

ORIGINAL

Influencia del concentrado de plaquetas sobre la reconstrucción de defectos de cartílago articular en la rodilla de cordero

F. García-Álvarez^{a,*}, T. Castiella^b, S. Val^a, J. Gómez-Arrue^c, J.M. Grasa^d,
A. Viloria^c y E. Gómez-Barrena^e

^aServicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España

^bServicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España

^cÁrea de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

^dServicio de Inmunología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Zaragoza, Campus de Huesca, Huesca, España

^eTraumatología y Cirugía Ortopédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

Recibido el 1 de agosto de 2009; aceptado el 24 de agosto de 2010

PALABRAS CLAVE

Plaquetas;
Defecto articular;
Cartílago;
Rodilla

Resumen

Objetivo: Analizar el efecto de las plaquetas sobre el crecimiento de cartílago en los defectos articulares provocados en la rodilla ovina.

Material y método: Se provocó un defecto de 4 mm de diámetro y 3 mm de profundidad en la tróclea femoral de ambas rodillas en corderos macho de 6 meses de edad. La distribución de los grupos fue: grupo A (n=6): el defecto de la rodilla derecha se rellenó con concentrado de plaquetas 5 min después de ser activado con ClCa. Grupo B (n=6): el defecto se rellenó con colágeno y plaquetas.

Las plaquetas se obtuvieron por centrifugación de 10 ml de sangre arterial obtenida de cada animal antes de la cirugía. En los defectos de la rodilla izquierda no se administraron plaquetas. Las ovejas fueron sacrificadas 10 semanas después de la cirugía. Se realizaron estudios macro y microscópicos.

Resultados: En el grupo A, se observó cartílago hialino en 4 de los defectos de la rodilla derecha a las 10 semanas de la cirugía. Ninguno de los defectos de la rodilla izquierda mostró crecimiento de cartílago hialino. En el grupo B, no se observó cartílago hialino en ningún defecto. No obstante, todos los defectos presentaron mejor celularidad condral y menor fibrosis en los defectos tratados con plaquetas que en los no tratados.

Conclusiones: Esta técnica para la reconstrucción con plaquetas de defectos articulares de oveja ha mostrado en nuestro estudio resultados esperanzadores que empeoran combinadas con un andamiaje de colágeno.

© 2009 SECOT. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fegarcia@comz.org (F. García-Álvarez).

KEYWORDS

Platelets;
Articular defect;
Cartilage;
Knee

Influence of concentrated platelets on the reconstruction of cartilage defects in the lamb knee joint**Abstract**

Objective: To study the influence of platelets on cartilage growth in articular defects in the sheep knee.

Material and methods: Male Rasa Aragonesa sheep (6 months) were operated under general anaesthesia. A 4 mm diameter and 3 mm deep defect was made in the femoral trochlea in both knees. The right knee defect was filled with platelet concentrate 5 min after being activated with ClCa in group A (n=6), and similarly activated platelets + collagen scaffold in group B (n=6). Platelets were obtained by centrifuging 10 ml arterial blood from the sheep prior to the surgical procedure. The left knee defect was not filled. The sheep were sacrificed 10 weeks after surgery. Macroscopic and microscopic studies were performed.

Results: In group A, hyaline cartilage was observed in the right knee defect at the end of the experiment in four cases. None of the defects of the left knees showed hyaline cartilage growth. In group B, hyaline cartilage was not observed in any right knee defect. However, in group B, all sheep showed better chondral cellularity and regeneration and lower fibrosis in the defects treated with platelets than in non-treated ones.

Conclusions: This technique for articular defect reconstruction with platelets has shown satisfactory results in our study. However, collagen scaffolds may decrease this positive effect.

© 2009 SECOT. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El cartílago articular posee escasa capacidad para la autorreparación, por lo que las lesiones no tratadas suelen degenerar en artrosis¹⁻⁵. De hecho, después de lesionarse la superficie articular se suele formar fibrocartílago, el cual posee características biomecánicas inferiores a las del cartílago hialino⁶. Por eso, las lesiones del cartílago articular tienen un mal pronóstico.

Las plaquetas son ricas en factores de crecimiento y han mostrado efectos positivos sobre la diferenciación y proliferación del cartílago *in vitro*⁷⁻¹⁰. El factor BB de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB) promueve la proliferación de condrocitos en matrices de poliglicólico⁸. El factor 2 de crecimiento fibrobástico (FGF2) fomenta la formación de cartílago *in vitro* en partículas de hidroxiapatita con células estromales de la médula ósea humana⁹. Kaps et al¹⁰ vieron que el sobrenadante plaquetario humano estimulaba el crecimiento de condrocitos articulares y del tabique nasal. También se han demostrado efectos positivos sobre la reconstrucción de defectos articulares en algunos modelos experimentales con conejos^{11,12}.

Entre las técnicas para la reparación de defectos articulares destaca la implantación de células autólogas en suspensión o con una gran variedad de matrices como soporte celular. Las matrices aportan una estructura tridimensional que puede ayudar para la reconstrucción articular. Varios autores han empleado matrices de colágeno en los defectos articulares¹³⁻¹⁸. El colágeno tipo I se emplea en la clínica humana y es considerado como un material cito-compatible con sitios de reconocimiento para las integrinas¹⁹. Pound et al²⁰ observaron la síntesis significativa de matriz celular en bioreactores con médula ósea y colágeno tipo I a la vez que un aumento de la proliferación celular. El

colágeno activa a las plaquetas y puede generar un ambiente positivo para la reparación del cartílago. Por todo ello, se planteó como hipótesis de trabajo que el concentrado de plaquetas podría favorecer la reparación de los defectos cartilaginosos creados en la rodilla del cordero. También se consideró la posibilidad de que una matriz de colágeno asociado a las plaquetas pudiera servir de soporte de las mismas.

Material y método

Se emplearon corderos macho (raza aragonesa) de 6 meses de edad. Esta edad corresponde en el cordero a la madurez esquelética. El experimento consistió en crear defectos condrales en ambas rodillas. Las ovejas fueron sacrificadas 10 semanas después de la cirugía. Se realizaron estudios macro y microscópicos.

Todos los experimentos animales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Zaragoza.

Muestras de sangre

Las plaquetas se obtuvieron por centrifugación (1.500 rpm) de 10 ml de sangre arterial (citratada al 10%) obtenida de cada animal, 10 min antes de la cirugía. El número de plaquetas se midió antes y después del centrifugado mediante impedanciometría (ABBOTT® CellDyn 3500R). La media del número de plaquetas previo al centrifugado fue de $84 \times 10^9/l$, y tras la centrifugación fue de $260 \times 10^9/l$, viendo que mediante este procedimiento la concentración de plaquetas se incrementó tres veces. Se obtuvo el sobrenadante plaquetario (3 ml) al que se añadió 1 ml de cloruro cálcico (ClCa 9 mg/ml).

Procedimiento quirúrgico

Se administró 1 gramo de amoxicilina y ácido clavulánico antes de la cirugía y 12 h después. Bajo anestesia general (intramuscular: xilacina 0,1 mg/kg, ketamina 5 mg/kg, buprenorfina 0,01 mg/kg y propofol 6 mg/kg) mediante una incisión de 4 cm parapatelar medial, se provocó un defecto, hasta llegar a hueso subcondral, de 4 mm de diámetro y 3 mm de profundidad en la tróclea femoral de ambas rodillas con un dispositivo metálico especialmente diseñado para el experimento. En el grupo A (n=6) el defecto de la rodilla derecha se llenó con concentrado de plaquetas 5 min después de ser activado con ClCa; en el grupo B (n=6) el defecto se llenó con colágeno tipo I bovino (Hemotese®, Symatese biomatériaux, Chaponost, Francia) que fue mezclado con plaquetas procesadas (estas se inyectaron sobre el colágeno que llenaba el defecto condral) al igual que en el grupo A.

Los defectos de las rodillas izquierdas no fueron tratados con plaquetas, y sirvieron como control.

La cápsula articular y el tejido subcutáneo fueron suturados con ácido poliglicólico 3/0 y la piel con seda del 0. La libre deambulación se permitió tras la cirugía. Las ovejas fueron sacrificadas 10 semanas tras la cirugía mediante una dosis letal de pentobarbital endovenoso (Dolethal®, Vetoquinol S.A., Lure Cedex, Francia).

Estudio histológico

Tras el sacrificio se extrajeron las rodillas y fueron incluidas en formaldehido al 10% durante una semana por lo menos, y decalcificadas con 0,5 M EDTA (pH 7,4) durante dos semanas. Las piezas fueron pasadas por decrecientes gradaciones de etanol, lavadas en solución salina tamponada con fosfato, e incluidas en parafina a 60 °C. Se realizaron cortes con el microtomo de 7 mm de espesor y se almacenaron a 4 °C. Despues, fueron teñidas con hematoxilina-eosina. Las preparaciones se estudiaron al microscopio con ópticas de 10 y 20 aumentos. Las preparaciones fueron evaluadas independientemente por dos de los investigadores. Se aplicó una escala semicuantitativa para la gradación del daño y de los cambios degenerativos²¹ puntuando de 0 a 3. Una puntuación de 0 correspondía a graves daños o cambios degenerativos sin diferenciación de cartílago ni signos proliferativos; 1 punto: cambios degenerativos moderados, ligeros signos de diferenciación y proliferación; 2 puntos: diferenciación cartilaginosa y signos proliferativos sin cartílago hialino; 3 puntos: tejido similar al cartílago normal hialino.

Estadística

La prueba de la U de Mann-Whitney fue empleada para comparar grupos no pareados. La prueba de Wilcoxon se empleó para los grupos pareados. Se consideraron como significativos los valores $p < 0,05$.

Resultados

En el grupo A se observó cartílago hialino llenando el defecto de la rodilla derecha a las 10 semanas de la cirugía

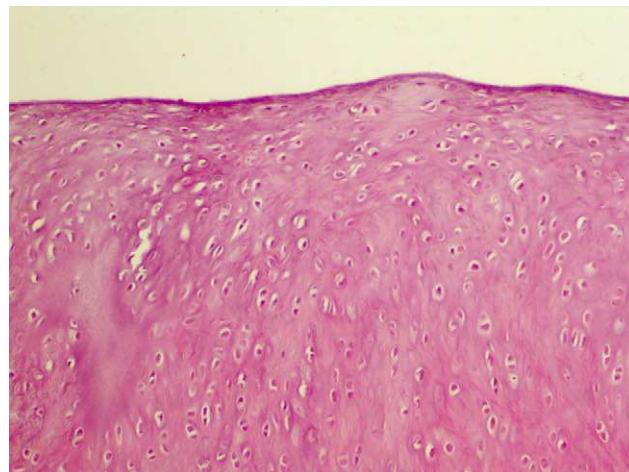


Figura 1 Preparación obtenida a las 10 semanas de la cirugía de un defecto de cartílago tratado con concentrado plaquetario (hematoxilina-eosina, $\times 10$).

Tabla 1 Resultados de la gradación histológica de los defectos condrales a las 10 semanas de la cirugía, según una escala semicuantitativa

Grupo A		Grupo B	
Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda
Plaquetas	No tratados	Plaquetas y colágeno	No tratados
1	0	1	0
2	2	2	1
3	0	1	0
3	0	1	0
3	0	2	0
3	0	2	0

(0 corresponde a graves daños; 1 punto: cambios degenerativos moderados, ligeros signos de diferenciación y proliferación; 2 puntos: diferenciación cartilaginosa y signos proliferativos sin cartílago hialino; 3 puntos: tejido similar al cartílago normal hialino).

(fig. 1) en cuatro casos. Las puntuaciones de la escala semicuantitativa de gradación histológica se presentan en la tabla 1. En dos casos los defectos tratados aparecieron completamente llenos del nuevo tejido, en dos casos la reconstrucción fue irregular cubriendo solo el 75% de la superficie del defecto, en un caso el nuevo tejido resultaba ligeramente excrecente, y en otro caso el nuevo tejido llenó solo el 50% del defecto. En las rodillas izquierdas (defectos no tratados) (fig. 2) los resultados histológicos fueron peores. Las diferencias entre las puntuaciones de las rodillas derechas y las izquierdas fueron significativas ($p=0,034$). Tres de los defectos no tratados presentaron un llenado completo del defecto, uno de los defectos no tratados presentó un llenado cercano al 75%, y dos defectos aparecieron llenados con menos del 50%. No hubo correlación entre la escala semicuantitativa de daño y el mayor o menor llenado del defecto con nuevo tejido en las rodillas derechas o izquierdas.

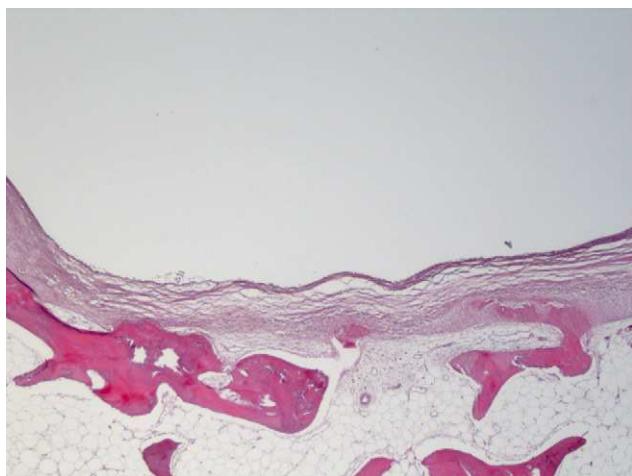


Figura 2 Preparación obtenida a las 10 semanas de la cirugía de un defecto de cartílago no tratado (hematoxilina-eosina, $\times 2$).

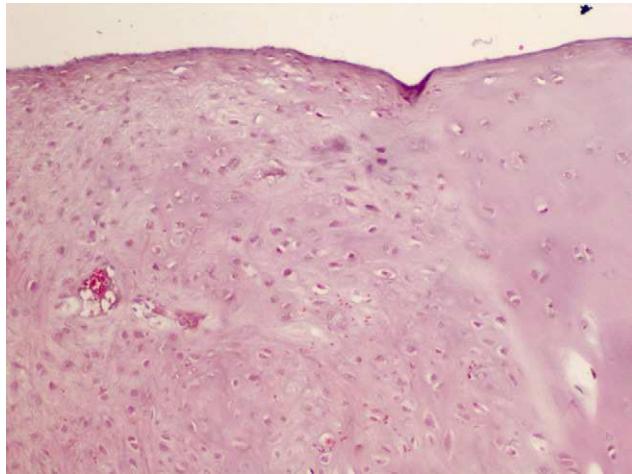


Figura 3 Preparación obtenida a las 10 semanas de la cirugía de un defecto de cartílago tratado con concentrado plaquetario y colágeno tipo I (hematoxilina-eosina $\times 10$).

En el grupo B no encontramos cartílago hialino en los defectos creados. Si bien, los defectos tratados en este grupo presentaron mejores resultados que los controles no tratados. En este grupo todos los defectos tratados con plaquetas y colágeno (fig. 3) presentaron mayor celularidad condral y regeneración y menos fibrosis que los no tratados con plaquetas. Las diferencias entre las puntuaciones de la escala semicuantitativa de gradación histológica (tabla 1) de los defectos tratados y no tratados fueron significativas (grupo B: $p=0,039$). Encontramos diferencias significativas entre las rodillas derechas del grupo A y el B (U-Mann-Whitney $p=0,042$). En el grupo B dos de los defectos tratados presentaron un relleno completo del defecto, dos defectos presentaron cerca del 75%, y dos defectos se llenaron menos del 50%. Tres de los defectos no tratados presentaron un relleno completo del defecto, un defecto presentó cerca del 75%, y dos defectos se llenaron menos del 50%. No encontramos diferencias interobservador con respecto a la gradación histológica.

Discusión

En anteriores trabajos^{11,12} publicamos los efectos positivos de los concentrados plaquetarios sobre la reconstrucción de los defectos articulares en un modelo experimental en conejo. No encontramos en la bibliografía estudios similares en animales no pequeños, por lo que se planteó el presente trabajo con corderos, siendo este un modelo más próximo al humano. En este trabajo hemos observado que el efecto positivo de los concentrados plaquetarios se presenta también en la reconstrucción de defectos cartilaginosos articulares en los corderos. Esto creemos que se debe al efecto positivo de los factores plaquetarios, ya comentados en la introducción, sobre las células de la médula ósea estimulando la formación de tejido condral en el entorno articular.

No se emplearon medios para fijar las plaquetas en el defecto. Las plaquetas activadas con el calcio tienden a formar una masa que queda confinada en la lesión. Es cierto que al no haber un medio de sujeción específico parte puede perderse, pero a pesar de eso el experimento muestra un efecto positivo sobre los defectos tratados con plaquetas. Tras revisar la bibliografía pensamos que el empleo de soportes de colágeno i conjuntamente con los concentrados plaquetarios podría ayudar en la reconstrucción de los defectos articulares. Funayama et al¹⁷ inyectaron condrocitos incluidos en un gel de colágeno II en defectos cartilaginosos en conejos, encontrando que el gel de colágeno II se comportaba como un andamiaje adecuado para el trasplante de condrocitos. Chajra et al¹⁸ compararon el comportamiento de condrocitos bovinos cultivados en matrices de colágeno, uno de ellos fue Hemotese®, el mismo que el empleado en nuestro caso, conteniendo o no hidroxiapatita y glutaraldehido o EDC/NHS, obteniendo un resultado similar de las células en los cuatro tipos de andamiaje empleados. Yates et al¹³ señalaron que las esponjas porosas de colágeno mantienen la viabilidad, forma y actividad de los condrocitos articulares bovinos. Lubiatowski et al¹⁴ observaron en conejos la presencia de cartílago similar al hialino en defectos penetrantes en la estructura subcondral y rellenos con andamiaje de colágeno a las 4 y a las 12 semanas. Por el contrario, Dorotka et al²² encontraron que la implantación de una matriz de colágeno aislada no mejoraba la reparación de los defectos condrales producidos en el cóndilo medial femoral de la oveja. Estos autores²¹ encontraron también que los defectos que no penetraban en el hueso subcondral presentaron la menor cantidad de relleno del defecto, y que la técnica de microfracturas aumentaba la respuesta curativa. Malicev et al¹⁵ emplearon matrices de colágeno tipo I equino con condrocitos articulares humanos. Los preparados con gel de fibrina o plasma humano mostraron mejores resultados que los preparados sin el gel. Los condrocitos implantados directamente en un andamiaje de colágeno presentaron una forma fibroblástica, mientras que aquellos encapsulados en un gel de fibrina se mostraron esféricos. Esto indicaría que el empleo directo de un andamiaje de colágeno no es útil sin un procesado previo de los condrocitos con factores adicionales. La ausencia de procesado celular previo puede haber influido en el resultado negativo del grupo de colágeno en nuestro trabajo. Además, el trabajo de Malicev et al¹⁵ mostraría la compatibilidad de los condrocitos

humanos con matrices de colágeno procedentes de otra especie animal. Cook et al²³ encontraron tejido fibroso y fibrocartílago llenando los defectos osteocondrales provocados en los cóndilos femorales de perros adultos y tratados con 100 mg de implantes de colágeno bovino tipo I derivado de hueso. A pesar de la compatibilidad interespecie en estos trabajos, en nuestro trabajo el uso de un colágeno tipo I bovino en un modelo ovino, podría haber contribuido al resultado negativo del grupo de colágeno.

Se ha demostrado el efecto positivo de las plaquetas para el crecimiento de los condrocitos implantados subcutáneamente en conejos²⁴. Es posible que la presencia del colágeno actúe de barrera entre los factores plaquetarios y las células a estimular.

Nuestro estudio tiene algunas deficiencias. No hemos estudiado otras matrices que pudieran colaborar con el resultado positivo de las plaquetas sobre la reconstrucción de defectos articulares. Realizamos un estudio de los resultados a las 10 semanas, lo cual ha resultado útil para valorar los efectos a medio plazo, sin embargo, creemos que deberían realizarse estudios en períodos más largos de tiempo. Para el presente estudio hemos empleado un modelo experimental en oveja, no siendo por ello extrapolables todas las conclusiones a los humanos.

El concentrado de plaquetas mostró un efecto beneficioso sobre el crecimiento de condrocitos en los defectos articulares en corderos. Sin embargo, los resultados empeoraron cuando empleamos matrices de colágeno tipo I asociados a las plaquetas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, et al. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg [Am]*. 2003;85-A(Suppl 2):45-57.
2. Aston JE, Bentley G. Repair of articular surfaces by allografts of articular and growth-plate cartilage. *J Bone Joint Surg [Br]*. 1986;68-B:29-35.
3. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Engl J Med*. 1994;331:889-95.
4. Hickey DG, Frenkel SR, Di Cesare PE. Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am J Orthop*. 2003;32:70-6.
5. Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg [Am]*. 1997;79-A:1452-63.
6. Briggs TWR, Mahroof S, David LA, Flannelly J, Pringle J, Bayliss M. Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee. *J Bone Joint Surg [Br]*. 2003;85-B:1077-83.
7. Yang SY, Ahn ST, Rhie JW, Lee KY, Choi JH, Lee BJ, et al. Platelet supernatant promotes proliferation of auricular chondrocytes and formation of chondrocyte mass. *Ann Plast Surg*. 2000;44:405-11.
8. Lohmann CH, Schwartz Z, Niederauer GG, Carnes Jr DL, Dean DD, Boyan BD. Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo. *Biomaterials*. 2000;21:49-61.
9. Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9(Suppl A):36-40.
10. Kaps C, Loch A, Haisch A, Smolian H, Burmester GR, Haupl T, et al. Human platelet supernatant promotes proliferation but not differentiation of articular chondrocytes. *Med Biol Eng Comput*. 2002;40:485-90.
11. García-Álvarez F, Castiella T, Grasa JM, Monzón M, Laclérida A, Palanca D. Autologous platelets and articular surface repair in an experimental model. *J Orthop Sci*. 2005;10:237-9.
12. García-Álvarez F, Castiella T, Guallar E, Grasa JM, Laclérida A, Gómez-Barrena E. Influence of platelet time activation on articular cartilage growth in the rabbit knee. preliminary study. *Knee*. 2008;15:314-7.
13. Yates KE, Allemann F, Glowacki J. Phenotypic analysis of bovine chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: effect of serum substitutes. *Cell Tissue Bank*. 2005;6:45-54.
14. Lubiatowski P, Kruczynski J, Grady A, Trzeciak T, Jaroszewski J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc*. 2006;38:320-2.
15. Malicev E, Radosavljevic D, Velikonja NK. Fibrin gel improved the spatial uniformity and phenotype of human chondrocytes seeded on collagen scaffolds. *Biotechnol Bioeng*. 2007;96:364-70.
16. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:226-31.
17. Funayama A, Niki Y, Matsumoto H, Maeno S, Yatabe T, Morioka H, et al. Repair of full-thickness articular cartilage defects using injectable type II collagen gel embedded with cultured chondrocytes in a rabbit model. *J Orthop Sci*. 2008;13:225-32.
18. Chajra H, Rousseau CF, Cortial D, Ronzière MC, Herbage D, Mallein-Gerin F, et al. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. *Biomed Mater Eng*. 2008;18(Suppl 1):33-45.
19. Ushida T, Furukawa K, Toita K, Tateishi T. Three-dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds. *Cell Transplant*. 2002;11:489-94.
20. Pound JC, Green DW, Roach HI, Mann S, Oreffo RO. An ex vivo model for chondrogenesis and osteogenesis. *Biomaterials*. 2007;28:2839-49.
21. Breinan HA, Hsu HP, Spector M. Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines. *Clin Orthop Rel Res*. 2001;391(Suppl):219-30.
22. Dorotka R, Bindreiter U, Macfelda K, Windberger U, Nehrer S. Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13:655-64.
23. Cook SD, Patron LP, Salkeld SL, Rueger DC. Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein-1 (BMP-7) in dogs. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2003;85-A(Suppl 3):116-23.
24. Wu W, Chen F, Liu Y, Ma Q, Mao T. Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: experimental study in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:1951-7.