

Cultivo de condrocitos: la caja de Pandora continúa abierta

J. Monfort-Faure

Servicio de Reumatología IMAS. Hospital del Mar y la Esperanza. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España.

Desde que en 1885 Wilhem Roux consiguiera mantener vivo, durante pocos días, un fragmento de embrión de pollo y posteriormente entre 1904 y 1939 Alexis Carrel conservara con éxito, durante años, líneas celulares vivas y evitó su contaminación en ausencia de antibióticos, la comunidad científica ha estado fascinada por la idea de conseguir estudiar las células *ex vivo* tanto desde un punto de vista funcional como estructural¹.

De hecho, como reza en los manuales de biología molecular, el cultivo celular se podría definir como el mantenimiento, proliferación y eventualmente diferenciación de células *in vitro* mediante la utilización de medios artificiales².

“Todas las células son células” como anunciaba Virchow a finales del siglo XIX, es decir, prácticamente todas poseen un común denominador que las hace susceptibles de ser cultivadas. Sin embargo, cada una de ellas posee características propias que hacen de cada tipo de cultivo una experiencia aparte.

El condrocito es una célula embebida en el cartílago, con escasa actividad mitótica y una capacidad de síntesis relativamente baja³. Es la única célula del cartílago adulto y por tanto la responsable de mantener la matriz cartilaginosa en un estado de equilibrio de bajo “*turn-over*”⁴.

Al igual que ocurre con otros tipos celulares, cuando los condrocitos se aíslan y cultivan en monocapa pueden aumentar, de forma notable, su capacidad de síntesis⁵.

Los cultivos de condrocitos humanos y animales han sido modelos extraordinariamente útiles para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la artrosis, y también tienen aplicaciones clínicas especialmente en ingeniería de tejidos y en la terapia génica².

Sin embargo, el cultivo de condrocitos no se halla exento de dificultades, en particular, el primero de los problemas es su tendencia a desdiferenciarse en cultivos en monocapa; en ellos los condrocitos presentan inicial-

mente una forma redondeada y ligeramente poligonal. Desafortunadamente, con el paso del tiempo, su fenotipo cambia progresivamente a una morfología de fibroblasto al realizar diferentes subcultivos⁶.

Los cultivos en monocapa de alta densidad vendrían a paliar parte del problema, dado que son capaces de mantener el fenotipo condrocitario hasta que son subcultivados. Aun así, y a pesar de sus ventajas, los condrocitos presentan en ellos una expresión de colágeno tipo II más lábil que la de agarcano⁷.

El proceso de desdiferenciación es susceptible de ser modulado. Así, es posible acelerarlo al cultivar las células a menor densidad o mediante el uso de IL-1 β o ácido retinoico, de manera que en estas circunstancias los condrocitos adquieren la capacidad de sintetizar colágeno tipo I⁸. Por otro lado, es posible rediferenciar las células mediante cultivos en suspensión, en los cuales los condrocitos recuperan su morfología y aumentan la expresión de proteínas específicas de la matriz cartilaginosa⁹.

Para solucionar los problemas de desdiferenciación se idearon cultivos capaces de mantener el fenotipo, como los cultivos en suspensión en frascos de agitación continua, en *pellets* o en matrices tridimensionales como los geles de colágeno, agarosa¹⁰, alginato o las esponjas de colágeno¹¹. De todos modos, los cultivos mencionados, capaces de mantener el fenotipo, se encuentran con la problemática de un crecimiento celular lento.

La segunda problemática en el cultivo de condrocitos de origen humano consiste en que el origen de la muestra recibida no se puede controlar siempre. Frecuentemente, las muestras de cartílago presentan una enorme variabilidad en sus respuestas y raramente se obtiene un número de células suficiente para realizar las aleatorizaciones de los diferentes procedimientos⁵. Por ejemplo, es un hecho conocido que los condrocitos humanos adultos tienen una menor capacidad de proliferación que los condrocitos procedentes de individuos más jóvenes.

Para resolver este segundo problema, es decir, conseguir suficiente número de células de forma continua que asegure una mayor homogeneización de la muestra, se idearon los cultivos inmortalizados. La inmortalización de condrocitos se realiza mediante antígenos como SV-40 Tag¹², el virus del papiloma humano (HPV-16) o la telomerasa¹³. Se deben aplicar a su vez estrategias que

Correspondencia: Dr. J. Monfort-Faure.
Servicio de Reumatología IMAS. Hospital del Mar.
Passeig Marítim, 25-29. 08003 Barcelona. España.
Correo electrónico: jmonfort@imas.imim.es

Manuscrito recibido el 26-4-2005 y aceptado el 2-5-2005.

mantengan dichos cultivos en alta densidad, con una tasa controlada de crecimiento, debido a que la integración de genes para obtener condrocitos inmortalizados es capaz de modificar el ciclo celular normal y, sin embargo, no es capaz de estabilizar la producción de colágeno tipo II¹⁴.

Expuestos los pros y los contras del cultivo de condrocitos como método para el estudio de la fisiopatología del cartílago, una pregunta surge rápidamente: ¿cuál es la utilidad clínica del cultivo de condrocitos? Al margen de permitir realizar los estudios de funcionalidad y estudiar así los efectos de determinados fármacos en las células, el interés de la comunidad científica se ha centrado, sobre todo, en la posibilidad de reparar el cartílago dañado. La primera de las técnicas utilizadas fue la de intentar reparar el cartílago mediante terapia celular. La técnica consiste en la obtención de una muestra de cartílago sano del mismo individuo, cultivo en monocapa de los condrocitos y posterior implante de dichos condrocitos en la zona de la lesión. Sin embargo, el cartílago articular presenta *in vivo* una estructura compleja, donde el condrocito establece interacciones con otros condrocitos y con la matriz cartilaginosa. Los condrocitos trasplantados no son capaces de reproducir la estructura cartilaginosa original, y dan como resultado un cartílago que remeda estéticamente al cartílago sano pero que desde un punto de vista de resistencia no ofrece suficientes garantías¹⁵.

Para conseguir una estructura más eficiente, la bioingeniería ha diseñado las matrices (*scaffolds*) que sirven de soporte a los condrocitos. Básicamente, pueden dividirse en matrices biodegradables y no degradables. Entre estas últimas cabe destacar los polímeros naturales, que son materiales basados en la triple hélice de colágeno o sintéticos, como el ácido poliláctico (PLA) o poliglicólico (PGA). Los condrocitos se cultivan en el biomaterial y una vez uniformemente distribuidos en su interior se procede al implante de la matriz en el tejido lesionado².

En cabeza de las nuevas terapias se encuentra la regeneración de tejido cartilaginoso a través de *stem cells* o células madre pluripotenciales. De hecho, está bien documentado que la capacidad del cartílago para autorrepararse es mínima, más cuando la zona de tejido dañado es extensa. En general, se utilizan *stem cell* somáticas y entre ellas las más utilizadas son las células madre mesenquimales, es decir los progenitores no hematopoyéticos de la médula ósea adulta.

Estas células tienen un notable potencial condrogénico, así como una facilidad para ser cultivadas y crecer y expandirse en dichos cultivos. Su utilización, al margen de un elevado potencial terapéutico, obviaría la necesidad de extraer del propio paciente zonas de cartílago sano para conseguir una regeneración de la lesión¹⁶.

En un último apartado cabe hacer mención a la terapia génica. Dado que la artrosis afecta a un número limita-

do de articulaciones y se trata de una enfermedad con escaso componente sistémico, constituye un modelo ideal para el uso de la terapia génica intraarticular. El objetivo sería transferir genes que codifiquen moléculas que puedan tener un interés terapéutico en los tejidos intraarticulares. En este sentido, 2 son los tejidos diana de la terapia génica: la sinovial y el cartílago¹⁷.

En el primer caso los genes se pueden transferir a la sinovial, mediante sistemas *in vivo* o *ex vivo*, y para tal propósito se utiliza una amplia variedad de vectores virales y no virales¹⁸. En modelos animales, la terapia génica encaminada a aumentar en la articulación afectada los valores de IGF-1 se ha mostrado efectiva, mientras que los intentos de aumentar los valores de TGF- β presentan resultados contradictorios al tratarse de una molécula cuya sobreexpresión contribuye al desarrollo de la patología artrósica¹⁷. Los estudios en terapia génica que demuestran una elevación de los valores de IL-1RA solos o en combinación con aumentos de IGF-I, son positivos y altamente esperanzadores¹⁷.

En caso de utilizarse como tejido diana el cartílago articular, debe tenerse en cuenta que la densa matriz que rodea a los condrocitos impide una transferencia génica adecuada. La mayoría de las estrategias de transferencia génica en el cartílago, utilizan técnicas *in vitro*, es decir, se obtienen muestras de cartílago sano que una vez cultivadas y transfectadas con el material genético adecuado, se insertarían en las zonas lesionadas¹⁷.

Así pues, aceptando ciertas limitaciones, el cultivo de condrocitos se nos muestra como una técnica útil y atractiva, no sólo porque nos ayuda a comprender la compleja fisiopatología de la artrosis, sino también por sus posibles implicaciones terapéuticas. En cierto modo, el cultivo de condrocitos recuerda al autor a la caja de Pandora, pues al igual que en la mítica caja existían todos los males de la humanidad, en el estudio del cartílago existen problemas e incertidumbres. Sin embargo, Prometeo puso también dentro de la caja la Esperanza y fue precisamente la Esperanza, con sus extrañas artes, la que acabó salvando a la humanidad. Una de las principales esperanzas en el estudio del cartílago es la aplicación clínica derivada del cultivo de condrocitos. Probablemente, igual que en el mito, será esta esperanza la que “salve” a la comunidad científica interesada en la artrosis.

Bibliografía

1. Carrel A. The transplantation of organs: a preliminary communication. 1905. *Yale J Biol Med.* 2001;74:239-41.
2. Maneiro E. Cultivo celular. En: Blanco FJ, Galdo F, editores. Curso de biología molecular para médicos-residentes. A Coruña: SER, Fundación Juan Canalejo, Universidade da Coruña; 2002. p. 26-45.
3. Goldring MB. Chondrocytes. En: Harris EDJ, Ruddy S, Sledge CB, Sargent JS, Budd RC, editors. *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 7th ed. Filadelfia: Elsevier; 2004. p. 50-81.
4. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2000; 275:39027-31.

5. Goldring MB. Human chondrocytes cultures as models of cartilage –specific gene regulation. En: Picot J, editor. Human cell culture protocols, 2th ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2004. p. 69-95.
6. Holtzer J, Abbott J, Lash J, Holtzer A. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. I. Dedifferentiation of cartilage cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1960;46:1533-42.
7. Kolettas E, Buluwela L, Bayliss MT, Muir HI. Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. J Cell Sci. 1995;108:1991-9.
8. Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. J Clin Invest. 1988;82:2026-37.
9. Hauselmann HJ, Hedbom E. In vitro models of cartilage metabolism. En: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, editors. Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism. New York: Academic; 1999. p. 325-38.
10. Guo J, Jourdan GW, McCallum DK. Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. Conn Tiss Res. 1989;19:277-97.
11. Mizuno S, Allemann F, Glowacki J. Effects of medium perfusion on matrix oproduction by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges. J Biomed Mater Res. 2001;56:368-75.
12. Benoit B, Thenet-Gauci S, Hoffschir F, Penformis P, Demignot S, Adolphe M. SV40 large T antigen immortalization of human articular chondrocytes. In Vitro Cell Dev Biol. 1995;31:174-7.
13. Piera-Velázquez S, Jiménez SA, Stokes D. Increased life span of human osteoarthritic chondrocytes by exogenous expression of telomerase. Arthr Rheum. 2002;46:683-93.
14. Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, et al. Interleukin-1 α modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. J Clin Invest. 1994;94:2307-16.
15. Robinson D, Ash H, Yayon A, Nevo Z, Aviezer D. Characteristics of cartilage biopsies used for autologous chondrocytes transplantation. Cell Transplant. 2001;10:203-8.
16. Solchaga LA, Welter JF, Lennon DP, Caplan AI. Generation of pluripotent stem cells and their differentiation to the chondrocytic phenotype. En: Sabatini M, Pastoureau P, De Ceuninck F, editors. Cartilage and Osteoarthritis. Vol I. Cellular and molecular tools. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2004. p. 53-68.
17. Evans CH, Gouze JN, Gouze E, Robbins PD, Ghivizzani SC. Osteoarthritis and gene therapy. Gene Ther. 2004;11:379-89.
18. Oligino TJ, Yao Q, Ghivizzani SC, Robbins P. Vector systems for gene transfer to joints. Clin Orthop. 2000;Suppl 379:S17-30.