

Regeneración de defectos de tendón de Aquiles utilizando fibroblastos dérmicos autólogos

Estudio experimental en conejos

ATILIO MIGUES, GASTÓN SLULLITEL, GABRIEL SOLARI, MARINA CARRASCO y PABLO SOTELANO

Hospital Italiano, Buenos Aires

RESUMEN

Introducción: La ruptura del tendón de Aquiles constituye una de las lesiones más frecuentes que afectan la pierna y el pie. El defecto que genera puede ser de gran magnitud en lesiones masivas e inveteradas. En este contexto, las opciones terapéuticas disponibles incluyen procedimientos reconstructivos complejos con la utilización de injertos autólogos, cuyos resultados son difíciles de predecir.

Por ello, en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas de ingeniería tisular con el objeto de regenerar los defectos del tejido musculoesquelético.

El propósito de este estudio experimental es evaluar el potencial tendinogénico de fibroblastos autólogos obtenidos de la dermis, para reparar defectos del tendón de Aquiles en conejos.

Materiales y métodos: Se utilizó un modelo de defecto tendinoso segmentario en conejos neozelandeses en el cual se colocó una matriz de Hyaff 11 con fibroblastos dérmicos expandidos in vitro contenida por una membrana de colágeno, para regenerar el defecto. Como control se generó el mismo defecto sin procedimientos adicionales.

Los neotendones fueron evaluados desde el punto de vista macroscópico e histológico a las 6 y 12 semanas posoperatorias. Se realizó el mismo procedimiento en el grupo control.

Resultados: En el grupo experimental, se observó macroscópicamente un tejido continuo, de coloración similar al nativo. Desde el punto de vista histológico a las 6 semanas se evidenció una gran proliferación fibroblástica

alrededor de los restos de la matriz de Hyaff 11. A las 12 semanas la celularidad del tejido neoformado fue menor y aumentó la cantidad de fibras colágenas. No se observaron reacciones inflamatorias en los distintos puntos de observación.

Conclusiones: Los resultados de este estudio demuestran el potencial tendinogénico de los fibroblastos autólogos obtenidos de la dermis para reparar defectos del tendón de Aquiles en conejos.

PALABRAS CLAVE: Ruptura del tendón de Aquiles. Cultivo celular. Tendinopatía crónica.

USE OF AUTOLOGOUS DERMAL FIBROBLASTS FOR MASSIVE ACHILLES TENDON RUPTURES. AN EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS

ABSTRACT

Background: Achilles tendon ruptures are one of the most frequent lesions involving foot and ankle. Neglected ruptures can create a massive defect, requiring complex surgical reconstructive procedures, with unpredictable outcomes.

Consequently, in the last years several tissue engineering techniques have been developed to repair and regenerate tendons and ligaments.

The purpose of this experimental study is to evaluate the use of autologous dermal fibroblasts for massive Achilles tendon ruptures.

Methods: An experimental model was used creating an Achilles tendon defect in New Zealand rabbits. This was filled with Hyaff 11 matrix with in Vitro dermal fibroblasts seeded and covered by a collagen matrix. As a control group, we created only the defect in the contralateral limb, without any other procedure.

The tendons were evaluated macroscopically and histologically at 6 and 12 weeks post-op. We performed the same procedure in the control group.

Recibido el 12-5-05. Aceptado luego de la evaluación el 21-6-2005.

Correspondencia:

Dr. GASTÓN SLULLITEL
Potosí 4215
(1199) Buenos Aires
Tel./Fax: 4959-0200
gslullitel@yahoo.com.ar

Results: In the experimental group we observed a continuous tissue similar to the original tendon. At 6 weeks, fibroblast proliferation was observed around the Hyaff 11 matrix histologically. At 12 weeks, we observed a less cellular tissue with more collagen fibers. No signs of inflammatory reactions were seen in any of the observations.

Conclusions: This study supports the use of autologous dermal fibroblasts for massive Achilles tendon ruptures, which may be considered an alternative treatment to regenerate these defects.

KEY WORDS: Achilles tendon rupture. Cell culture. Chronic tendinopathy.

La ruptura del tendón de Aquiles constituye una de las lesiones más frecuentes que afectan la pierna y el pie.⁹ El defecto que genera puede ser de gran magnitud en lesiones masivas e inveteradas.¹² En este contexto, las opciones terapéuticas disponibles incluyen procedimientos reconstructivos complejos con la utilización de injertos autólogos, cuyos resultados son difíciles de predecir.^{4,15}

Por ello, en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas de ingeniería tisular con el objeto de regenerar los defectos del tejido musculoesquelético.^{7,13} Estas técnicas se caracterizan por su potencial de regeneración y reparación de los tejidos dañados por trauma o enfermedades degenerativas.

Existen estudios que informan la regeneración de defectos tendinosos utilizando células progenitoras provenientes de la médula ósea.¹⁶ Sin embargo, la histarquitectura del tejido generado es distinta de la del tejido tendinoso nativo. El uso de tenocitos derivados del tendón rotuliano se describió previamente² y generó un tejido de características mecánicas e histológicas similares a las del tejido original. Este método aumenta la morbilidad global del procedimiento, ya que requiere la obtención del tejido donante a través de una cirugía adicional.

No existen evidencias que determinen el tipo celular ideal para utilizar a fin de regenerar los defectos del tejido musculoesquelético.

El propósito de este estudio experimental es evaluar el potencial tendinogénico de los fibroblastos autólogos obtenidos de la dermis para reparar los defectos del tendón de Aquiles en conejos.

Materiales y métodos

Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité de Ética y Evaluación de Protocolos Experimentales del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Modelo animal

Se utilizaron 10 conejos de raza neozelandesa machos, esqueléticamente maduros. Los animales fueron divididos en dos grupos:

- Grupo experimental: se generó un defecto de 1 cm de longitud en el tendón del gastrocnemio y se colocó luego el bioimplante.
- Grupo control: se generó sólo el defecto de 1 cm de longitud en el tendón del gastrocnemio.

Elaboración y procesamiento del bioimplante

La dermis se obtuvo de la región medial del muslo homolateral. Se extrajo una muestra de 1 cm² que fue mantenida en medio de cultivo D-MEM Low Glucose (Life Technologies, EE.UU.) con 1% de solución antibiótica-antimicótica (Life Technologies) hasta su procesamiento (rango 1 a 4 horas) (Fig. 1).

Se lavó la muestra con D-MEM Low Glucose y una solución de 1% de penicilina-estreptomina. Luego se seccionó en fragmentos de 1 mm², los cuales fueron predigeridos con Dispasa 2% para separar la dermis de la epidermis por una hora.

La dermis se sembró en placas de 60 mm (Corning, EE.UU.) con fibronectina. El medio utilizado fue D-MEM Low Glucose, 10% de suero fetal bovino (Gibco), 50 ug/mL de ácido ascórbico 2 fosfato, 1% solución antibiótico-antimicótico. A los 15 días se despegaron las células utilizando tripsina 0,25%-EDTA 0,01% y se lavaron con solución de Hanks tres veces. Posteriormente se contaron las células con un hemocitómetro y se las sembró sobre matrices de Hyaff 11 (Fidia Advanced Biopolymers, Albano Terme, Italy). Las matrices se cultivaron durante una semana más en D-MEM, 10% de SFB, 100 ug de ácido ascórbico y 1% de solución antibiótica-antimicótica, para luego implantarlas en el defecto (Fig. 2).



Figura 1. Muestra de un centímetro cuadrado de dermis en el medio de transporte.



Figura 2. Aspecto macroscópico de la matriz de Hyaff 11 luego de 7 días de cultivo.

Procedimiento quirúrgico

Los animales fueron anestesiados utilizando inyecciones intramusculares de 70 mg/kg de ketamina HCl (FADA, Argentina) y 10 mg/kg de xilacina (Rompun; Miles, Shawnee Mission, KS, EE.UU.).

Los animales fueron colocados en decúbito ventral, rasurando previamente el miembro inferior derecho. Se realizó un abordaje posterior sobre el tendón de Aquiles. Se aisló el tendón gastrocnemio del plantar y del sóleo. Se generó un defecto de 1 cm de longitud en el tendón gastrocnemio, situado 2 cm a proximal de la inserción calcánea (Fig. 3).

Se realizaron puntos de Kessler modificados con PDS 2,0 (Ethicon, J&J, EE.UU.) manteniendo el defecto de 1 cm de longitud (Fig. 4). En el grupo experimental, se colocó el implante en el defecto y se lo envolvió en una membrana de colágeno bovino (Membracell, Laboratorio Celina, Argentina) de 2 cm por 2 cm, la cual se fijó con puntos separados de PDS 4,0 a los extremos tendinosos (Figs. 5 y 6). Se suturó la piel mediante puntos separados con nailon 3,0 (J&J).

En el grupo control se generó el defecto ya descrito y luego se realizó la sutura de la piel con puntos separados de nailon 3,0.

No se realizó ningún tipo de inmovilización y se permitió que los animales carguen peso en forma inmediata. Los animales fueron alimentados ad libitum.

La eutanasia se realizó a las 6 semanas (n = 5) y 12 semanas (n = 5) posquirúrgicas.

Los neotendones fueron evaluados desde el punto de vista macroscópico e histológico en los períodos descritos. Se realizó el mismo procedimiento en el grupo control.

Evaluación macroscópica: se registraron las siguientes variables: aspecto, coloración, continuidad.

Evaluación histológica, histoquímica e inmunohistoquímica: se realizó la eutanasia de los animales en los períodos descritos. Se efectuó la disección de los tendones completos preservando el área de estudio. Las muestras fueron extraídas en el momento de la muerte y fijadas en formol buffer al 2%. Se deshidrataron utilizando alcoholes crecientes y se las incluyó en bloques de parafina. Se realizaron secciones de 10 micrones utilizando



Figura 3. Imagen intraoperatoria correspondiente al defecto de 1 cm de longitud generado en el tendón de Aquiles.

un micrótopo para luego colorearlas con hematoxilina-eosina a fin de evaluar la morfología y con Picrosirius Red para evaluar la distribución de las fibras colágenas. También se utilizó el método de estreptavidina-biotina para evaluar la presencia de colágeno tipo I. Las secciones histológicas se marcaron con un anticuerpo monoclonal anticolágeno I en una dilución de 1:150 y se las dejó durante 12 horas a temperatura ambiente. Luego se agregaron anticuerpos biotinilados secundarios en una dilución de 1:100 por una hora. El complejo avidina-biotina-enzima (Vector Laboratories, CA) fue administrado por una hora para luego colocar el complejo cromógeno sustrato por 10 minutos.

Resultados

Evaluación macroscópica

Todas las heridas cicatrizaron en forma normal sin evidencias de reacción inflamatoria. En los períodos descritos se realizó la disección de los tendones y se observó en el grupo experimental un tejido continuo de coloración blanco nacarada, similar al tendón nativo (Fig. 7). La superficie del neotendón era irregular observándose continuidad con el tejido nativo. El plano de disección entre el tendón y el tejido circundante resultó menos definido en comparación con el primer abordaje.

En el grupo control se evidenció un tejido de color amarillo, que carecía de continuidad con el tejido nativo, de aspecto irregular con adherencias al tejido circundante.

Evaluación histológica, histoquímica e inmunohistoquímica

A las seis semanas de la operación se encontró en el grupo experimental un número abundante de fibroblastos, el tejido regenerado evidenció bandas de colágeno gruesas y fibroblastos orientados en forma paralela al eje



Figura 4. Imagen intraoperatoria donde se observan los puntos de Kessler que mantienen la longitud del defecto. Por detrás del tendón se identifica la membrana de colágeno que mantendrá la matriz de Hyaff 11 en su sitio.



Figura 5. Imagen intraoperatoria que muestra la matriz de Hyaff 11 en el defecto, antes de que sea envuelta por la membrana de colágeno.

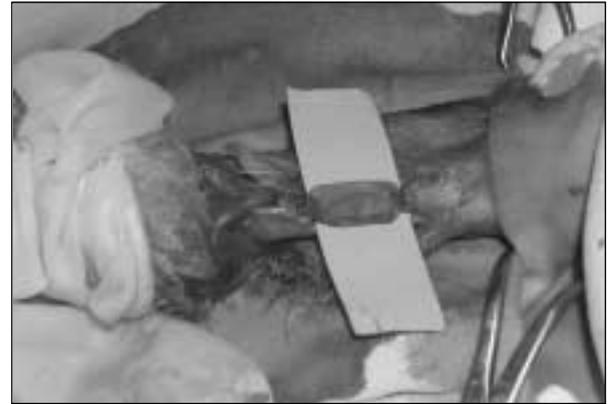


Figura 6. Imagen intraoperatoria que muestra el ensamble final del bioimplante.

de la fuerza. Se observaron restos de la matriz de ácido hialurónico distribuidos de modo irregular. No se notaron signos de reacción inflamatoria alrededor de la matriz de ácido hialurónico (Figs. 8 y 9). A las 12 semanas la histarquitectura del neotendón fue similar a la del tendón nativo. La transición entre el tendón normal y el neotendón evidenció una integración completa en todos los casos evaluados. El número de células en los neotendones fue superior al del tejido tendinoso adyacente. En este punto no se observaron restos de la matriz de ácido hialurónico (Fig. 10). En el grupo control se observó un tejido conectivo con alta celularidad, con gran cantidad de vasos de neoformación.

La tinción con Picosirius Red y su evaluación bajo luz polarizada mostró un patrón más corto en los tendones evaluados, a las 12 semanas y con respecto a los tendones normales. La detección de colágeno I por técnicas inmunohistoquímicas fue positiva desde la semana 6 y en los otros puntos de observación. Las fibras colágenas estaban bien organizadas. En el grupo control las fibras colágenas se encontraron desorganizadas sin ningún patrón de alineación específico.

Discusión

Los resultados de este estudio demuestran el potencial tendinogénico de los fibroblastos autólogos obtenidos de la dermis, para reparar defectos del tendón de Aquiles en conejos.

Las diferentes opciones terapéuticas para el tratamiento de la ruptura del tendón de Aquiles incluyen el tratamiento conservador,¹ la reparación a cielo abierto^{6,12} y la sutura percutánea.¹⁰ Si bien el tratamiento conservador provee una función aceptable, su alto índice de re-ruptura no lo es.⁸ La reparación a cielo abierto constituye el tratamiento más difundido en la actualidad aunque puede asociarse con un número variable de complicaciones co-

mo: trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infecciones y necrosis de la herida.¹² La reparación percutánea surgió como una alternativa intermedia entre el tratamiento quirúrgico y el conservador. La mayoría de los estudios mostraron que presenta una tasa elevada de re-ruptura, como también el atrapamiento del nervio sural que muchas veces exige una nueva operación.³

La reparación de las lesiones tendinosas representa un desafío en la práctica clínica. Cuando los pacientes son tratados quirúrgicamente en la etapa aguda es posible efectuar la sutura terminoteminal del tendón. Sin embargo, más del 20% de los pacientes con ruptura del tendón de Aquiles pueden ser diagnosticados en forma tardía.¹¹ Esto provoca la retracción de los extremos del tendón que altera los aspectos biológicos de la cicatrización tendinosa. A su vez, como sucede en las lesiones masivas, el espacio entre los extremos tendinosos es de una magnitud que no permite su yuxtaposición. En tal contexto es necesario recurrir a la utilización de injertos tendinosos unidos a mallas de Marlex o Dexon.¹⁴ Otras opciones terapéuticas disponibles incluyen procedimientos reconstructivos complejos que utilizan injertos autólogos.^{4,15} Son pocos los tendones que pueden extraerse y utilizarse como injertos sin producir un gran deterioro secundario de la función a nivel del sitio dador. En la mayoría de los casos la falla en la reparación de los defectos tendinosos no se relaciona con una técnica quirúrgica deficiente sino con la falta de un injerto eficaz.

La ingeniería de tejidos es una técnica creada para generar reemplazos de tejido biológico utilizando células autólogas en matrices con alto potencial de crecimiento y baja respuesta inmune. En relación con otros tejidos, como el hueso y el cartílago, la ingeniería de tejidos tendinosa es una técnica poco evaluada. Young y col.¹⁶ evaluaron la utilidad de las células progenitoras de la médula ósea embebidas en un gel de colágeno para reparar defectos de tendones aquilianos en conejos y observaron que el tejido generado presentaba características mecánicas su-

periores a los controles pero era inferior al tejido nativo y no reproducía las características histológicas del tejido normal. En nuestro trabajo la histoarquitectura presentó características similares a las del tejido nativo, aunque con aumento relativo de la celularidad. Las tinciones específicas para el colágeno, como la Picrosirius Red evaluadas bajo luz polarizada, revelaron una orientación paralela a las fibras con respecto al eje de tracción y un alto contenido relativo de colágeno. Las inmunomarcaciones específicas evidenciaron un alto contenido de colágeno tipo I, siendo éste el subtipo específico del tejido maduro.

Las matrices representan otro de los componentes importantes en la ingeniería de tejidos. El biomaterial utilizado en este estudio es el Hyaff 11. Esta matriz suele utilizarse en el tratamiento de defectos de la dermis luego de

quemaduras o defectos traumáticos y se ha demostrado su seguridad y eficacia como soporte para el crecimiento de fibroblastos dérmicos.⁵ Para darle resistencia a la tensión se agregó una malla de colágeno que rodea al tejido. Este material fue eficaz en cuanto al soporte de las células y al desarrollo de reacciones inflamatorias.

El tipo celular por utilizar es otro tema de discusión en la ingeniería de tejidos. Se han utilizado tenocitos y células progenitoras de la médula ósea.^{2,16} Estos presentan como desventaja la morbilidad del sitio dador. En nuestro modelo utilizamos fibroblastos derivados de la dermis como alternativa. Los fibroblastos evidenciaron la capacidad de adherirse a la matriz utilizada y de diferenciarse en tenocitos in vivo.

Desde el punto de vista funcional, resulta importante mantener la longitud del tendón para restituir las pro-



Figura 7. Aspecto macroscópico del neotendón posfijación con formol buffer. Se aprecia la continuidad con el tejido nativo.

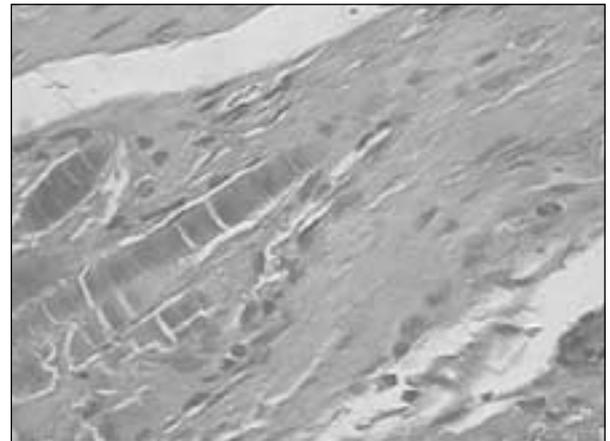


Figura 8. Microfotografía del neotendón a las 6 semanas donde se aprecia un tejido con abundantes fibroblastos alineados en forma paralela al eje de la fuerza. Se observan restos de matriz de Hyaff 11.

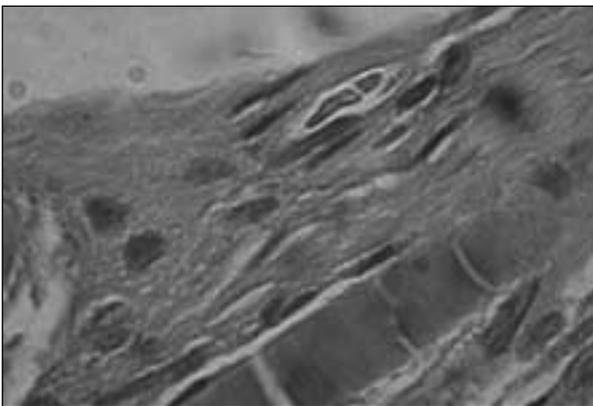


Figura 9. Microfotografía con mayor aumento de un área del preparado anterior donde se aprecian los vasos de neoformación y fibroblastos que repueblan la matriz.

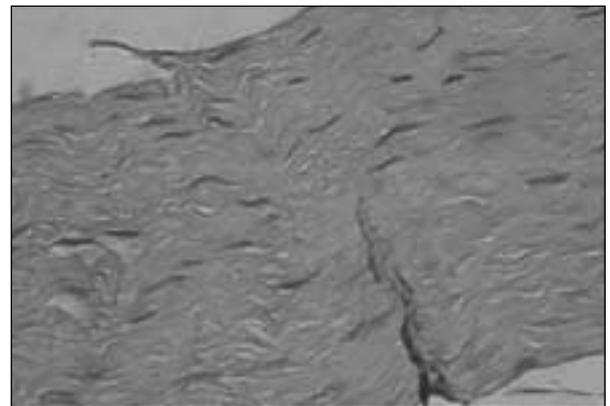


Figura 10. Microfotografía del neotendón a las 12 semanas posoperatorias. Se observa menor celularidad que a las 6 semanas. No es posible detectar restos de matriz.

propiedades mecánicas del sitio anatómico. En este estudio, además de lograr un tejido continuo, observamos que se mantuvo la longitud previa a la generación del defecto.

Si bien la falta de evaluación mecánica del tejido regenerado representa una limitación de este estudio y constituye el paso siguiente en el desarrollo del modelo, se pudo demostrar la utilidad de los fibroblastos derivados de la dermis en la regeneración de defectos del tendón de Aquiles.

Conclusiones

La ingeniería de tejidos desempeña un papel importante en el tratamiento de los defectos tendinosos y ligamentarios con pérdida de sustancia, ya que en esta situación la cicatrización exige restituir la continuidad, que no ocurriría en forma espontánea. Esta técnica podría también aplicarse en la práctica clínica para regenerar defectos masivos de tendones o ligamentos, como en el manguito rotador del hombro o en el ligamento cruzado anterior de la rodilla.

Referencias bibliográficas

1. **Cetti R, Christensen SE, Ejsted R, et al.** Operative versus nonoperative treatment of Achilles tendon rupture. A prospective randomized study and review of the literature. *Am J Sports Med*;21(6):791-799;1993.
2. **Dunn MG, Liesch JB, Tiku ML, et al.** Development of fibroblast-seeded ligament analogs for ACL reconstruction. *J Biomed Mater Res*;29(11):1363-1371;1995.
3. **FitzGibbons RE, Hefferon J, Hill J.** Percutaneous Achilles tendon repair. *Am J Sports Med*;21(5):724-727;1993.
4. **Gabel S, Manoli AII.** Neglected rupture of the Achilles tendon. *Foot Ankle Int*;15(9):512-517;1994.
5. **Galassi G, Brun P, Radice M, et al.** In vitro reconstructed dermis implanted in human wounds: degradation studies of the HA-based supporting scaffold. *Biomaterials*;21(21):2183-2191;2000.
6. **Gillies H, Chalmers J.** The management of fresh ruptures of the tendo Achillis. *J Bone Joint Surg Am*;52(2):337-343;1970.
7. **Goh JC, Ouyang HW, Teoh SH, et al.** Tissue-engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. *Tissue Eng*;9(Suppl 1):S31-44;2003.
8. **Lea RB, Smith L.** Non-surgical treatment of tendo Achillis rupture. *J Bone Joint Surg Am*;54(7):1398-1407;1972.
9. **Leppilahti J, Puranen J, Orava S.** Incidence of Achilles tendon rupture. *Acta Orthop Scand*;67(3):277-279;1996.
10. **Ma GWC, Griffith TG.** Percutaneous repair of acute closed ruptured Achilles tendon: a new technique. *Clin Orthop*; (128):247-255;1977.
11. **Maffulli N.** Clinical tests in sports medicine: more on Achilles tendon. *Br J Sports Med*;30(3):250;1996.
12. **Maffulli N.** Rupture of the Achilles tendon. *J Bone Joint Surg Am*;81(7):1019-1036;1999.
13. **Oakes BW.** Orthopaedic tissue engineering: from laboratory to the clinic. *Med J Aust*;180(Suppl 5):S35-38;2004.
14. **Ozaki J, Fujiki J, Sugimoto K, et al.** Reconstruction of neglected Achilles tendon rupture with Marlex mesh. *Clin Orthop*; (238):204-208;1989.
15. **Wapner KL, Hecht PJ, Mills RHJr.** Reconstruction of neglected Achilles tendon injury. *Orthop Clin North Am*;26(2):249-263;1995.
16. **Young RG, Butler DL, Weber W, et al.** Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*;16(4):406-413;1998.