarhizium anisopliae**
- **Paecilomyces lilacinus**
- **Bacillus thuringiensis**

AGROGEN S.A. C.C. Trade Center Carrera 100 No. 11-60
Torre Farallones Of. 318 - PBX: 330 8000 Fax: 315 8279
E-mail: agrogen@colomsat.net.co - Cali - Colombia

