

ARTÍCULOS ORIGINALES

Aproximación al cultivo de condrocitos en la Universidad Nacional de Colombia. Reporte técnico**Approach to chondrocytes culture in National University of Colombia. A technical report****Nancy Stella Landínez Parra^I; Diego Alexander Garzón Alvarado^{II}; Carmen Alicia Cardozo de Martínez^{III}**

^IMáster en Ingeniería Biomédica. Profesor Asistente. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

^{II}Doctor en Ciencias (PhD), Máster en Ciencias, Ingeniero Mecánico. Profesor Adjunto. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

^{III}Profesora Asociada. Grupo de Reactivos Biológicos. Laboratorio de Biomiméticos-IBUN. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

RESUMEN

La pérdida de un tejido o de su función, debido a defectos congénitos, enfermedad o trauma, es uno de los problemas más difíciles, frecuentes y costosos que enfrenta la medicina humana. La degeneración del cartílago articular se conoce como osteoartrosis (OA), la cual se manifiesta mediante daño enzimático y mecánico de la matriz extracelular, que genera dolor y conduce a pérdida del movimiento e inestabilidad articular. El cartílago articular tiene una baja capacidad de reparación, por su avascularidad. El presente trabajo pretende realizar una aproximación a la ingeniería tisular del cartílago con el propósito de establecer la fundamentación teórica en el tema para comprender el comportamiento *in vitro* del tejido que permita a futuro construir un equivalente de cartílago mediante los procedimientos actuales de ingeniería tisular, que ofrezca respuesta a la problemática social y de salud pública. Las conclusiones del presente trabajo posibilitan futuras investigaciones en el campo de la regeneración de cartílago articular y su aplicación clínica e igualmente brindan las bases para plantear investigaciones *in vivo* o *in vitro* que profundicen en el tema.

Palabras clave: cartílago articular, ingeniería tisular, condrocitos, factores de crecimiento, bioreactores.

ABSTRACT

The loss of a tissue or its function due to congenital defects, disease or trauma, is one of the major, frequent and expensive problems challenging the human medicine. The articular cartilage degeneration is known as osteoarthritis (OA), which is characterized by enzyme and mechanical damage of extracellular matrix, generating pain and lead to the loss of movement and articular instability. The articular cartilage has low repair ability due to its avascularization. The aim of present paper is to make an approach to cartilage tissue engineering to establish the theoretical basis on this subject to understand the tissue *in vitro* behavior allowing in the future, to construct a cartilage equivalent by means of current procedures of tissue engineering, offering a response to social problems and of the public health. Conclusions from present paper make easy futures researches in the field of articular cartilage regeneration and its clinical application and also, providing the bases to planning *in vivo* and *in vitro* researches to deepen in this subject.

Key words: Articular cartilage, tissue engineering, chondrocytes, growth factors, bioreactors.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de un tejido o de su función, debido a defectos congénitos, enfermedad o trauma, es uno de los problemas más difíciles, frecuentes y costosos que enfrenta la medicina humana.¹ Las actuales modalidades de tratamiento incluyen los autoinjertos, los aloinjertos y las prótesis artificiales, sin embargo cada uno de estos métodos tienen sus propias limitaciones que incluyen la escasez de donantes de tejidos, la presencia de reacciones inmunes y la transferencia de agentes patógenos, lo que hace difícil el éxito de estos procedimientos. Por tal razón, el advenimiento de la ingeniería de tejidos constituye un desafío a producir sucedáneos de tejidos que puedan restaurar las características estructurales y las funciones fisiológicas de los tejidos naturales *in vivo*.²

Precisamente, uno de los tejidos mas investigados es el cartílago, en especial, el cartílago articular. Varios autores^{3,4} señalan que el cartílago articular tiene una baja capacidad de reparación, debido a su avascularidad y a la muerte de condrocitos. Por tanto, la viabilidad de los condrocitos puede ser uno de los factores críticos que limitan la respuesta de reparación.^{3,5} Varios estudios histológicos demuestran que la muerte de los condrocitos, se presenta en respuesta a las cargas mecánicas.⁶⁻⁸ La muerte celular por diversas causas lleva al deterioro de la matriz extracelular cuyo resultado final es la presencia de osteoartrosis (OA), que además del dolor, conduce a la pérdida del movimiento e inestabilidad articular.⁹

La OA, es causa de dolor y discapacidad, especialmente en personas mayores de 50 años. Se caracteriza por la pérdida de cartílago articular que se acompaña de cierto grado de síntesis de moléculas de la matriz extracelular.^{10,11} Con frecuencia la OA se manifiesta mediante daño enzimático y mecánico de la matriz extracelular, que

lleva a degeneración del cartílago, exposición del hueso subcondral, formación de osteofitos marginales y a la inflamación de la membrana sinovial en la etapa clínica de la enfermedad,¹²⁻¹⁴ (Fig. 1).



Fig. 1. La figura muestra una lesión osteoartrósica a nivel del cóndilo femoral de la rodilla (por artroscopía).¹⁵

A mediados de los años 80, los doctores *Joseph Vacanti* y *Robert Langer*, en Estados Unidos, comenzaron a buscar alternativas que permitieran suplir el déficit de órganos para donaciones. Estos investigadores tuvieron la idea de construir estructuras sintéticas y biodegradables que funcionaran como esqueletos, en donde las células crecieran para conformar un tejido; así constituyeron los fundamentos actuales de la ingeniería tisular.¹⁶ En los últimos años se aprecia un gran impulso a investigaciones en el campo de la ingeniería tisular del cartílago, es así como la Administración Nacional de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, aprobó la utilización de tejido cartilaginoso, creado por ingeniería de tejidos, para ser implantados en rodillas osteoartrósicas.

Actualmente, países como España, Argentina, Chile y México se desarrollan en este campo, la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción en Chile, reporta diferenciación de condrocitos a partir de células de médula ósea,¹⁷ la división de bioingeniería de Laboratorios Craveri en, Argentina y la Unidad de Ingeniería Tisular del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, realizan trasplantes autólogos de condrocitos.^{18,19} Por su parte el Instituto Nacional de Rehabilitación de México cuenta con una línea de investigación en cartílago.²⁰ En Colombia no se están realizando aún trasplantes autólogos de condrocitos pero sí se cuenta con gran interés en este campo. Actualmente el Grupo de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia se realiza el proyecto desarrollo de un *scaffold* (andamio) para la reparación del cartílago articular mediante ingeniería de tejidos²¹ y las universidades colombianas de Los Andes, y la

Nacional, se implementan líneas de investigación que posibiliten avances científicos en el tema.

El presente trabajo pretende realizar una aproximación a la ingeniería tisular del cartílago articular, con el propósito de establecer la fundamentación teórica que permita plantear una línea de investigación en el tema. Esta aproximación permite comprender el comportamiento *in vitro* del cartílago articular a fin de plantear las estrategias a seguir para lograr un equivalente de tejido mediante los procedimientos actuales de la ingeniería tisular, para, dar respuesta *a posteriori*, a la problemática social y de salud pública, que constituye la osteoartrosis como enfermedad degenerativa en Colombia.

La primera parte de este artículo se orientó a realizar una breve revisión acerca de la ingeniería tisular de manera general. Posteriormente se realizó un acercamiento a las técnicas de cultivo celular para condrocitos y finalmente se presentó el trabajo futuro en el área, mediante el planteamiento de una línea de investigación en el tema.

DESARROLLO

La ingeniería tisular

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario surgido en las últimas dos décadas y que reúne diversas áreas como el cultivo de células, la química de polímeros y los trasplantes. Esta área de conocimiento busca proporcionar una nueva solución a la pérdida del tejido, mediante el reemplazo o restauración de tejido o de la función de un órgano, con estructuras que contienen poblaciones específicas de células. La meta fundamental de la ingeniería de tejidos es desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido perdido o lesionado por trauma o enfermedad.²² Estas nuevas tecnologías permiten la sustitución del tejido con daño, por un tejido diseñado y construido para satisfacer las funciones y las necesidades de cada paciente.

El éxito en la reconstrucción de los tejidos, se puede lograr sobre la base de la armonización de las funciones entre las células, los factores estimulantes (entre ellos las moléculas de señalización) y los andamios o constructos, los cuales constituyen la triada fundamental en los procesos de ingeniería tisular. Las interacciones de los factores de crecimiento celular y las funciones celulares, a menudo son dependientes del tiempo y del ciclo de crecimiento celular.²³ La creación de matrices para guiar la regeneración de tejidos, depende de una correcta instrumentación del proceso a diferentes niveles, por ejemplo, el empleo de diversas células, la elección del polímero y el diseño de andamios, acorde con la fisiología del tejido a reconstruir. Estos métodos actualmente se utilizan para guiar la regeneración de diversos tejidos, como el hígado, el intestino, la piel, el cartílago, el hueso y algunas estructuras cardiovasculares.²²

Los conceptos emergentes en el uso de los equivalentes (constructos-células), incluyen la necesidad de desarrollar modelos adecuados del entorno micromecánico de los diferentes tejidos.²² Los amplios descubrimientos de los elementos de regulación de la célula proporcionan nuevas estrategias para la intervención y la creación de tejidos con la recuperación de las funciones perdidas. Al mismo tiempo, los avances en las tecnologías de polímeros y tecnologías de liberación controlada, permiten a las células ser cultivadas en ambientes de cultivo con un adecuado andamio, que puede ser adaptado a las necesidades de cada tipo de célula.²³ De

esta forma se puede decir que la ingeniería de tejido *in vitro* se considera como una de las más promisorias técnicas para el tratamiento de pacientes con daño del cartílago por artrosis, trauma o anomalías congénitas.²⁴

Ingeniería tisular en el cartílago articular

El cartílago articular cubre los extremos de las superficies articulares y actúa como una superficie que transmite las fuerzas al hueso subyacente. El daño de este tejido por diferentes causas es de particular preocupación por su limitada capacidad de auto-reparación.²⁵

Tal como se mencionó, el cartílago tiene un potencial muy pobre para recuperarse de manera espontánea luego de una lesión,^{1,3,4} pues carece de vasos sanguíneos y linfáticos y en él, raramente funcionan los mecanismos habituales de cicatrización, a través de la infiltración o de la migración celular, pues los condrocitos son pocos y se encuentran rodeados por abundante matriz extracelular (MEC).²³

Actualmente, las estrategias para tratar los defectos condrales inflamatorios o traumáticos, con sustitutos biológicos, incluyen: el autoinjerto de tejido condral u osteocondral libre, el uso de trasplante alogénico de cartílago y la aplicación de los condrocitos o células progenitoras de condrocitos en suspensión, o como constructos (andamios) de células-polímero.²² Por ello, es necesario incentivar el desarrollo de investigaciones que redunden en la producción de células, biomateriales y factores de señalización, con estos fines terapéuticos.²⁶

La ingeniería tisular del cartílago emerge como una técnica para la regeneración del tejido dañado, debido a una enfermedad o un trauma. Esta tiene un enorme potencial de aplicación mediante cirugía ortopédica, como una alternativa a los actuales métodos quirúrgicos de reemplazos aloplásticos de la articulación.²⁵ Comúnmente, las estrategias de la ingeniería tisular son la combinación de: andamios (*scaffolds*) que proporcionen un adecuado entorno tridimensional, células apropiadas capaces de diferenciarse y mantener el fenotipo celular específico y la adición de correctas sustancias bioactivas tales como factores de crecimiento, citoquinas u hormonas, como un estímulo conveniente para la diferenciación del linaje específico de cada célula.²⁷⁻²⁸

La ingeniería tisular del cartílago basada en las células, es un prometedor, innovador, y multidisciplinario enfoque que utiliza los principios de la ingeniería y de las ciencias biológicas para la fabricación de sustitutos funcionales para la reparación o la sustitución del cartílago dañado.²⁹ Los principios básicos de la ingeniería de tejidos utilizan una pequeña porción inicial de tejido del donante como una fuente de células (los condrocitos, los fibroblastos y las células madre), las cuales se aíslan y se expanden a un número clínicamente significativo, que posteriormente se siembran en andamios para obtener una forma conveniente o un nuevo tejido, mientras se apoya su crecimiento y diferenciación mediante la adición de apropiados factores bioactivos.²⁵

El concepto de terapias basadas en células para la regeneración del cartílago y la reparación no es nuevo. Los tratamientos más populares para la reparación del cartílago articular incluyen: las microfracturas, la mosaicoplastia, el trasplante de aloinjerto osteocondral y el trasplante autólogo de condrocitos (ACT). Esta última variante se usa desde 1987 e implica la recolección de biopsias pequeñas de cartílago del paciente, de manera mínimamente invasiva, el aislamiento de los condrocitos del tejido del donante, y la expansión de las células *in vitro*. Estas células son luego entregadas en el sitio del defecto del cartílago con la ayuda de un

colgajo de periostio para que, a partir de ellas, se produzca nuevo tejido cartilaginoso (Fig. 2).^{26,30}

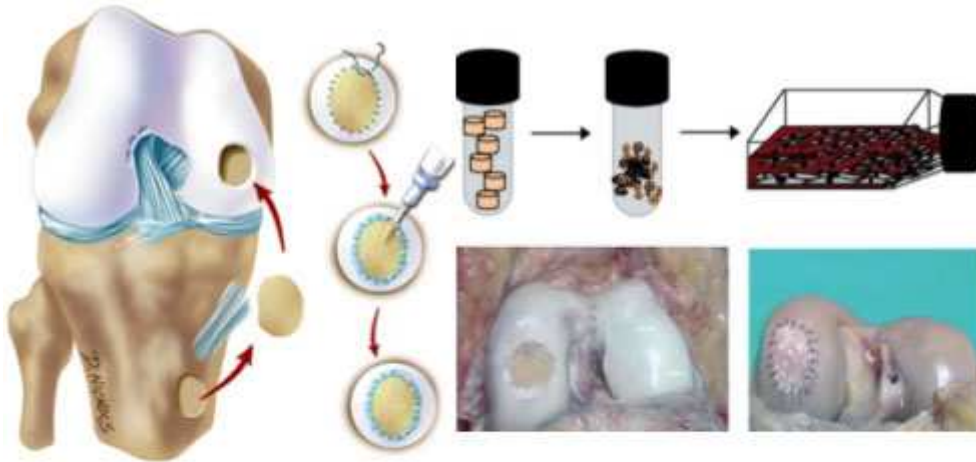


Fig. 2. Procedimiento necesario para realizar el injerto autólogo de condrocitos, que se inicia con la extracción de la muestra y finaliza con la realización del colgajo de periostio. *Kiviranta*³¹ y *Fuentes-Boquetey Cols.*³²

Aunque estas técnicas logran aliviar el dolor y mejorar la función articular, cada una cuenta con desventajas que pueden contraindicar su aplicación clínica.³⁰ Algunas de las dificultades con la utilización de éstas técnicas son: la morbilidad de la zona donante, las complicaciones en los procedimientos quirúrgicos, el riesgo de infección, el rechazo del injerto,²⁶ y el desprendimiento del parche de periostio.³³

Otra de las grandes dificultades que se pueden presentar es que el tejido resultante o reparado carece de la estructura del cartílago nativo y es bioquímica y biomecánicamente inferior al cartílago hialino.²⁶ Por este motivo, las últimas técnicas se centran en la implantación de células progenitoras en andamios biológicos, para optimizar el entorno y que se mantenga el fenotipo de los condrocitos.³⁴ Es por esto que a continuación se revisan los aspectos más relevantes a considerar en la triada de la ingeniería tisular del cartílago.

Células fuente

El primer componente de la triada en ingeniería tisular del cartílago articular, lo constituye la determinación de la fuente óptima de células para la ingeniería de cartílago, sin embargo ésta aun no está determinada. Los condrocitos, los fibroblastos y las células madre se exploran como células fuente, viables para la reparación del cartílago.²⁶

Los condrocitos se presentan como el mejor candidato para la reparación de los defectos del cartílago. Estos se pueden obtener a partir del cartílago articular o nasal.³⁵ Sin embargo, éste es un procedimiento invasivo que proporciona un número limitado de las células. Además, cuando los condrocitos se cultivan en monocapa, tienden a desdiferenciarse y adquieren un fenotipo fibroblástico y dejan de expresar sus principales marcadores (agrecanos y colágeno tipo II).³⁶

Por su parte, la piel presenta una abundante fuente de fibroblastos que pueden ser obtenidos con fines de ingeniería de tejidos. Estos se obtienen fácilmente en grandes cantidades con procedimientos mínimamente invasivos y pueden ser dirigidos hacia un fenotipo condrogénico cuando se cultivan en las condiciones adecuadas.³⁷ Los fibroblastos dérmicos humanos pretratados con factor de crecimiento derivado de la Insulina IGF-1 y cultivados sobre agregados, forman una densa agregación que expresa GAG y colágeno tipo II.³⁸

En este mismo contexto, recientes trabajos se centran en las células madre, las cuales son células pluripotenciales que pueden diferenciarse en múltiples linajes de