

Efecto de TGF- β 1, IGF-1 y OP-1[®] sobre la reparación «in vitro» de lesiones en la zona avascular del menisco rellenos con distintos materiales

Effect of TGF- β 1, IGF-1 and OP-1TM, in an «in vitro» model of avascular meniscal lesions treated with distinct support materials

Laboratorio de Ortopedia Experimental.
Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología.
Clínica Universitaria. Facultad de Medicina.
Universidad de Navarra

Izal Azcárate I.
Ripalda Cemboráin P.
Alberto Acosta Olivo C.
Forriol F.

RESUMEN

Objetivo: analizar la reparación «in vitro» de lesiones cilíndricas de la zona avascular del menisco tratadas con factores de crecimiento y rellenos con diferentes materiales.

Material y métodos: las lesiones fueron rellenas con cilindros de menisco fresco, menisco congelado a -20°C , y con esponjas artificiales de colágeno cultivadas con células de cartilago. Todos los grupos fueron tratados con TGF- β 1, IGF-1 y OP-1[®] y analizados a las 2, 4, 6 y 8 semanas de evolución.

Resultados: el TGF- β 1 y el IGF-1 indujeron puentes parciales de tejido entre la estructura de relleno y los bordes de la lesión, así como la expresión de colágeno de tipo II y la proliferación celular en toda la superficie del menisco. Así mismo, observamos una migración de células desde el propio menisco lesionado hacia las esponjas de colágeno utilizadas, acelerada por la presencia de TGF- β 1 e IGF-1. La migración de células a la esponja no se corresponde con procesos de proliferación. No obtuvimos ningún efecto positivo con la proteína OP-1[®].

Conclusión: la utilización de IGF-1 y TGF- β 1 y relleno de la lesión con cilindros de menisco o matrices de colágeno pueden ser de utilidad para mejorar la respuesta en modelos experimentales de reparación meniscal.

Palabras clave: Menisco, factores de crecimiento, reparación meniscal, colágeno

Izal Azcárate I., Ripalda Cemboráin P, Alberto Acosta Olivo C., Forriol F.
Efecto de TGF- β 1, IGF-1 y OP-1[®] sobre la reparación «in vitro» de lesiones en la zona avascular del menisco rellenos con distintos materiales
Patología del Aparato Locomotor, 2006; 4 (1): 17-24

ABSTRACT

Meniscus is a support tissue formed by fibrocartilage, which function is essential for the correct movement of the knee joint and for the performance of physical activity. Outer part is vascularized, while inner is avascular and in which lesions are commonly produced. It's widely accepted that avascular lesions have the most complicated prognosis, as no regenerative processes are produced in that zone. In our study we have constructed an in vitro model of avascular lesions, by culturing complete menisci fragments, and practising them holes in their inner part. Lesions were filled up with meniscal tissue either fresh or freezeed at -20°C , and with artificial collagen sponges injected with articular cartilage cells. All groups were treated with growth factors TGF- β 1, IGF-1 and OP-1TM, and analyzed at 2, 4, 6 and 8 weeks. Results showed that both TGF- β 1 and IGF-1 did induce the formation of tissue unions between support structure and the borders of the lesion, as well as collagen type II expression and a stimulation of proliferation in cells in the meniscal surface. On the other hand we observed no significant effect by OP-1TM. We also detected a migration process of cells from the lesioned meniscus through collagen sponges used, that was accelerated by the presence of TGF- β 1 and IGF-1. Results point to an effective usage of these growth factors and collagen scaffolds, in the treatment of lesions of the avascular zone of the meniscus.

Key words: Meniscus, growth factors, tissue engineering, collagen

Izal Azcárate I., Ripalda Cemboráin P, Alberto Acosta Olivo C., Forriol F.
Effect of TGF- β 1, IGF-1 and OP-1TM, in an «in vitro» model of avascular meniscal lesions treated with distinct support materials
Patología del Aparato Locomotor, 2006; 4 (1): 17-24

Correspondencia:

F. Forriol
Laboratorio de Ortopedia Experimental
Irunlarrea s/n
31008, Pamplona - Navarra
Tel: 948 42 56 00, Ext. 6403
Fax: 948 42 56 49
E-mail: fforriol@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las roturas longitudinales, no son capaces de repararse en la zona avascular del menisco (1) y a los dos y tres meses, la resistencia mecánica de una lesión meniscal no alcanza el 30% de la resistencia del tejido sano (2-4). Según Stone (5), la reparación meniscal sólo se obtiene en un 10% de todas las roturas meniscales revisadas por artroscopia. Los factores que influyen en el proceso de reparación meniscal son la vascularización, el tamaño de la rotura, su morfología, la asociación con una lesión del ligamento cruzado anterior, el tiempo transcurrido entre la lesión y su reparación y, también, el programa de rehabilitación seguido (6). Además, la respuesta a la curación de una rotura meniscal depende de la localización de la lesión, la perfusión, el índice vascular y la inmovilización. También pueden afectar la disminución de líquido sinovial y el descenso de la nutrición tisular, además de las sollicitaciones articulares (7). Evidentemente, las lesiones periféricas tienen mejor pronóstico por estar en la región vascular del menisco y cuanto más central es una lesión, menor capacidad de respuesta tiene.

Para el tratamiento de las lesiones meniscales se han desarrollado diversas técnicas, como son el desbridamiento, la abrasión sinovial, el coágulo de fibrina, el trefinado, los colgajos sinoviales, la cola de fibrina o el láser, además de las suturas y la fijación con materiales reabsorbibles. Cualquier técnica de reparación meniscal debe aproximar los bordes de la rotura para proteger la reparación de los movimientos articulares que tienden a separarlos (8). En una reparación meniscal deben primar los mismos principios que para la de cualquier otro tejido orgánico, inmovilización con una fijación adecuada, reposo y aporte de sustancias adecuadas, sin olvidar que una meniscectomía, a ser posible parcial, puede ser una solución sencilla y rápida que permite una temprana vuelta a la actividad laboral o deportiva.

Hemos desarrollado un modelo de lesión en la zona avascular del menisco «in vitro», para analizar su posible reparación rellenando la lesión con diferentes tipos de materiales y aportando distintos factores de crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODO

Utilizamos 40 meniscos enteros extraídos de 10 corderos sanos de 3 meses de edad y unos 35 kg de peso. El estudio fue aprobado por la Comisión de Experimentación animal de la Universidad de Navarra.

Para la obtención de los meniscos se sedaron los animales con pentobarbital sódico intravenoso y posteriormente fueron sacrificados, mediante una inyección de 5 meq de cloruro potásico. Se extrajeron los meniscos completos incluyendo la cápsula y la membrana sinovial, en condiciones de esterilidad. Cada menisco fue dividido en dos fragmentos obteniendo un total de 80 fragmentos.

Los meniscos fueron divididos en cinco grupos, de 16 fragmentos cada uno, según el relleno utilizado:

- Grupo 1. Orificios control, sin ningún tipo de relleno.
- Grupo 2. Orificios rellenados con aloinjertos cilíndricos de menisco fresco.
- Grupo 3. Orificios rellenados con aloinjertos de menisco preservados a -20 °C, durante 1 mes.
- Grupo 4. Orificios rellenados con esponjas de colágeno (Kombutek-2, Belkozin®).
- Grupo 5. Orificios rellenados con esponjas de colágeno con 5×10^5 células de cartílago en su interior.

Cultivo de meniscos

Se practicó un orificio en la zona avascular del tercio medio de cada fragmento de menisco, con un sacabocados de 3 mm de diámetro, y se colocaron en placas de 6 pocillos con 10 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo fue DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycinina), hepes, L-cisteína y el tratamiento con el correspondiente factor de crecimiento, a una concentración de 50 ng/mL. A todos los cultivos se les añadió bromodeoxiuridina (BrdU, Sigma®) a una concentración de 10 µg/mL para marcar las células en proliferación. Se realizaron cambios de medio cada 4-5 días.

Los fragmentos de cada grupo fueron procesados a 4 tiempos distintos (2, 4, 6 y 8 semanas).

Cada tiempo incluyó un control y 3 tratamientos consistentes en la adición al medio de cultivo de IGF-1 (PeproTech®), TGF- β 1 (PeproTech®) y OP-1® (Stryker Biotech®) a una concentración de 50 ng/mL.

Cultivo de células derivadas de cartílago

Los meniscos correspondientes al grupo 5 fueron tratados con esponjas de colágeno inoculadas con células de cartílago, extraídas del cartílago femoral distal de los mismos animales. Se extrajeron láminas de cartílago que fueron trituradas, con cuchillas de bisturí estériles, en placas de cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin), L-cisteína y hepes como amortiguador de pH. A continuación se añadió colagenasa y dispasa a una concentración de 0,5 mg/mL cada una y se realizó la digestión del tejido durante 16 horas, a 37 °C.

Tras la digestión, se realizó un filtrado con gasa estéril para eliminar los fragmentos de tejido no digeridos. El resultado fue lavado 3 veces con medio de cultivo fresco, tras lo cual se sembró en frascos de cultivo estériles de 75 cm². Se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂ y se realizaron cambios de medio cada 2-3 días.

Para la siembra en las esponjas de colágeno, las células fueron recogidas utilizando una solución de tripsina/EDTA (Gibco®) y fue determinado su número con el colorante azul tripán (Sigma®). Tras el recuento, fueron precipitadas mediante centrifugación 5×10^5 células por cada esponja de colágeno y orificio, y resuspendidas en 0,5 mL de medio de cultivo, los cuáles fueron introducidos con una jeringa en las esponjas, previamente sumergidas en ácido hialurónico (Hialgan®), durante 24 horas para favorecer la adhesión celular.

Las esponjas fueron mantenidas en placas de 6 pocillos durante 24 horas en medio de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂, y después introducidas en los orificios.

Procesado de las muestras

Transcurrido el tiempo de cultivo correspondiente (2, 4, 6 u 8 semanas), los meniscos fue-

ron fijados en formol, al 4%, tamponado con fosfatos, durante 24 horas y procesados para su análisis histológico e inmunohistoquímico.

Estudio histológico

La deshidratación de las piezas se realizó mediante alcoholes de gradación creciente (70, 80, 96 y 100%), durante 12 horas cada uno y en agitación constante. Posteriormente se introdujeron en xileno durante 4 horas y se incluyeron en parafina. Finalmente, se realizaron cortes de 4 μ m de grosor con un microtomo convencional y se tiñeron con tricrómico de Masson.

Inmunohistoquímica

Se emplearon anticuerpos específicos para S-100 (Sigma®) (en los grupos 4 y 5), BrdU (NeoMarkers®) y colágeno tipo II (Biogénesis®) (en todos los grupos). Tras desparafinar las muestras, mediante su introducción en la estufa a 60 °C, durante 15 minutos, y posterior tratamiento con xilol, durante 15 minutos, se llevaron a alcohol absoluto y se procedió a bloquear la peroxidasa endógena mediante peróxido de hidrógeno (H₂O₂), al 3%, en alcohol metílico, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en total oscuridad. Después, se realizó la hidratación de las piezas mediante alcoholes de gradación decreciente, hasta llegar a agua desionizada. Finalmente las secciones se lavaron con tampón TBS (tris-HCl 0,05 M; NaCl 0,5 M; pH 7,36).

Para visualizar en las muestras el colágeno II, éstas fueron sometidas a un tratamiento enzimático (tripsinización) para facilitar la exposición de los epítopes del antígeno (tripsina 0,1% Merck, CaCl₂ 0,1% en TBS, a 37 °C, durante 1 hora). Para visualizar la BrdU se necesitó un pretratamiento con 4N HCl, 37 °C durante 1 hora, seguido de un tratamiento de tripsinización durante 30 minutos. La visualización de la S-100 no requirió ningún tipo de pretratamiento. Después se realizó un lavado en TBS, y se bloqueó la tinción inespecífica de fondo mediante la incubación con suero normal no inmune de conejo, diluido 20 veces, en TBS, durante 30 minutos.

Los anticuerpos específicos fueron diluidos 20 veces (anti-colágeno tipo II), 50 veces (anti-BrdU) y 500 veces (anti-proteína S-100) e incubados durante la noche a 4°C en una cámara húmeda.

Tras lavar los cortes durante 5 minutos, en TBS, se incubaron con el anticuerpo puente (IgG de cerdo biotinada contra fracción Fc de IgG de conejo, Dako®), diluido 200 veces, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado en TBS, las secciones se incubaron con el complejo avidina-biotina unido a peroxidasa (Dako), durante 30 minutos, a temperatura ambiente y diluido 100 veces.

Se efectuaron dos lavados de 5 minutos cada uno, el primero en TBS y el segundo en tampón TB (tris-HCl 0,05 M, pH 7,36). El producto de la reacción de la peroxidasa se visualizó utilizando una solución de 3,3'-Diaminobencidina tetrahidroclorada (DAB) (Sigma®) 0,3 mg/ml en TB, como cromógeno y peróxido de hidrógeno, 0,005%, como sustrato. Tras un lavado final en TB, se contrastaron con hematoxilina de Harris, durante 10 segundos, y se analizaron en el microscopio óptico.

RESULTADOS

En ninguno de los casos se observó una reparación clara de la lesión, independientemente del tipo de relleno utilizado. No obstante, algunos de los grupos tratados con factores de crecimiento mostraron intentos de unión entre las dos estructuras.

En el grupo control, sin ningún tipo de relleno, no se observaron signos de unión entre los dos bordes de la lesión. El grupo relleno con aloinjertos de cilindros de menisco fresco presentó una gran proximidad entre los bordes de la lesión y el injerto, pero únicamente en el grupo tratado con TGF- β 1 se observaron puentes parciales de tejido entre las dos estructuras, a partir de las 6 semanas. El relleno con menisco congelado a -20 °C presentó resultados similares a los anteriores. En este caso fueron los meniscos tratados con IGF-1 en los que se observaron puentes de unión entre el menisco injertado y los bordes de la lesión, a partir de las 6 semanas de tratamiento. No obstante, el fragmento de menisco congelado mostró una estructura más

desorganizada con pérdida generalizada de tinción. Las esponjas sin contenido celular mostraron fibras teñidas de color rojo y azul y de aspecto laxo. A pesar de que no pudimos asegurar la presencia de uniones entre las dos estructuras con ninguno de los tratamientos con factores de crecimiento, las fibras de la esponja estaban en contacto directo con el borde de la lesión. La inyección de células en la esponja permitió una tinción de las fibras de la misma predominantemente azul, con mayor contenido en colágenos. No se observaron, sin embargo, diferencias entre los distintos tratamientos, mostrando todos un contacto directo entre las fibras de la esponja y el menisco lesionado (Figura 1).

Los grupos de meniscos rellenos con esponjas de colágeno mostraron inmunorreactividad positiva frente al S-100 señalando la presencia de células cartilaginosa, tanto en el grupo in-

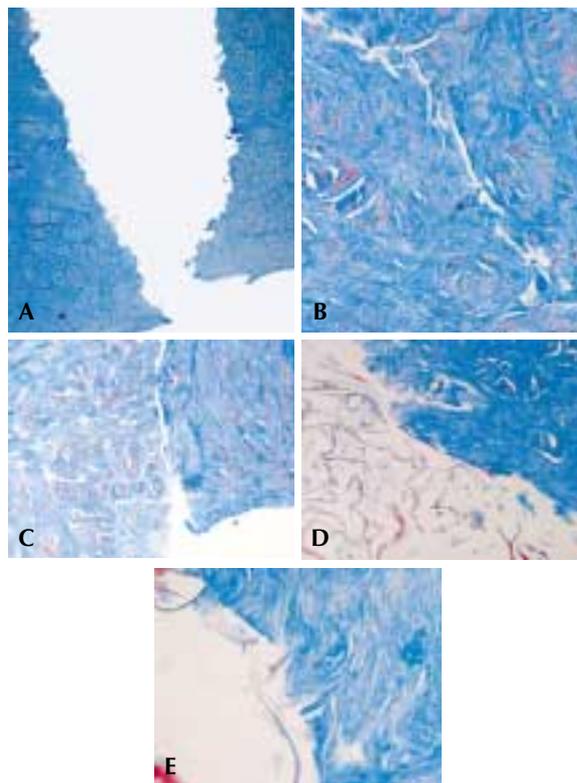


Fig. 1. Orificios teñidos con tricrómico de Masson a las 8 semanas. a) Orificio sin relleno, sin tratamiento ($\times 10$); b) Orificio relleno con aloinjerto de menisco fresco, tratado con TGF- β 1 ($\times 20$); c) Orificio relleno con aloinjerto de menisco congelado a -20 °C, tratado con IGF-1 ($\times 20$); d) Orificio relleno con esponja de colágeno, tratado con TGF- β 1 ($\times 20$); e) Orificio relleno con esponja de colágeno y células, sin tratamiento ($\times 20$).

culado con células como en el grupo sin células, a las 8 semanas de tratamiento. En el grupo con el orificio rellenado con esponjas sin tratamiento (control), se observó la presencia de células inmunorreactivas para S-100 en el interior de la esponja a las 6 semanas de tratamiento, mientras que la adición de TGF- β 1 e IGF-1 al medio de cultivo adelantó la presencia de éstas células a las 4 semanas de tratamiento. La proteína OP-1® no mostró ningún efecto sobre la presencia de células. En el grupo cuyas lesiones fueron rellenadas con esponjas cultivadas con células de cartílago, se observó la presencia de células positivas para S-100, en todo el tiempo de estudio sin encontrar diferencias entre los distintos tratamientos (Figura 2).

La inmunotinción con anticuerpos específicos para colágeno de tipo II reveló resultados negativos en los grupos control y tratados con OP-1®, mientras que la presencia de TGF- β 1 y,

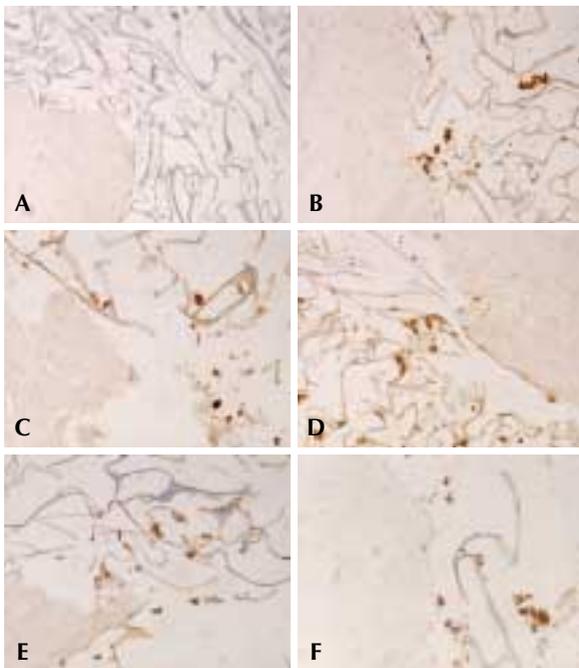


Fig. 2. Imágenes con inmunorreactividad frente anticuerpo anti S-100, a) Orificio rellenado con esponja de colágeno, sin tratamiento, a las 2 semanas ($\times 20$); b) Orificio rellenado con esponja de colágeno y células, sin tratamiento, a las 2 semanas ($\times 20$); c) Orificio rellenado con esponja de colágeno, sin tratamiento, a las 8 semanas ($\times 20$); d) Orificio rellenado con esponja de colágeno, tratado con TGF- β 1, a las 8 semanas ($\times 20$); e) Orificio rellenado con esponja de colágeno, tratado con IGF-1, a las 8 semanas ($\times 20$); f) Orificio rellenado con esponja de colágeno, tratado con OP-1®, a las 8 semanas ($\times 20$).

en menor medida, de IGF-1, aumentaron la inmunorreacción en toda la superficie meniscal (Figura 3).

La inmunohistoquímica específica para BrdU, marcador de proliferación, fue positiva en los grupos sin rellenar y rellenados con injertos de menisco fresco o congelado. La superficie de todo el menisco presentó células en proliferación, que se vio potenciada por la presencia de IGF-1 y TGF- β 1. Ambos elevaron el número de células positivas para BrdU en la superficie y en el interior del menisco. En el grupo rellenado con injerto congelado a -20°C , la IGF-1 aumentó la proliferación celular en el interior del injerto. En el caso de los grupos rellenos con esponjas de colágeno, con o sin células, apenas se apreció inmunorreacción positiva. En los meniscos tratados con IGF-1, se observó la aparición de algún núcleo aislado con tinción positiva. Sin embargo, el aspecto de las preparaciones no reveló células positivas para BrdU. La presencia de células en la esponja, por lo tanto, no se corresponde con células en proliferación (Figura 4).

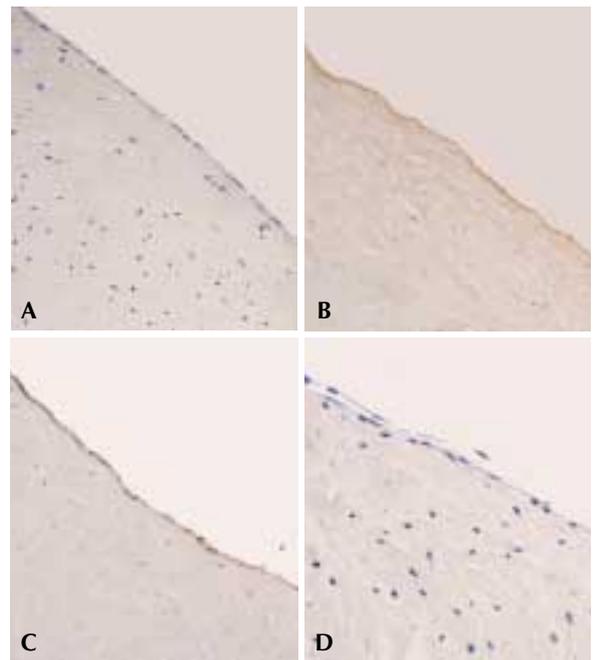


Fig. 3. Inmunorreactividad frente al colágeno tipo II a las 8 semanas de tratamiento, a) Orificio sin relleno, sin tratamiento ($\times 20$); b) Orificio sin relleno, tratado con TGF- β 1 ($\times 20$); c) Orificio rellenado con esponja de colágeno y células, tratado con IGF-1 ($\times 20$) d) Orificio rellenado con aloinjerto de menisco fresco, tratado con OP-1® ($\times 20$).

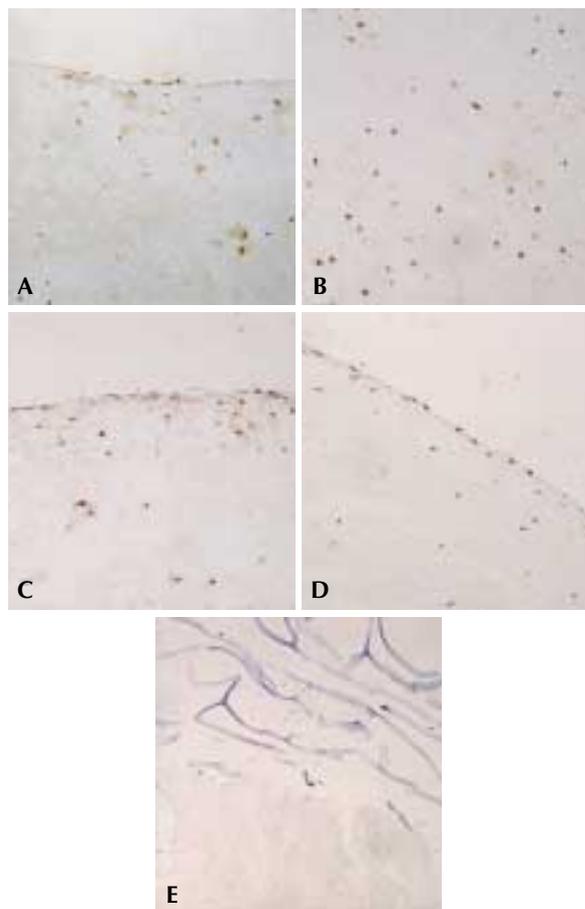


Fig. 4. Marcaje con bromodeoxiuridina a las 8 semanas de evolución, a) Orificio sin relleno, sin tratamiento (x20); b) Orificio relleno con aloinjerto de menisco fresco, tratado con TGF- β 1 (x20); c) Orificio sin relleno, tratado con IGF-1 (x20) d) Orificio relleno con aloinjerto de menisco congelado, tratado con OP-1® (x20); e) Orificio relleno con esponja de colágeno, tratado con IGF-1 (x20).

DISCUSIÓN

La mayoría de las lesiones meniscales se producen en la zona avascular, lo que impide su correcta reparación y les confiere un mal pronóstico (1-5). En este sentido es necesario el desarrollo de estrategias de tratamiento orientadas a regenerar el tejido y no olvidar técnicas sencillas y de fácil recuperación como es la meniscectomía parcial.

La ingeniería tisular abre nuevas vías de actuación. En nuestro trabajo, hemos establecido un modelo experimental que combina la utilización de tratamiento con factores de crecimiento, el relleno de la lesión con distintos ma-

teriales y el implante de células procedentes de cartílago. Si bien, en ninguno de los casos hemos encontrado una reparación total de la lesión, hay indicios, en algunos grupos, de que el tratamiento utilizado es capaz de iniciar procesos celulares que podrían culminar con la regeneración del tejido.

Ghadially et al (2) practicaron roturas en asa de cubo en la zona avascular y en diferentes especies animales (conejos, perros, cerdos y ovejas), sin encontrar reparación a los seis meses, mientras que en el grupo de animales con lesiones en «T», que comunicaban con la periferia meniscal, cicatrizaron a los seis meses.

Webber et al (9-12), llenaron la cirugía meniscal de optimismo al demostrar, en cultivos celulares, que los fibrocondrocitos proliferaban y sintetizaban matriz sin aporte sanguíneo, siempre que se encontrasen en el medio adecuado. Para estos autores el coágulo de fibrina posee las características necesarias para guiar la respuesta meniscal intrínseca. Van Trommel et al (13), trataron con coágulo de fibrina cinco lesiones radiales completas del menisco externo, en la zona poplíteica avascular. Efectuando, a los tres años, un control artroscópico y RMN, comprobaron que todas las lesiones habían curado.

Estos trabajos coinciden con lo publicado por McDevitt (14) quien señaló «in vitro» el crecimiento de las células superficiales del menisco en el interior de una lesión cilíndrica, rellena con cartílago articular. En los estudios de Guisasa et al (3,15,16) también se señala que, en ocasiones, la lesión longitudinal suturada mostraba signos de reparación en el cordero, con una infiltración de células desde la superficie meniscal aprovechando los canales de la sutura para rellenar el defecto. Posiblemente los casos de regeneración coinciden con aquellos puntos donde hay un contacto directo entre los fragmentos. Por ello pensamos que rellenando con una matriz se puede conseguir una estructura uniforme por donde puedan migrar las células de la superficie meniscal y de la sinovial.

El origen de las células reparativas es incierto, pero la existencia temprana de fibroblastos en contacto con el menisco, sugiere una contribución directa de las propias células meniscales o sinoviales (17) que tienen una gran capacidad de diferenciación y son fuente de células pluri-potenciales (18-20).

Nuestros resultados sugieren que la utilización de material de relleno procedente de tejido meniscal puede ser útil combinado con el aporte de factores de crecimiento como TGF- β 1 o IGF-1. Los dos factores de crecimiento aceleraron la migración de células del propio menisco lesionado al interior de las esponjas de colágeno utilizadas como soporte de relleno. Así mismo, indujeron la expresión de colágeno de tipo II y la proliferación celular en toda la superficie del tejido. Sin embargo, tanto el modelo experimental como la solución propuesta requieren mejoras.

Ya se ha demostrado el efecto de varios factores de crecimiento sobre células meniscales en cultivo. La similitud entre este tejido y el cartílago articular permite la utilización del factor de crecimiento IGF-1 que ha sido utilizado para estimular la producción de matriz en la zona avascular del menisco (21). También es capaz de promover la migración de células meniscales (22).

Nuestro trabajo está realizado sobre un modelo de cultivo de menisco completo que comprueba la viabilidad del cultivo de menisco a un tiempo de 8 semanas, a lo largo del cual el tejido conservó su estructura histológica, demostrando tanto para el TGF- β 1 como el IGF-1 una eficacia en el tratamiento de lesiones en la zona avascular.

Por el contrario, la proteína OP-1® (BMP-7) no fue capaz de estimular en ningún caso la migración de células a la esponja, ni la aparición de puentes de tejido entre la estructura de relleno y los bordes de la lesión a pesar de su capacidad para potenciar la expresión de colágeno de tipo II y de agregano por parte de condrocitos, así como de inhibir la presencia de metaloproteasas en la matriz extracelular de cartílago (23-26).

Se han utilizado dos tipos de relleno, material procedente de menisco y material sintético compuesto por esponjas artificiales de colágeno. El relleno procedente de tejido meniscal, resulta idóneo para la reparación de la lesión, no obstante el principal problema sigue siendo la integración del implante con el menisco receptor. Nuestros resultados nos permiten sugerir que el tratamiento con los factores de crecimiento IGF-1 y TGF- β 1 podría potenciar esta integración, si bien sería necesario poner a punto la técnica de administración de los factores.

Las esponjas de colágeno permiten una correcta adhesión de las células, y una buena difusión de nutrientes, sin embargo, presentan el problema de la resistencia mecánica y aunque son un soporte suficiente para las células sembradas en su interior o para las células que migren del propio menisco lesionado, no suplen las funciones de sostén. A este respecto, sería interesante ahondar la investigación en materiales con una consistencia más elevada, capaces de resistir las sollicitaciones mecánicas «in vivo» como el poliuretano de distinto tamaño de poro (27) o el quitosano (28).

En nuestro estudio administramos los factores como aditivos en el medio de cultivo, que fue sustituido cada 4 ó 5 días. La vida media de los factores utilizados en el medio de cultivo podría ser demasiado corta e impediría ejercer efectos más relevantes en las células meniscales. La administración de forma continua o incluso combinando técnicas de terapia génica, capaces de inducir a las propias células del menisco o del implante la expresión del factor de crecimiento, podría elevar la concentración efectiva en el sitio de la lesión, lo que mejoraría las posibilidades terapéuticas de este tipo de tratamientos. Por otra parte, nuestros datos apuntan a un mejor resultado mediante la utilización de menisco fresco como material de relleno, lo cual no deja de ser siempre un inconveniente para la utilización de esta técnica.

AGRADECIMIENTOS

A la FUNDACIÓN MAPFRE MEDICINA, por la financiación de este trabajo y a Stryker Biotech® por el suministro de proteína OP-1®.

BIBLIOGRAFÍA

1. DUART J, RIPALDA P, IZAL I, FORRIOL F. Estimulación de la reparación de las lesiones longitudinales en la zona avascular del menisco. Estudio experimental en corderos. *Patología Aparato Locomotor*. 2004; 2: 189-198.
2. GHADIALLY F, WEDGE H, LALONDE J. Experimental methods of repairing injured menisci. *J Bone Joint Surg (Br)*. 1986; 63-B: 106-110.
3. GUIASOLA I, VAQUERO J, FORRIOL F. Knee immobilization on meniscal healing after suture: an experimental study in sheep. *Clin Orthop*. 2002; 395: 227-233.

4. ROEDDECKER K, MUENNICH U, NAGELSCHMIDT M. Meniscal healing: a biomechanical study. *J Surg Res.* 1994; 56: 20-27.
5. STONE K R. Current and future directions for meniscus repair and replacement. *Clin Orthop.* 1999; 367S: 273-280.
6. BENDER B, SHABAT S, MANN G, OZ H, ADAR E. The double-loop technique for meniscal suture. *Arthroscopy.* 2002; 18: 944-947.
7. BRAY R C, SMITH J A, ENG M K, LEONARD C A, SUTHERLAND C A, SALO P T. Vascular response of the meniscus to injury: effects of immobilization. *J Orthop Res.* 2001; 19: 384-390.
8. RICHARDS D P, BARBER F A, HERBERT M A. Meniscal tear biomechanics: loads across a lateral meniscus tear. *Arthroscopy.* 2003; 19(suppl 2): S70.
9. WEBBER R, YORK J, VANDERSCHILDEN 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.
10. WEBBER R, ZITAGLIO T, HOUGH A. Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response. *J Orthop Res.* 1988; 6: 13-23.
11. WEBBER R J, HARRIS M, HOUGH A J. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferation and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res.* 1985; 3: 36-42.
12. WEBBER R J. In vitro culture of rabbit meniscal tissue. *Clin Orthop.* 1990; 252: 114-120.
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: 360-365.
14. MCDEVITT C, MUKHERJEE S, KAMBIC H, PARKER R. Emerging concepts of the cell biology of the meniscus. *Current Opinión Orthop.* 2002; 13: 345-350.
15. GUIASOLA I, FORRIOL F, VAQUERO J. Fenómenos reparativos en la zona avascular meniscal. *Cuadernos de Artroscopia.* 2000; 7: 9-14.
16. GUIASOLA I, VAQUERO J, FORRIOL F. Influencia de la inmovilización postoperatoria sobre las propiedades mecánicas de la reparación meniscal mediante sutura. Estudio experimental en corderos. *Rev Ortop Traum.* 2001; 45: 61-64.
17. Day B, Mackenzie WG, Shim SS, Leung G. The vascular and nerve supply of the human meniscus. *Arthroscopy* 1985; 1:58-62.
18. ARNOCKY S P, WARREN R F, MCDEVITT C A. Meniscal replacement using a cryopreserved allograft: an experimental study in the dog. *Clin Orthop.* 1990; 252: 121-128.
19. KLEINER J B, AMIEL D, ROUX R D, AKESON W H. Origin of replacement cells for the anterior cruciate ligament autograft. *J Orthop Res.* 1986; 4: 466-474.
20. POTENZA A, HERTE M. The synovial cavity as a «tissue culture in situ»: science or nonsense. *J Hand Surg.* 1982; 7: 196-199.
21. TUMIA N S, JOHNSTONE A J. Regional regenerative potential of meniscal cartilage exposed to recombinant insulin-like growth factor-I in vitro. *J Bone Joint Surg (Br).* 2004; 86-B(7): 1077-1081.
22. BHARGAVA M M, ATTIA E T, MURREL G A, DOLAN M M, WARREN R F, HANNAFIN J A. The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells. *Am J Sports Med.* 1999; 27(5): 636-643.
23. CHEN P, VUKICEVIC S, SAMPATH T K, LUYTEN F P. Bovine articular chondrocytes do not undergo hypertrophy when cultured in the presence of serum and osteogenic protein-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 197: 1253-1259.
24. LIETMAN S, YANAGISHITA M, SAMPATH T K, REDDI A H. Stimulation of proteoglycan synthesis in explants of porcine articular cartilage by recombinant osteogenic protein-1 (BMP-7). *J Bone Joint Surg (Am).* 1997; 79-A: 1132-1137.
25. NISHIDA Y, KNUDSON C B, KUETTNER K E, KNUDSON W. Osteogenic protein-1 promotes the synthesis and retention of extracellular matrix within bovine articular cartilage and chondrocyte cultures. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2000; 8: 127-136.
26. FLECHTENMACHER J, HUCH K, THONAR E J, MOLLENHAUER J A et al. Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 1896-1904.
27. KLOMPMAKER J, JANSEN H W B, VETH R P H, NIELSEN H K L, DE GROOTH J H, PENNINGA A J. Porous implants for knee joint meniscus reconstruction: a preliminary study on the role of pore sizes in ingrowth and differentiation of fibrocartilage. *Clin Mater.* 1993; 14: 1-11.
28. HOEMANN C D, HURTIG M, ROSSOMACHA E, SUN J, CHEVRIER A, SHIVE M S, BUSCHMANN M. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg (Am).* 2005; 87-A: 2671-2686.