

Viabilidad celular en un aloinjerto de hueso esponjoso humano criopreservado

R. Sancho-Navarro^a, M. Valera-Perregás^a, J. Farré-Crespo^b, S. Roura^b y A. Bayés-Genís^b

^aServicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

^bLaboratorio de Fisiología Celular. Servicio de Cardiología. Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC). Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Objetivo. Determinar la persistencia de células vivas en injertos óseos criopreservados y su potencialidad biológica.

Material y métodos. Se procesaron diversos fragmentos óseos esponjosos provenientes de un cóndilo femoral crioconservado, de nuestro banco de huesos, utilizado en la cirugía de un recambio de prótesis de cadera. Previo lavado y digestión de los fragmentos, se aislaron células que fueron depositadas en un medio de cultivo α -MEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (GIBCO) y un 1% de penicilina-estreptomina (GIBCO) y cultivadas en condiciones estándar a 37° C y 5% CO₂ en aire enriquecido (BCO) sin suero.

Resultados. Algunas células con aspecto fusiforme se adhirieron al plástico de la placa de cultivo a las 48 horas del procesamiento. Después de 10 días en cultivo, las células empezaron a proliferar rápidamente y a generar colonias. Una vez expandido el cultivo, se procedió al fenotipaje de la población celular aislada. La expresión de los marcadores de superficie analizada mediante citometría de flujo mostró un patrón de expresión similar al obtenido para la población de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana.

Conclusiones. Los aloinjertos óseos criopreservados contienen células viables que pueden corresponder, atendiendo a su estirpe mesenquimal y a su escaso grado de diferenciación morfológica, a precursores de células osteoformadoras.

Palabras clave: aloinjerto, criopreservación, viabilidad celular.

Cell viability in a cryopreserved human cancellous allograft

Purpose. To determine the persistence of living cells in cryopreserved bone grafts as well as their biological potential.

Materials and methods. Several cancellous bone fragments were processed that had been extracted from a bone-bank cryopreserved femoral condyle used in a revision total hip arthroplasty. After fragment lavage and digestion, a group of cells were isolated that were deposited in an α -MEM culture medium supplemented with 10% bovine fetal serum (BFS) (GIBCO) and 1% penicillin-streptomycin (GIBCO) and cultured under standard conditions at serum-free 37° C and 5% CO₂ enriched air (BCO).

Results. Some spindle-like cells bound to the plastic surface of the culture plate at 48 hs from processing. After 10 days' culture, cells quickly started proliferating and generating colonies. Once the culture was expanded, the isolated population of cells was phenotyped. The expression of the surface markers was analyzed by means of flow cytometry and showed an expression pattern similar to that obtained for the population of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow.

Conclusions. Bone cryopreserved allografts contain viable cells that could correspond, on the basis of their mesenchymal lineage and their low degree of morphological differentiation, to osteogenerating cell precursors.

Key words: allograft, cryopreservation, cell viability.

Correspondencia:

R. Sancho Navarro.
Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
C/ Sant Antoni M.^a Claret, 167.
08025 Barcelona.
Correo electrónico: Rsancho@hsp.santpau.es

Recibido: enero de 2006.

Aceptado: diciembre de 2006.

La utilización de injertos óseos esponjosos crioconservados para la reconstrucción de defectos óseos acetabulares con osteólisis secundaria a aflojamiento de artroplastias totales de cadera ha demostrado ser útil para restaurar los defectos óseos.

La incorporación de los injertos óseos es multifactorial y compleja. El grado y patrón de integración conseguido depende del comportamiento biológico del injerto, de las con-

diciones del lecho, especialmente la vascularización, de los requerimientos biomecánicos y la estabilidad entre el injerto y el huésped, y de posibles procesos inmunológicos.

El procesamiento de los aloinjertos (criopreservación) disminuye su inmunogenicidad, pero también su potencial biológico y su capacidad osteogénica al destruir todas las células vivas¹⁻³. Sin embargo, hay hechos que, cuando menos, ponen en duda estas consideraciones.

Diversos estudios clínicos han constatado clínica e histológicamente la integración de aloinjertos criopreservados fragmentados e impactados usados en la cirugía de revisión acetabular. La técnica de Slooff^{4,5} ha demostrado tener buenos resultados utilizando aloinjerto esponjoso crioconservado impactado en el acetábulo y fijando sobre él un implante cementado^{6,7}. Nosotros⁸ hemos publicado excelentes resultados con una técnica semejante utilizando sobre los injertos óseos criopreservados impactados un implante hemisférico atornillado con recubrimiento de hidroxiapatita. El mismo grupo de Nimega⁹ ha demostrado la rápida revascularización del injerto, seguida de resorción y formación de hueso con mínimo injerto primario remanente, en un estudio de 24 especímenes de biopsias de pacientes tratados con la técnica de Slooff, desde los 3 meses a 15 años de evolución.

Es de suponer que la integración es debida a fenómenos de osteoconducción, quedando excluida la osteoinducción y, sobre todo, la osteogénesis. Sin embargo, a la luz de los resultados clínicos, cabe pensar que existen otros fenómenos implicados además de la simple invasión del injerto por los tejidos circundantes. Recientes hallazgos de persistencia de células vivas en aloinjertos criopreservados añaden argumentos a esta discusión^{10,11}.

Este trabajo trata de profundizar en el estudio de la capacidad biológica intrínseca que conserva el aloinjerto criopreservado como el utilizado habitualmente en nuestra práctica clínica.

MATERIAL Y MÉTODO

Las muestras se obtuvieron de un fragmento óseo esponjoso de un cóndilo femoral del banco de huesos de nuestro hospital, durante un recambio de artroplastia total de cadera que requería un injerto óseo criopreservado. Provenían de un donante varón de 61 años, con grupo sanguíneo B y Rh +, cuya extracción se efectuó 3 meses antes de la implantación.

El almacenamiento del tejido óseo siguió los criterios de la *Musculoskeletal Council of the America Association of Tissue Banks (AATB)*¹² y la *European Association of Musculoskeletal Transplantation (EAMST)*¹³. Fue congelado a -80 °C, inmediatamente después de la extracción, en doble envase estéril. Las serologías fueron negativas para IgG anti virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH-1/VIH-2), Ag Australia, IgG anti virus de la hepatitis C (VHC), lues (RPR [*rapid plasma reagin*] y HATP [hemaglutinación de

Treponema pallidum]), anti virus de la leucemia humana T (HTLV I/II), Ag p-24 VIH, IgG anticore virus de la hepatitis B (VHB) y positiva para IgG anti citomegalovirus (CMV).

Los cultivos para el test de contaminación biológica fueron negativos para anaerobios y aerobios. El examen histológico de la muestra ósea en el momento de la extracción dio como resultado un hueso esponjoso de estructura normal.

El fragmento de hueso esponjoso fue fragmentado en pequeños trozos (3 x 3 x 2 mm). Fueron lavados con tampón fosfato salino libre de calcio y magnesio (PBS) y digeridos durante 24 horas a 37 °C, con 1 mg/ml de colagenasa (tipo II, Worthington) en medio de cultivo α -MEM (GIBCO) sin suero.

Las células aisladas fueron recuperadas por centrifugación, resuspendidas en medio completo de cultivo, α -MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (GIBCO) y 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO) y cultivadas en condiciones estándar, a 37 °C y 5% CO₂ en el aire. El medio de cultivo fue cambiado a las 48 horas para seleccionar las células adherentes y posteriormente cada 3-4 días. Cuando las células llegaron al 80% de confluencia fueron tripsinizadas, designadas como cultivo primario (pase 0) y sembradas para su posterior expansión.

Se estudió la expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo. Se lavaron 2 x 10⁵ células con tampón de marcaje (PBS suplementado con 1% BSA y 0,1% azida sódica [Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.]) en tubos FA CS de polipropileno y inmunomarcadas con 10 μ l de anticuerpos conjugados con FITC o PE específicos para CD105 (Serotec, Oxford, Reino Unido), CD166, CD29, CD44, CD90, CD117, CD14, CD34 y CD45 (BD Pharmingen, San Jose, CA, EE. UU.), durante 30 minutos, a temperatura ambiente y a oscuras. Los niveles de expresión de cada marcador fueron comparados con los de los controles isotípicos IgG (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.). Las células fueron analizadas utilizando un citómetro Coulter EPICS XL (Beckman Coulter, Miami, FL, EE. UU.). La recogida de datos fue realizada mediante el programa Expo32 (Beckman Coulter, Miami, FL, EE. UU.). El nivel de expresión de cada marcador (intensidad de fluorescencia) se define como el cociente entre la señal del anticuerpo y la del control de isotipo (1 = no diferencia).

RESULTADOS

Algunas células con aspecto fusiforme se adhirieron al plástico de la placa de cultivo a las 48 horas del procesamiento. Después de 10 días en cultivo, las células empezaron a proliferar rápidamente y a generar colonias de tipo fibroblástico (fig. 1).

Una vez expandido el cultivo, se procedió al fenotipaje de la población celular aislada. La expresión de los marcadores de superficie analizada mediante citometría de flujo

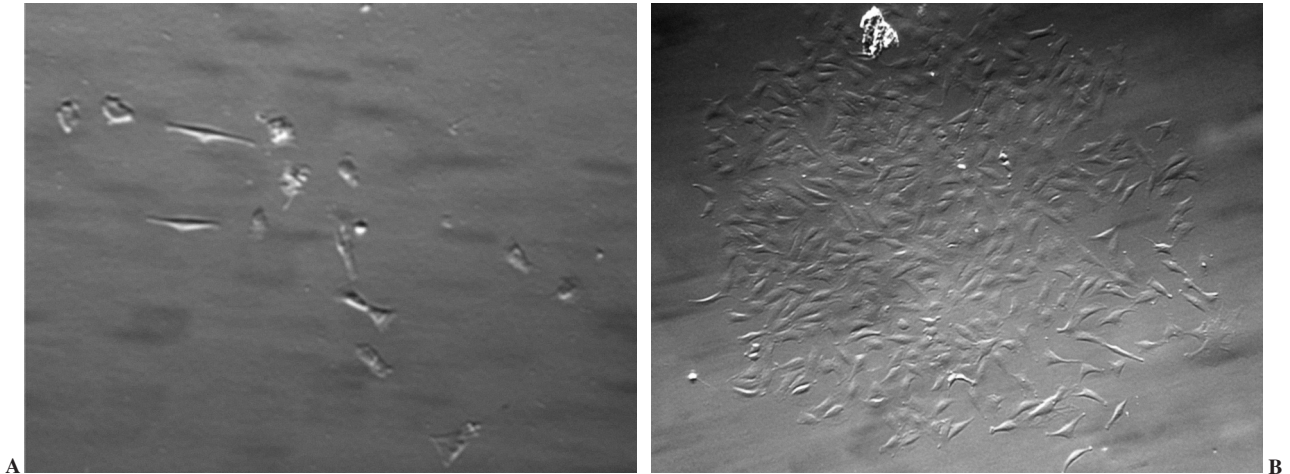


Figura 1. Cultivo primario de las células derivadas del injerto óseo criopreservado. Imágenes representativas que muestran la morfología fusiforme de las células aisladas a los 5 días de cultivo (A), y del aspecto de las colonias a las 2 semanas del cultivo a partir de las células que se adhirieron (B).

fue positiva para CD105, CD44, CD166, CD29 y CD90, y negativa para CD117, CD34, CD45 y CD14 (fig. 2). Este patrón de expresión es similar al obtenido para la población de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana¹⁴ (tabla 1).

DISCUSIÓN

La excelente integración de los injertos óseos esponjosos fragmentados crioconsecuados utilizados en la reconstrucción de defectos acetabulares constatada en nuestra práctica clínica nos hizo pensar si una posible viabilidad celular podía desempeñar un papel en la incorporación y remodelación ósea

Tabla 1. Niveles comparativos de intensidad de fluorescencia de marcadores de superficie expresados por las células de hueso criopreservado y células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana

Antígeno superficie	FBC	BMSC
	(nivel de expresión/ratio)	
CD29	3,8	9,4
CD44	24,7	55,6
CD90	23,5	ND
CD105	2,3	4,2
CD166	10,4	27,8
CD14	1,03	1
CD34	1,7	0,58
CD45	1,0	1,08
CD117	1,1	ND

BMSC: células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana; FBC: células derivadas de hueso congelado; ND: no determinado.

El nivel de expresión de cada marcador corresponde al cociente entre la señal de cada anticuerpo y la de su control isotópico (1 = no diferencia con el control isotópico).

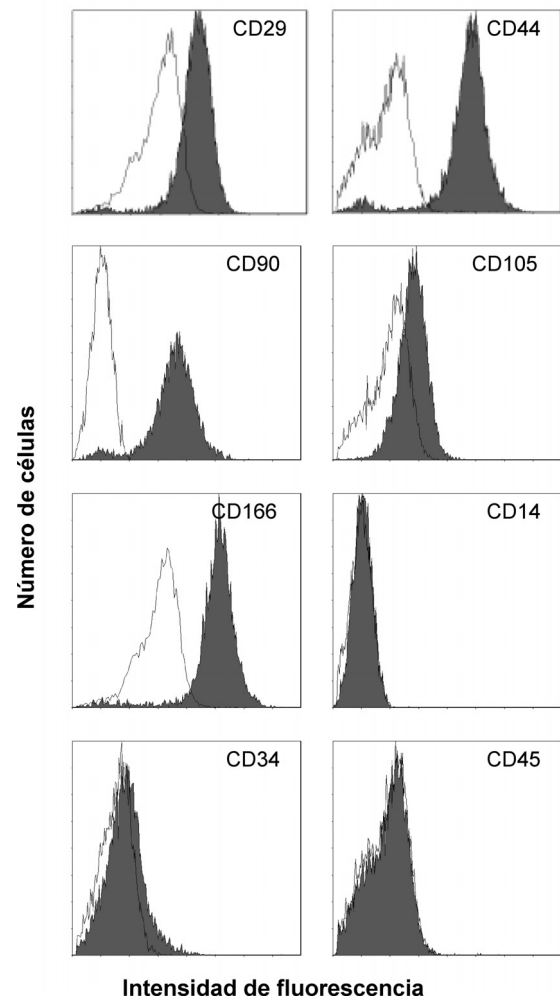


Figura 2. Análisis con citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie de las células derivadas del injerto óseo. Se demuestra la pureza de la población celular aislada mediante el análisis de la distribución de la intensidad de la fluorescencia de los distintos antígenos de superficie estudiados.

del injerto. Para valorarlo procesamos para cultivo fragmentos de hueso esponjoso crioconservado. El cultivo demostró la existencia de células mesenquimales que sobreviven a los protocolos estándar de congelación en los bancos de hueso.

Se pueden utilizar diversas técnicas para la identificación de tipos celulares. Nosotros hemos utilizado la citometría de flujo con detección de fluorescencia. La citometría de flujo permite el análisis individual en miles de células de la expresión de proteínas localizadas en la superficie celular, tales como los marcadores de diferenciación (CD). La identificación por marcadores de diferenciación se basa en la expresión diferencial según el tipo celular¹⁵.

El análisis fenotípico de las células pervivientes en el injerto procesado nos muestra que presentan un patrón de expresión de marcadores similar al de las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea.

En este punto es necesario confirmar si las células aisladas presentan la pluripotencialidad demostrada en las células mesenquimales¹⁶⁻¹⁸, incluida la capacidad osteogénica, y pueden, de este modo, participar activamente en el proceso de remodelado del hueso del receptor en el lugar del injerto.

Hemos encontrado en la literatura otros estudios que demuestran, como el nuestro, la supervivencia de células vivas en el aloinjerto congelado. Weyts et al¹⁰ detectaron células con alelotipaje idéntico al donante en una de las dos muestras de aloinjerto crioconservado procesadas. Estas células se identificaron sólo por su morfotipo como diferenciadas (osteoblastos evolucionados u osteocitos inmaduros) y con escasa capacidad proliferativa. Heyligers y Klein-Nulend¹¹ también detectaron células vivas en injerto crioconservado. La identificación celular se obtuvo por análisis con marcadores de ADN que mostraron idénticos alelos en donante e injerto y mostraron en los cultivos celulares su capacidad osteoblástica expresada por altos niveles de fosfatasa alcalina en el medio de cultivo.

La inmunogenicidad residual del injerto congelado demostrada por Deijkers et al¹⁹ podría ser debida a la persistencia de células vivas. En perros se ha demostrado que la histocompatibilidad mejora la incorporación de los aloinjertos congelados²⁰, sugiriendo que la activación del sistema inmunitario influye negativamente en la osteointegración. En el ser humano no queda clara la influencia de la inmunohistocompatibilidad en el éxito del injerto²¹, aunque Friedlaender et al publicaron que la coincidencia de los antígenos de inmunocompatibilidad mejoraba el éxito clínico²².

La incorporación radiológica de los injertos óseos crioconservados utilizados en técnicas de fragmentación e impactación, como la de Slooff^{4,7,22,23} o la nuestra⁸, podrían corresponderse con una incorporación biológica a la luz de estos hallazgos. Van der Donk et al mostraron, años antes, en 24 biopsias de casos tratados con su técnica, la sustitución del injerto por nuevo hueso lamelar con estructura trabecular y con mínimos restos de injerto⁹, aunque no se pudo determinar el origen de la regeneración (donante o huésped) mediante ADN.

Estos diferentes comportamientos podrían explicarse por la supervivencia ocasional de células en diversos medios, ambientes, situaciones de presión y nutrientes que explicasen su viabilidad y compatibilidad.

En cualquier caso la supervivencia de células vivas en el aloinjerto crioconservado cuestiona las teorías clásicas, hasta hoy aceptadas, de la muerte de las células por rotura de la membrana celular por las bajas temperaturas¹⁻³. Al mismo tiempo, plantea cuestiones relevantes tanto en lo referente a la capacidad regenerativa del injerto como a la inmunogenicidad del injerto y, sobre todo, a la transmisión de infecciones.

Es obvio que es necesario profundizar en estos estudios para determinar la trascendencia e implicaciones de estos hallazgos preliminares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Urist MR. Physiologic basis of bone-graft surgery with especial reference to the theory of induction. *Clin Orthop.* 1953;1: 207-16.
2. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autograft and allograft. *Clin Orthop.* 1987;7:16-20.
3. Schimmel JW, Buma P, Wersleyesen D, Huiskes R, Sloof TJ. Acetabular reconstruction with impacted morselized cancellous allografts in cemented hip arthroplasty: A histological and biomechanical study on the goat. *J Arthroplasty.* 1998; 13:438-48.
4. Sloof TJ, Buma P, Schreus BW, Schimmel JW, Huiskes R, Gardeniers J. Acetabular and femoral reconstruction with impacted graft and cement. *Clin Orthop.* 1996;324:108-15.
5. Sloof TJ, Schimmel JW, Buma P. Cemented fixation with bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 1993;24:667-77.
6. Schreus BW, Sloof TJ, Gardeniers JW, Buma P. Acetabular reconstruction with bone impaction grafting and cemented cup: 20 years' experience. *Clin Orthop.* 2001;386:202-15
7. Biezen Van FC, Have BL, Verhaar JA. Impaction bone-grafting of severely defective femora in revision total hip surgery: 21 hips followed for 41-85 months. *Acta Orthop Scand.* 2000;71:135-42.
8. Sancho R, De Caso J, Valera M, Crusi X. Revisión acetabular en los defectos óseos severos con cótilos esféricos atornillados recubiertos de hidroxiapatita y homoinjertos óseos fragmentados impactados. *Rev Ortop Traumatol.* 2005;49:170-6.
9. Van der Donk S, Buma P, Slooff TJ, Gardeniers J, Schreurs BW. Incorporation of morselized bone grafts: a study of 24 acetabular biopsy specimens. *Clin Orthop.* 2002;396:131-41.
10. Weyts FA, Bos PK, Dinjens WN, van Doorm WJ, van Biezen FC, Weinans H et al. Living cells in 1 o 2 frozen femoral heads. *Acta Orthop Scand.* 2003;74:661-4.
11. Heyligers IC, Klein-Nulend J. Detection of living cells in non processed deep-frozen bone allografts. *Cells and Tissue Banking.* 2005;6:25-31.
12. American association of tissue banks. Standards for tissue banking AATB 1996. Disponible en: www.aatb.org.
13. European association for musculoskeletal transplantation. Common standards for musculoskeletal tissue banking. EAMST. 1997. Disponible en: www.eamst.org
14. Bayes Genis A, Roura S, Soler-Botija C, Farre J, Hove-Madsen L, Llach A, et al. Identification of cardiomyogenic linea-

- ge markers in untreated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Transplant Proc.* 2005;37:4077-9.
15. Bonner WA, Hulet HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum.* 1972;43:404-9.
 16. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Sotomura K, Kerr J, Robey PE. Single-colony derived stains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res.* 1997;12:1335-47.
 17. Friedenstein AJ, Chairlaakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 1998;20: 263-72.
 18. Jian Y, Yahagirdar BN, Reinhardt RL, Keene CD, Ortiz-González XR, Reyes M, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418:41-9.
 19. Deijekers R, Bouma G, van der Meer-Prins E, Huysmans P, Taminiau A, Class F. Human bone allografts can induce T cells with high affinity for donor antigens. *J Bone Joint Surg (Br).* 1999;81-B:538-44.
 20. Goldberg V, Bos K, Heiple K, Zika J, Powell A. Improved acceptance of frozen bone allografts in genetically mismatched dogs by immunosuppression. *J. Bone Joint Surg (Am).* 1984;66A:937-50.
 21. Aho A, Eskola J, Ekfors T, Manner I, Kouri T, Hollmen T. Immune responses and clinical outcome of massive human osteoarticular allografts. *Clin Orthop.* 1998;346:196-206.
 22. Friedlaender G, Strong D, Tomford W, Mankin H. Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am.* 1999;30:583-8.
 23. Buma P, Lamerigts N, Schreus BW, Gardeniers J, Versieyen D, Sloof TJ. Impacted graft incorporation after cemented acetabular revision. Histological evaluation in 8 patients. *Acta Orthop Scand.* 1996;67:536-40.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.