

**ESTUDIO DEL TRASPLANTE DE ALOINJERTOS OSTEOCONDRALES
CONSERVADOS EN NITRÓGENO LÍQUIDO, A -186°C , CON Y SIN
CRIOPRESERVADOR.
ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CORDEROS.**



**Laboratorio de Ortopedia Experimental
Facultad de Medicina
Universidad de Navarra**

Pamplona, Noviembre 2001

INJERTOS OSTEOCONDRALES. EFECTO DE SU CONSERVACIÓN A -186°C EN NITRÓGENO LÍQUIDO

Las lesiones osteocondrales atraumáticas en las articulaciones de carga son en su mayor parte de etiología desconocida y su reparación es difícil por la condición avascular del cartílago produciendo fibrocartílago, rico en colágeno tipo I, que degenera tarde o temprano. Los procedimientos propuestos actualmente para reparar el cartílago demoran la degeneración pero no la evitan. El empleo de injertos cartilaginosos requiere mejorar los procedimientos de almacenamiento y conservación, siendo necesario el desarrollo de un método de criopreservación efectivo como requisito para el éxito de los trasplantes osteocondrales.

Como modelo experimental utilizamos corderos, de 4 - 6 meses de edad, en 3 grupos, de 6 corderos cada uno, según las condiciones en las que se conservó el injerto. GRUPO I: cilindros conservados a -186°C . GRUPO II: cilindros conservados a -186°C , con DMSO, al 10 %, durante todo el almacenamiento, GRUPO III: cilindros a -186°C impregnados con DMSO al 10%, durante 90 min.

Se expuso la zona condílea de carga del fémur con artrotomía y se colocó el injerto, previamente descongelado, procurando que la porción cartilaginosa del injerto contactase con el cartílago receptor. No se restringió el apoyo y el sacrificio se realizó 5 meses después de la cirugía.

Para la valoración de los resultados se efectuaron un estudio radiológico, estudio histológico, estudio inmunohistoquímico, análisis histomorfométrico, marcaje con fluorocromos y estudio del líquido sinovial.

En nuestro estudio el grupo que mejor conservó la porción cartilaginosa fue el grupo III. Sin embargo, en todos el cartílago articular era sustituido por un fibrocartílago, aunque su grosor y la inmunorreactividad frente a los distintos anticuerpos variaba. También se encontraron diferencias en la cantidad de tejido fibroso y el grado de colapso que se presentaban cada uno de ellos.

El diseño de un instrumental adecuado para la extracción y colocación de los injertos, el cuidado del postoperatorio, aplicando descarga después de la intervención así como el estudio de nuevas técnicas de criopreservación, tal vez a temperaturas menos profundas, representan líneas de investigación pendientes en este campo.

ÍNDICE

Introducción

El cartílago articular	7
La célula cartilaginosa:el condrocito	10
La matriz extracelular	12
Proteoglicanos	14
Glicoproteínas (proteínas no colagénicas)	17
Líquido sinovial	17
Biología del cartílago articular	18
Factores de crecimiento (anabólicos)	19
Interleuquinas (factores catabólicos)	20
Proteasas	20
Inhibidores de las proteasas (TIMPs)	22
Factores de crecimiento en el cartílago articular	22
Criopreservación	24
Las lesiones del cartílago articular	28
Clasificación de los defectos articulares	28

Hipótesis y Objetivos	33
------------------------------	----

Material y Métodos	35
---------------------------	----

Modelo experimental	36
Obtención y proceso de los injertos	36
Fase quirúrgica	38
Sacrificio	41
Estudios realizados	41

Resultados	49
-------------------	----

Estudio radiológico	50
Análisis del aspecto macroscópico de los aloinjertos	50
Análisis histológico	52

Análisis histomorfométrico	57
Inmunohistoquímica	57
Concentración de glicosaminoglicanos (líquido sinovial)	67
Discusión	68
Patofisiología y mecanismos reparativos del cartílago	69
Posibilidades terapéuticas de las lesiones del cartílago articular	73
Injertos osteocondrales	79
Técnica	81
Evolución y futuro	85
Conclusiones	86
Bibliografía	88

INTRODUCCIÓN

Las lesiones osteocondrales son propias de las articulaciones de carga, especialmente de la rodilla y su etiología es desconocida. El cartílago es un tejido con poca capacidad de regeneración que puede presentar lesiones de tipo focal o global (artrosis). Las lesiones de cartílago articular que no llegan al hueso subcondral, sin respuesta inflamatoria, tienen una capacidad de reparación más baja. Por el contrario, las lesiones cartilaginosas profundas pueden experimentar algún grado de reparación al formarse un hematoma con migración de células madre y crecimiento vascular desde el hueso.

La condición de tejido avascular del cartílago, evita la migración celular de los condrocitos vecinos al lugar de la lesión pues los condrocitos, por sí mismos, no poseen capacidad de migración lo que evita que las propias células del tejido puedan reparar la lesión

Es importante distinguir entre reparación y regeneración. Reparación es la resolución de la lesión en el cartílago o el reemplazo del cartílago perdido por proliferación celular y síntesis de una nueva matriz extracelular, desgraciadamente el cartílago reparado no ofrece garantías mecánicas.

El tejido de reparación consiste, básicamente, en colágeno tipo I, característico del fibrocartílago, por lo que su presencia sugiere que el cartílago hialino normal no se desarrolla en los focos de reparación, ya que el fibrocartílago está diseñado para resistir sollicitaciones a tensión, mientras que el cartílago hialino está constituido para soportar sollicitaciones a compresión y cizallamiento lo que permite que las superficies articulares se deslicen suavemente una sobre otra sin lesionarse. Posteriormente, en el proceso reparador aparece colágeno tipo II que puede alcanzar sus valores máximos a los 24 meses. Sin embargo, pasado este tiempo el tejido presenta hendiduras y fibrilaciones, cambios que asemejan a los presentados en la artrosis.

Por su parte, la regeneración es la formación de una superficie articular nueva compuesta por cartílago articular hialino normal.

En este punto han sido mucho los intentos, experimentales ^(32,83) y clínicos, que han buscado la regeneración de la superficie articular, sin que hasta el momento ningún método terapéutico haya conseguido resultados totalmente satisfactorios y es que a pesar de su

apariciencia primitiva, es muy difícil conseguir una reparación tisular del cartílago por las características fisiológicas del tejido.

El cartílago articular

El cartílago articular es un tejido elástico carente de nervios, vasos sanguíneos y vasos linfáticos, localizado en las articulaciones diartrodias y que varía su grosor según las diferentes especies de vertebrados, desde 0,1 mm en el ratón hasta varios milímetros de grosor en el hombre, así como también su densidad celular, la composición de su matriz y, por supuesto, las propiedades mecánicas. Sin embargo, tiene la misma estructura y cumple la misma función en todas las especies ⁽¹⁶⁾.

El cartílago articular reduce la fricción, y ofrece una superficie articular lubricada, que permite que los huesos se deslicen y giren uno sobre otro y actúa como una estructura de soporte de peso, a través del cual las cargas se transfieren y distribuyen en posiciones articulares muy variadas ⁽¹²⁰⁾.

Es un tejido duradero y resistente, sometido a un promedio de 10 millones de ciclos de carga articular por año ⁽¹⁶⁾. Macroscópicamente es blanco, brillante, y firme y se nutre del líquido sinovial, tomando los nutrientes y el oxígeno de éste y liberando los productos de desecho, por un mecanismo de difusión, gracias a las diferencias en los gradientes de presión. Este intercambio se realiza normalmente durante las carga articular, en la cual el cartílago cumple una de sus dos funciones básicas, transmisión de carga y lubricación articular. Este intercambio se ve afectado cuando el módulo de elasticidad del cartílago se altera con la edad ⁽¹⁷⁴⁾ o en las enfermedades degenerativas, como la artrosis ^(76,169).

Comparado con otros tejidos, el cartílago posee una actividad metabólica baja, pero su apariencia homogénea y sencilla contradice una compleja y ordenada estructura con complejas interacciones entre los condrocitos y la matriz celular que mantienen las propiedades del tejido ⁽¹⁶⁾. Las extensiones citoplasmáticas de los condrocitos se proyectan hasta la matriz extracelular para la secreción de macromoléculas y así proteger a los condrocitos de daño mecánico, durante el uso normal de la articulación y ayudando a mantener su forma, viéndose afectada por los gradientes de presión y sustancias como las citoquinas, las interleuquinas, etc. ^(36,47,56,72).

Morfológicamente el cartílago articular se ha dividido en capa superficial, capa de transición media o radial y cartílago calcificado (Fig. 1). En cada una de ellas varían la estructura y composición, el volumen y la forma celular, el diámetro y la orientación de las fibras de colágeno, así como la concentración de proteoglicanos.

La zona superficial a su vez se divide en dos capas, una superficial o “lámina splens”, acelular formada por un manto de finas fibras de colágeno, otra profunda, pobre en proteoglicanos pero con gran concentración de agua.

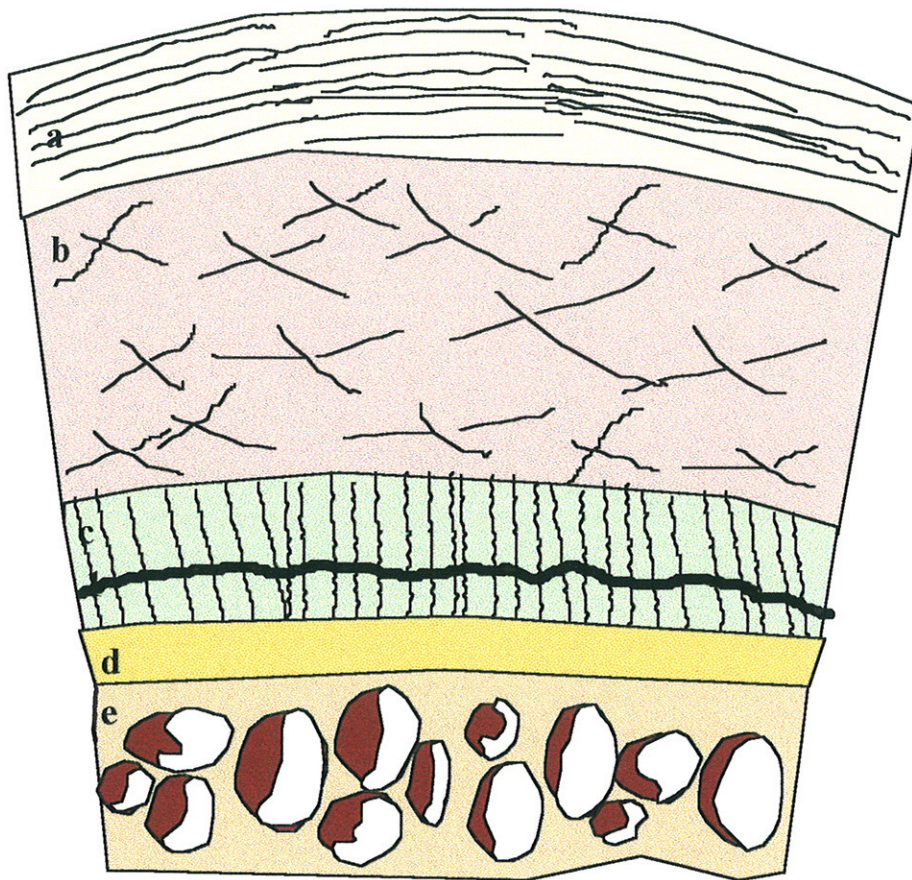


Figura 1. Esquema de las capas del cartílago articular

La zona de transición posee un mayor espesor, presenta fibras de colágeno que adoptan una disposición con ángulos oblicuos y son de mayor diámetro que en la zona superficial, aunque con menor densidad también posee menor concentración de agua que la zona

superficial. La zona media o radial, se caracteriza por contener fibras de colágeno de mayor diámetro, dispuestas de manera radial o perpendicular a la superficie articular, en esta zona la concentración de proteoglicanos es mayor y tiene la concentración de agua más baja.

Con lo que respecta a la zona de cartílago calcificado, es una delgada capa que separa el hueso subcondral de la capa media, esta constituida por condrocitos de pequeño tamaño rodeados por cartílago calcificado.

En las capas superficiales del cartílago varían las fibras de colágeno, se distribuyen paralelamente a la superficie articular lo cual permite al cartílago soportar las sollicitaciones de cizallamiento, y en las capas más profundas se distribuyen a manera de red lo cual provee la resistencia a la compresión y contribuye a la cohesión del tejido atrapando a las grandes moléculas de proteoglicanos. Su concentración en las regiones superficiales del cartílago contienen principalmente los agregados más pequeños mientras que en las regiones profundas contienen ambos tipos de agregados, grandes y pequeños.

En la matriz extracelular del cartílago hialino pueden considerarse tres regiones: 1. Pericelular, que cubre la superficie de la célula, rica en proteoglicanos sulfatados y proteínas no colagénicas, hialuronato ^(115,145) y en colágeno tipo VI que sólo se encuentra en esta parte de la matriz ⁽¹⁴³⁻¹⁴⁴⁾ 2. Territorial o parte de la matriz que rodea a la matriz pericelular de los condrocitos, las fibras colagénicas forman una canasta alrededor de los condrocitos que los protege durante las cargas y las deformaciones. La matriz territorial posee mayor concentración de proteoglicanos ricos en condroitín sulfato ⁽¹⁰⁹⁾ 3. Interterritorial, forma parte del volumen de cartílago articular con las fibras de colágeno de mayor diámetro. En esta zona es mayor la concentración de proteoglicanos ricos en queratán sulfato.

Las dos primeras zonas de la matriz extracelular se encargan de satisfacer las necesidades de los condrocitos, unir las membranas celulares a la matriz que la rodea, proteger a las células del daño originado por las deformaciones y cargas de la articulación y transmitir señales mecánicas a los condrocitos cuando la matriz se deforma con los movimientos articulares. La región interterritorial proporciona las propiedades mecánicas al tejido.

La célula cartilaginosa:el condrocito

El cartílago es un tejido relativamente acelular, sólo un 3-10 % de su volumen está ocupado por células, denominadas condrocitos por lo que el volumen de matriz extracelular que debe ser mantenido metabólicamente por un condrocito es enorme (180 000 mm³ en el cartílago humano adulto).

El único tipo celular presente en el cartílago articular es el condrocito, célula altamente diferenciada y especializada, que deriva de células mesenquimales, se diferencian durante el desarrollo, posee una limitada capacidad de proliferación, con una vida media muy larga ⁽¹²⁰⁾. Su tamaño, forma y probablemente su actividad metabólica varían ligeramente en las diferentes zonas del cartílago, pero todas ellas poseen la estructura necesaria para la síntesis de la matriz extracelular ⁽¹⁶⁾. No es de extrañar que su apariencia simple y redondeada esconda una célula altamente diferenciada con la responsabilidad de construir y mantener el cartílago, además de ser capaces de vivir con tensiones muy bajas de oxígeno, teniendo en las capas más profundas tensiones que llegan al 1 %, comparado con el 24 % de la atmósfera ⁽¹²⁰⁾.

Durante el crecimiento del cartílago, los condrocitos proliferan rápidamente pero la tasa de división celular disminuye con la edad. En el cartílago articular maduro pocos condrocitos presentan signos de actividad mitótica.

Después de una lesión articular, o en la artrosis, algunos condrocitos proliferan, pero esta respuesta es muy limitada y no hay evidencia de que las células emigren a través de la matriz hasta la zona lesionada.

Los condrocitos tienen una capacidad limitada para aumentar la síntesis de la matriz. En el cartílago maduro normal, los condrocitos sintetizan macromoléculas que mantienen la matriz y pueden aumentar su tasa de síntesis en respuesta a una lesión o cambios degenerativos. Sin embargo, esta síntesis no es suficiente para reparar defectos tisulares importantes. Otro factor que afecta al proceso de reparación es la edad, se sabe que la capacidad de síntesis de macromoléculas de los condrocitos se ve alterada con la edad y que las mismas macromoléculas estructurales cambian. Los cambios en los proteoglicanos de la matriz, relacionados con el envejecimiento pueden afectar de manera adversa al

cartilago, y se desconoce si los condrocitos maduros se pueden estimular para producir los agreganos de la matriz extracelular.

A la unidad formada por el condrocito y la matriz que lo rodea se le denomina condrona y constituye la unidad anatómica y mecánica del cartilago. Los condrocitos no tienen contacto entre sí, ni están vinculados al ambiente externo por lo que su nutrición se lleva a cabo con el líquido sinovial que atraviesa una doble barrera, la membrana sinovial y la matriz extracelular ⁽¹⁶⁾. De la misma manera, los nutrientes y productos de desecho atraviesan las mismas barreras y este intercambio se ve favorecido por el efecto osmótico de la matriz extracelular y por el efecto mecánico de la carga.

Todas las señales moleculares, productos de desecho metabólicos, y moléculas sintetizadas deben de ser transportadas por la matriz extracelular. Durante la formación y crecimiento del cartilago articular, la densidad celular es alta y las células alcanzan su nivel metabólico más alto. En el cartilago articular normal del adulto, las células no se dividen pero permanecen metabólicamente activas, llevando a cabo la síntesis y degradación de productos de la matriz, aunque la actividad metabólica del tejido es baja por la baja densidad celular. Aunque los condrocitos pueden remodelar la matriz extracelular tienen limitada la capacidad para reparar el tejido dañado o degenerado.

Para proporcionar un tejido que pueda proveer una función normal de la articulación sinovial, los condrocitos deben sintetizar cantidades y tipos apropiados de macromoléculas para ensamblar una red altamente organizada. El mantenimiento de una superficie articular normal también es tarea de los condrocitos que requiere un recambio constante con las macromoléculas de la matriz extracelular. Por ello, los condrocitos son sensibles a los cambios en la composición de la matriz y a las demandas de carga de la superficie articular ⁽¹⁶⁾. No es de extrañar que la carga y el movimiento articular favorecen el metabolismo del cartilago articular, estimulando la síntesis de las macromoléculas estructurales del cartilago. Como ya se ha comprobado la inmovilización articular prolongada o la falta de carga deterioran la superficie articular, con pérdida de proteoglicanos.

La matriz extracelular

La matriz del cartílago articular es un sistema dinámico que presenta variaciones individuales, en diferentes localizaciones anatómicas y dentro de un mismo individuo entre las diferentes capas del cartílago de una misma articulación.

Consta de dos componentes, el fluido tisular y una red de macromoléculas estructurales, dentro de las cuales se encuentra el colágeno, los proteoglicanos y, en menor medida, lípidos, fosfolípidos, glicoproteínas y otras proteínas que dan forma y estabilidad al tejido.

El agua constituye hasta un 80 % del peso húmedo del cartílago, y su relación con las macromoléculas de la matriz incrementa las propiedades mecánicas del tejido. El fluido tisular contiene gases, pequeñas proteínas, metabolitos y una alta concentración de cationes para contrarrestar la carga negativa de los proteoglicanos. El agua puede moverse libremente del tejido cartilaginoso a la cavidad articular y viceversa. El volumen, la concentración y la cantidad de agua en el tejido dependen, principalmente, de la interacción con los grandes agregados de proteoglicanos que ayudan a mantener el fluido en la matriz y la concentración de electrolitos en el fluido.

Las macromoléculas estructurales del cartílago, son proteínas entre las cuales están el colágeno, los proteoglicanos y las proteínas no colagénicas constituyendo entre un 20 y un 40 % del peso seco del tejido ⁽¹⁶⁾. Las tres clases de moléculas difieren en su concentración dentro del tejido.

La principal proteína estructural es el colágeno que constituye alrededor del 60 % del peso seco del cartílago. Las fibras se disponen en una estrecha malla que contribuye a las fuerzas cohesivas del tejido por atrapamiento mecánico de moléculas de proteoglicanos. El colágeno se encuentra distribuido uniformemente en toda la profundidad del cartílago, excepto en la zona superficial donde es mucho más abundante ⁽¹⁶⁾.

El colágeno es una proteína extracelular que forma una triple hélice (Fig. 2) (Fig. 3) que puede constituir la mayor parte de la longitud de la molécula o puede ser interrumpida por uno o más dominios no helicoidales. La triple hélice está compuesta por tres cadenas polipeptídicas (cadenas α). La composición de aminoácidos de las cadenas incluyen grandes cantidades de glicina y prolina, también contiene hidroxiprolina, hidroxilisina e hidroxilisina glicosilada (galactosil o galactosilglicosil).

En la actualidad se conocen hasta 19 tipos de colágenos, y por lo menos otros diez tienen dominios semejantes al colágeno. En el cartílago articular hay varios tipos de colágeno genéticamente distintos ^(48-49,157,196), siendo el colágeno tipo II el más abundante, constituyendo el 90 % y se encuentra uniformemente distribuido en la matriz cartilaginosa, aunque también contiene los tipos I, V, IX, X y XI.

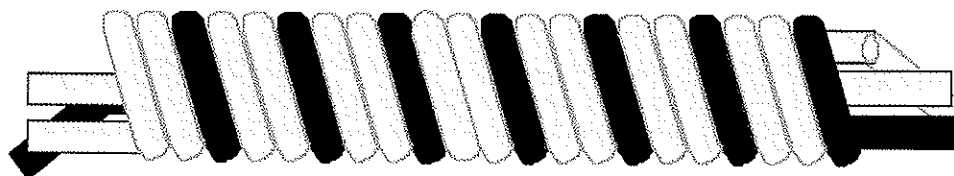


Figura 2. Molécula de tropocolágeno (colágeno tipo I), compuesta de dos cadenas α -1 (gris) y una cadena α -2 (negro)

La proporción de colágeno es máxima en la superficie, donde sufre mayores tensiones por lo que las fibras se colocan paralelas a la superficie articular. La función principal del colágeno es proporcionar al tejido propiedades tensiles e inmovilizar los proteoglicanos en la matriz extracelular.

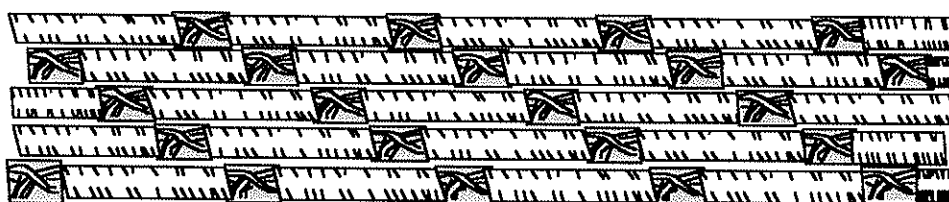


Figura 3. Fibrillas de colágeno con la disposición característica de las moléculas de tropocolágeno ocupando 1/4 de su longitud.

El colágeno tipo II forma el volumen principal de la fibrilla y el tipo XI condiciona el diámetro de las mismas de forma proporcional a la concentración ⁽²⁰⁰⁾ además, se localiza en la condrona en los lugares donde el tipo II alcanza el diámetro mínimo necesario para formar la estructura de la cápsula pericelular ^(146,201). El tipo X interviene en el soporte estructural del cartílago articular por lo que se localiza principalmente entre el cartílago calcificado y el no calcificado, además se relaciona íntimamente con los condrocitos hipertróficos o en fase de degeneración en los procesos patológicos degenerativos ^(46,142). El tipo IX facilita la interacción con las moléculas de proteoglicanos.

Los diferentes tipos de colágeno del cartílago articular varían en su distribución dentro de la matriz extracelular y en su estructura tridimensional. De esta manera, el colágeno tipo II parece distribuirse uniformemente por la matriz extracelular y sus monómeros se alinean cabeza con cola, de forma que se superponen y crean agujeros en la estructura tridimensional del cartílago. Las funciones de los colágenos tipo VI y X son desconocidas, aunque se cree que el tipo VI se localiza en la cápsula pericelular de la condrona, contribuyendo a la unión del condrocito con la matriz pericelular ^(46,142).

Proteoglicanos

Los proteoglicanos y las diversas glicoproteínas y proteínas no colagénicas son macromoléculas complejas que, están formadas por un núcleo protéico con varios dominios globulares al que se unen cadenas de polisacáridos (glicosaminoglicanos).

Los glicosaminoglicanos están formados por una cadena larga, no ramificada de unidades repetidas de polisacáridos. El proteoglicano predominante (80-90 %) del cartílago articular es un gran agregado macromolecular conocido como agrecano por sus propiedades de agregación (con un peso molecular de 100 a 200 millones de D). Están formados por un gran centro protéico que constituye el 5 % de la molécula, al que se adhieren, en el extremo N terminal de la proteína central, cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato, que suponen el 95 % restante de la molécula. Uno de los dominios globulares (G1) tiene la función específica de unión al ácido hialurónico que forma la columna vertebral del agregado que se lleva a cabo por la llamada proteína de unión, formada y sulfatada por los condrocitos para formar un complejo agrecano-ácido hialurónico.

Los principales agrecanos son el condroitín sulfato en sus distintas isoformas, principalmente el condroitin-6-sulfato, el queratán sulfato y el dermatán sulfato.

El hialuronato también es un glicosaminoglicano pero a diferencia de los agrecanos no está sulfatado y carece de la proteína central y no forma proteoglicanos. También existen proteínas de enlace que estabilizan la asociación entre los monómeros y el hialuronato y dirigen la unión de los agregados para anclar los proteoglicanos a la matriz, previniendo su desplazamiento durante la deformación del tejido (Fig. 4).

Las regiones superficiales del cartílago articular contienen agregados de baja velocidad de sedimentación mientras que las regiones más profundas contienen ambos tipos de

agregados. La pérdida de agregados se asocia al envejecimiento, a la artrosis y a la inmovilización articular ^(14,140) y queda reflejada en el líquido sinovial. La determinación de estos agregados en el líquido sinovial con técnicas de cromatografía constituye un método diagnóstico para los procesos degenerativos incipientes teniendo en cuenta que el líquido sinovial de las articulaciones, se encuentra en constante recambio a través de los vasos linfáticos de la membrana sinovial.

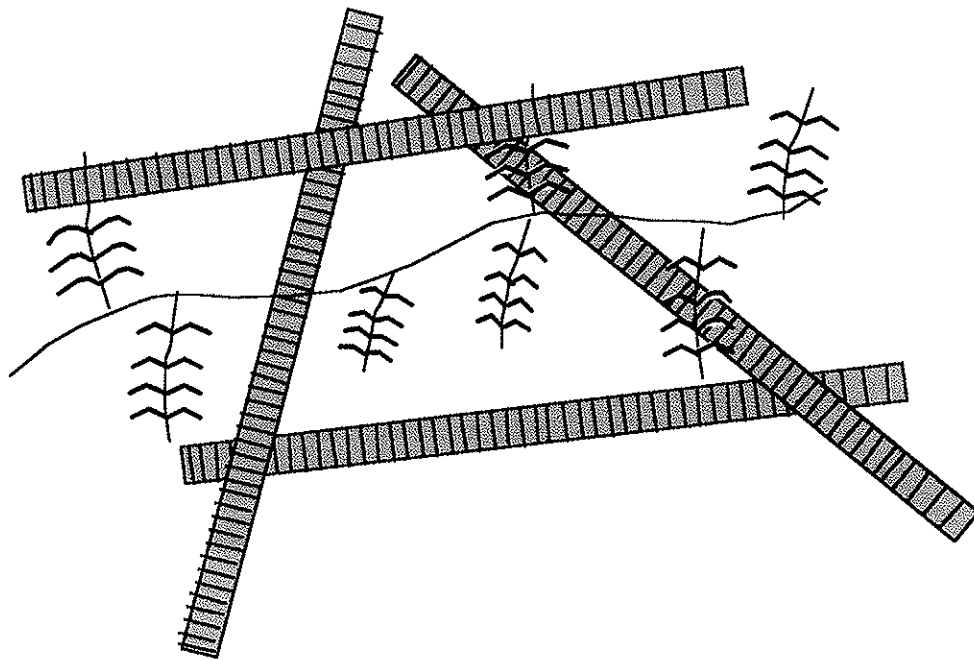


Figura 4. Relación de las fibras de colágeno con los proteoglicanos

También se encuentran proteoglicanos de menor tamaño en el cartílago articular, como el biglicano y la decorina, que poseen una proteína central de 30 kD, la fibromodulina y el colágeno IX, considerado un proteoglicano porque contiene una cadena de condroitín sulfato. Estos pequeños proteoglicanos no ocupan un volumen de tejido, ni contribuyen directamente a su comportamiento mecánico pero se unen a otras macromoléculas influyendo en la función celular. La decorina y la fibromodulina se unen al colágeno tipo II y organizan y estabilizan el entramado de éste ⁽¹⁹¹⁾. El biglicano se concentra en la matriz pericelular y puede actuar con el colágeno tipo VI. Los proteoglicanos también pueden unirse al TGF- β , modulando la actividad del mismo en el cartílago ⁽⁶⁷⁾.

Gracias a la capacidad para interactuar con el tejido tisular los proteoglicanos proporcionan al tejido su característico comportamiento mecánico y contribuyen a su duración como superficie articular. Los proteoglicanos poseen una estructura con cadenas de glicosaminoglicanos cargadas negativamente que se unen al fluido intersticial y a los cationes por lo que tienden a repelerse. Si se libera la presión, las moléculas pueden expandirse de nuevo.

Cuando se rompe la red de colágeno, la matriz se hincha por la expansión de los proteoglicanos y aumenta la concentración de agua y disminuye la de proteoglicanos. Hay datos que indican que la estructura y composición de los proteoglicanos agregados del cartílago articular cambian con la edad ^(14,20), incrementando las cadenas de queratán sulfato y de la proteína de monómeros; las cadenas de condroitín sulfato se acortan y el tamaño medio de los monómeros decrece; las proteínas de unión pueden fragmentarse disminuyendo su cantidad ⁽¹⁴¹⁾. Los agregados son menores y la proporción de agregados que forman monómeros disminuye ^(21,154), todos estos cambios alteran las propiedades mecánicas del cartílago articular permitiendo una mayor deformación, haciéndolo más vulnerable a algunos tipos de lesión y dificultando la reparación de la matriz dañada ^(2,3).

Gran parte de las características mecánicas del cartílago son debidas a la interacción de las macromoléculas de la matriz y el agua de la misma, dependiendo de esta interacción el volumen, la concentración de agua tisular además de la capacidad de respuesta a los estímulos.

La mayor parte de esta interacción se debe a los grandes agregados de proteoglicanos, los cuales presentan abundantes cargas negativas (por los grupos sulfato y carboxilo de sus estructuras) que producen un aumento en la concentración de sodio (carga positiva), lo cual aumenta la osmolaridad, controlada por la red de colágeno, traducándose en el mantenimiento del fluido de la matriz y las concentraciones de electrolitos.

Desde el punto de vista mecánico, el cartílago es un material bifásico, formado por una fase sólida y otra líquida. La parte sólida se describe como porosa y permeable y la líquida tiene la capacidad de fluir a través de la fase sólida.

En general el cartílago es permeable, pues el agua fluye a través de él cuando se somete a un gradiente de presión, haciendo que el fluido salga del cartílago, determinado por la

porosidad, la solidez y las sollicitaciones. Existe una relación directa entre la permeabilidad y el contenido de agua e inversa entre la permeabilidad y el contenido de proteoglicanos.

Las zonas superficiales del cartílago presentan una mayor rigidez que las zonas media y profunda debido a la alta concentración y a la disposición de las fibras de colágeno. Además, el cartílago es viscoelástico, se deforma al aplicar una sollicitación de carga constante con relación al tiempo que ésta actúa.

Glicoproteínas (proteínas no colagénicas)

Las glicoproteínas constituyen entre el 5-15 % del peso seco del cartílago y tienen funciones de unión y ensamblaje entre la matriz y los condrocitos, siendo un componente importante en la red de las macromoléculas ⁽⁹⁵⁾. Son proteínas que unen un pequeño número de monosacáridos u oligosacáridos. Entre ellas están la condronectina, la ancorina CII, la fibronectina y la laminina ⁽¹⁷⁾.

La ancorina CII es una glicoproteína estructural que contribuye al anclaje de los condrocitos en las fibras colágenas de la matriz extracelular ⁽¹³⁹⁾. La fibronectina, otra glicoproteína estructural, de gran tamaño y tiene afinidad para unirse a otras moléculas como la fibrina, el colágeno tipo II ⁽⁶⁰⁾ o la heparina hialuronato ⁽⁸²⁾, mientras que la laminina es una molécula polivalente que está presente en las membranas basales y unida a receptores en la superficie de las células.

La acción de las integrinas, una glicoproteína ⁽⁴²⁾, adhieren los condrocitos a la matriz extracelular y desempeñan, además, la función de transductoras de señales, desde la matriz al interior del condrocito.

En la matriz extracelular del cartílago existen otros componentes en menor proporción, como los lípidos, que constituyen menos del 1 % del peso húmedo del cartílago articular maduro y se localizan tanto intracelularmente como en la matriz extracelular ⁽⁷⁾ o la fosfolipasa A2, enzima importante tanto para el anabolismo como el catabolismo del ácido araquidónico ⁽¹⁹⁰⁾. También se conoce la existencia de sustancias inorgánicas como la apatita calcificada y otras proteínas de acción desconocida.

Líquido sinovial

El líquido sinovial es claro, o ligeramente amarillento, de alta viscosidad, secretado en la cavidad articular por la membrana sinovial. Se encuentra en pequeñas cantidades en las articulaciones humanas y animales, de tal forma que en una rodilla humana normalmente se encuentran entre 1 a 5 ml. Es un dializado del plasma, que en condiciones de normalidad no contiene factores de coagulación, eritrocitos ni hemoglobina, sin embargo contiene hialuronato, un glicosamino glicano extendido y una glicoproteína lubricante (GLP) que reduce la fricción ⁽¹¹⁹⁾. El papel del líquido sinovial es difícil de cuantificar ya que difiere según las circunstancias e interviene en la lubricación articular ⁽¹¹⁹⁾.

Además de la lubricación, el líquido sinovial sirve como material de análisis para realizar el diagnóstico de entidades patológicas, como artritis sépticas, artropatías inflamatorias reumáticas y no reumáticas, rupturas ligamentosas o fracturas osteocondrales y en él se reflejan procesos artrósicos con la determinación de fragmentos de proteoglicanos.

El cartílago articular es un tejido permeable al que, en condiciones normales, intercambia con el espacio articular un flujo constante de líquido intersticial. Esta permeabilidad permite que en el tejido normal se lleve a cabo parte del metabolismo de los procesos de reparación y degradación, actividad que se considera un proceso normal para mantener la arquitectura del cartílago articular. Sin embargo, el proceso fisiológico se acelera en las etapas tempranas de los procesos degenerativos pues los fragmentos de proteoglicanos liberados en el líquido sinovial pueden ser cuantificados y pasan por el sistema linfático a los líquidos corporales, como son el suero y la orina ^(29-30,54,90,92-93,158,195) (Fig.5).

Biología del cartílago articular

Como hemos señalado al estudiar sus componentes, el cartílago articular es un tejido dinámico capaz de sintetizar y degradar, de forma constante y regular, todos los componentes de la matriz extracelular. Para la realización de estas funciones sus mecanismos metabólicos se ven potenciados por los factores de crecimiento y las interleuquinas.

Los mecanismos de acción de ambos grupos, tanto anabólicos y catabólicos ⁽⁴⁴⁾, son múltiples, potenciando o inhibiendo la síntesis de los componentes de la matriz extracelular

(colágenos, agrecanos, etc.) y favoreciendo la actuación de moléculas que degradan el cartílago como son las proteasas o los inhibidores tisulares de los mismos.

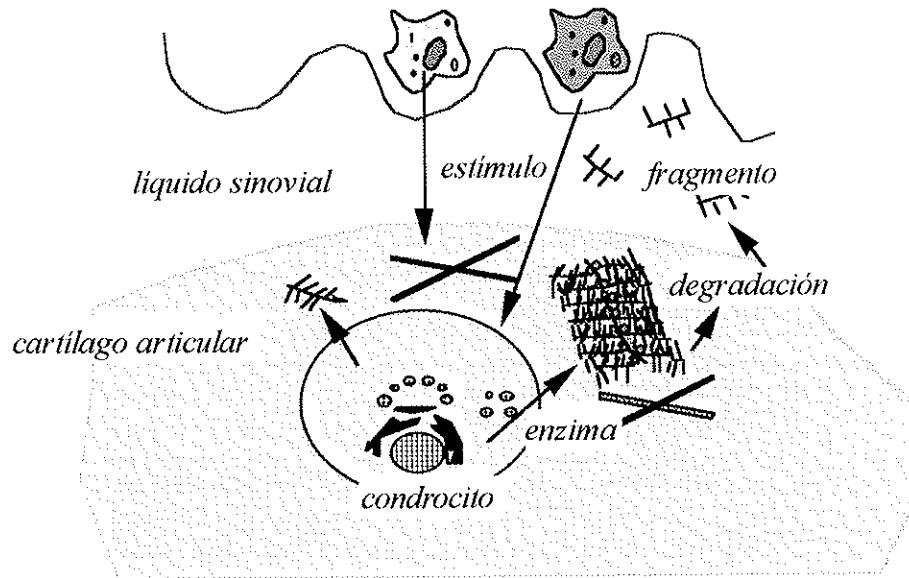


Figura 5. Proceso de degradación del cartílago articular

Factores de crecimiento (anabólicos)

Son polipéptidos, solubles y de fácil difusión producidos en cantidades limitadas, que regulan el desarrollo, proliferación, diferenciación y crecimiento celular. Se ha demostrado que los condrocitos están bajo la acción de los factores de crecimiento durante el desarrollo y la vida adulta. A pesar de que los principales estudios sobre estos factores se centran en su acción sobre el cartílago de crecimiento, se sabe que las principales familias de factores de crecimiento relacionados con la biología del cartílago articular son las del IGF, TGF, PDGF, EGF, FGF y las recientemente descritas neurotrofinas ⁽¹⁸⁹⁾.

Los factores de crecimiento realizan su acción sobre las células "diana" mediante la unión a un receptor específico que inicia, por un sistema de traducción de señales o segundo mensajero, la activación de genes nucleares que determinan la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Se admite que los principales efectos de los factores de crecimiento sobre los condrocitos son la estimulación de la síntesis de la matriz extracelular

del cartílago, la inhibición y activación de las proteasas y la activación de las mismas (38,166,180).

Normalmente los condrocitos poco diferenciados o jóvenes presentan mejor respuesta a los factores tróficos, mientras que los condrocitos fetales son más sensibles a los factores tróficos anabolizantes (101,126,162).

A pesar de lo mucho que se han estudiado los efectos de los factores de crecimiento sobre el cartílago articular los resultados publicados no son homogéneos y en muchos casos son contradictorios.

Interleuquinas (factores catabólicos)

Los factores que desempeñan acciones opuestas a los factores de crecimiento son las interleuquinas que están implicadas en el metabolismo del cartílago articular. Las interleuquinas de acción más importante o relevante en el cartílago articular son las interleuquina-1 (IL-1), la interleuquina - 6 (IL-6) y el TNF- α (33,170,199).

La IL-1 está producida por los condrocitos y se relaciona con la destrucción del tejido cartilaginoso por lisis de la matriz, al acelerar la degradación de los proteoglicanos y disminuir los mecanismos de regeneración, inhibiendo la proliferación de los condrocitos y la síntesis de los proteoglicanos por medio de enzimas proteolíticas (102,181). No se ha podido demostrar su capacidad para producir una degradación del colágeno tipo II 'in vitro' (202), pero se ha comprobado que la IL-1 β estimula la síntesis de TGF- β 3 y reduce la de TGF- β 1 y TGF- β 2 (191). En cierta medida es un mecanismo de protección contra el catabolismo del tejido conectivo inducido por las citoquinas.

El TGF- β , "in vivo" puede estimular la producción de IL-6 por los condrocitos (62), pero sus efectos sobre la proliferación y el metabolismo de los proteoglicanos en el cartílago articular es desconocido. Sabemos que sus niveles están significativamente elevados en el líquido sinovial de pacientes con artrosis y artritis reumatoide y que el TNF- α estimula la producción de enzimas proteolíticas, principalmente metaloproteasas, e inhibe la síntesis de componentes de la matriz extracelular, permitiendo la degradación del cartílago (117, 181).

Proteasas

Son un grupo de enzimas presentes en la matriz extracelular y cuya principal función es la constante renovación de los componentes de la matriz. Son sintetizadas por el condrocito, tanto en condiciones normales como en patológicas, como parte del complejo sistema para mantener la matriz del cartílago normal. Es probable que la sobreactividad de algunas de estas enzimas sea la responsable de la degradación del cartílago en procesos como la artrosis y la artritis reumatoide.

Existen diferentes tipos de proteasas, las metaloproteasas (colagenasa, estromelisina y gelatinasa), llamadas así al necesitar del cinc, para realizar su función, las metaloproteinasas, sintetizadas en forma de proenzimas y las catepsinas (B y D) con capacidad para degradar el agrecano. El bajo pH en el cual actúan las excluye de ser las causantes de la degradación de los proteoglicanos en la matriz intraterritorial.

La colagenasa puede ser activada a través de la plasmina, activada a su vez a partir del plasminógeno por un factor activador de éste ^(26,204). La acción de la colagenasa es altamente específica, pues es la única enzima capaz de separar en una sola zona la parte de la molécula de triple hélice, a tres cuartas partes de distancia del extremo amino terminal de la molécula. Una vez que ha actuado la colagenasa, la gelatinasa separa las cadenas- α ya desnaturalizadas.

La estromelisina puede actuar tanto sobre el colágeno tipo II en el dominio no helicoidal, como en el colágeno tipo IX ^(63,125) y se cree que una de sus principales funciones es la degradación de la proteína central del agrecano. Sin embargo, a pesar de romper la proteína entre los dominios G1 y G2 (como ocurre en la degradación normal del agrecano), los productos específicos de la rotura identificados "in vivo" e "in vitro" no pueden atribuirse a la estromelisina.

La colagenasa, la estromelisina y la gelatinasa son sintetizadas en forma de proenzimas y requieren la activación fuera de la célula mediante modificación enzimática. La plasmina, producida a partir del plasminógeno, puede activar la colagenasa. La estromelisina puede superactivar a la colagenasa para llegar a su máxima actividad ⁽¹²⁵⁾. Los mecanismos de activación de la estromelisina y la progelatinasa no han sido determinados. Las enzimas activas pueden ser inhibidas irreversiblemente por la TIMP (Inhibidor Tisular de Metaloproteasa), secretada también por el condrocito.

Inhibidores de las proteasas (TIMPs)

Las metaloproteinasas pueden ser desactivadas por factores sintetizados por el mismo condrocito y que se denominan TIMPs que producen una inhibición irreversible de las metaloproteasas ⁽³¹⁾.

En el cartílago articular normal, se encuentran niveles altos de inhibidores de las proteasas, principalmente α 2-macroglobulina, inhibidor del activador del plasminógeno y TIMPs, por lo cual se ha llegado a considerar como una probable causa de artrosis el desequilibrio entre factores activadores e inhibidores de las proteasas.

El balance entre proteasas activadas e inhibidores activos determina la cantidad neta de proteólisis. En el cartílago artrósico, el contenido de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP-1 y TIMP2) ^(39-40,203), inhibidores de las proteinasas dependientes de serina ⁽³⁹⁾, e inhibidores de las proteinasas dependientes de cisteína ⁽¹⁰⁰⁾, son reducidos, en comparación al contenido de proteinasa, favoreciendo el aumento de la proteólisis. Similarmente, en la zona hipertrófica del cartílago de crecimiento hay un incremento en la degradación ⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾ y pérdida neta del colágeno tipo II ⁽¹⁾ resultando un incremento en la producción de la procólagenasa, prostromelisin y progelatinasa ^(12,40) al conjunto, con una reducción en las TIMP ⁽¹²⁾, lo cual favorece el aumento de la proteólisis ⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾. De este modo, el aumento de la degradación en el cartílago de crecimiento y en el cartílago artrósico es el resultado de un desequilibrio en la actividad de los inhibidores de las proteinasas. Sin embargo, no hay resultados que indiquen que uno de estos inhibidores pueda detener de manera natural la degradación de la matriz cartilaginosa.

Factores de crecimiento en el cartílago articular

En los últimos años han cobrado interés los estudios que definen la respuesta bioquímica del cartílago a los factores de crecimiento y se ha comprobado que estos agentes pueden jugar un papel importante en la regulación de los procesos de síntesis del cartílago normal e incluso en el desarrollo de los procesos degenerativos. El mecanismo de acción de estos factores sobre el condrocito no está completamente definido, pero al parecer están relacionados, principalmente, con la interacción de los receptores de superficie de las células diana. La mayor parte de los factores de crecimiento se unen a receptores

específicos, y la respuesta está directamente relacionada con la concentración del factor de crecimiento y con el número de receptores de la célula.

Los principales factores de crecimiento relacionados con la biología del cartílago articular son:

- Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).
- Factor de crecimiento derivado de los fibroblastos: ácido (FGFa) y básico (FGFb).
- Factor de crecimiento insulinoide (IGF-I).
- Factor beta de transformación del crecimiento (TGF- β).

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

Constituye un elemento importante del crecimiento de las células del tejido conjuntivo. Es una glicoproteína de 30 kD formada por un dímero de cadenas polipeptídicas A y B unidas por puentes disulfuro. Se han identificado varias isoformas con diferentes actividades que poseen un efecto mitogénico sobre los condrocitos, aunque se desconoce el mecanismo de acción. Este factor no parece tener actividad en las articulaciones normales. Pueden tener una función en el proceso de cicatrización de los procesos degenerativos y lesiones lacerantes.

El PDGF es liberado conjuntamente con la IL-1 durante los procesos inflamatorios y realizan complejas interacciones entre sí, potenciando los efectos de las IL-1 α e IL-1 β sobre las metaloproteasas⁽¹⁷³⁾.

Factores de crecimiento derivados de los fibroblastos (FGFa y FGFb).

Al igual que muchos otros factores, deriva de múltiples fuentes. Anteriormente, el péptido sintetizado en la hipófisis se llamó factor de crecimiento del cartílago, y el sintetizado en el cartílago se denominó factor de crecimiento derivado del cartílago, ambos corresponden al FGFb, que actúa sobre el tejido conectivo como un potente mitógeno, estimulando la producción de ADN en condrocitos articulares maduros en cultivo. También contribuye a la formación de la matriz aunque es menos activo y precisa unirse a otras sustancias, como la insulina.

Por otro lado, el FGFa tiene actividad sobre la diferenciación celular, de células mesenquimales a condrocitos, actúa como mitógeno de condrocitos y osteoblastos e interviene en la síntesis proteica aumentándola en la condrogénesis inicial aunque después

parece retrasar la formación de pro-colágeno II, proteoglicanos y la hipertrofia de los condrocitos.

Factor de crecimiento insulinoide (IGF-I).

Los factores de crecimiento más estudiados, la insulina, el IGF-I y el IGF-II, probablemente sean tres péptidos homólogos, los cuales se unen con diferente afinidad a tres receptores celulares distintos. El IGF-I y el IGF-II son estructuralmente análogos a la proinsulina con la que comparten un 68 % de su estructura. El IGF-I, anteriormente conocido como somatomedina-C, estimula el ADN y la síntesis de colágeno en el cartílago de crecimiento, en el cartílago inmaduro y, también, en el cartílago articular maduro. Se desconoce si es sintetizado localmente o en el hígado, y es más efectivo cuando se administra conjuntamente con otros factores, exceptuando a la insulina.

Los condrocitos del cartílago articular expresan receptores para IGF-I fundamentalmente en las zonas media y profunda ⁽¹⁷³⁾. Los IGF, especialmente el IGF-I, estimulan la síntesis de proteoglicanos, colágeno II e integrinas, a la vez que inhiben la destrucción de la matriz extracelular, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta y favorecen la adhesión de los condrocitos, a la fibronectina y al colágeno II ⁽¹⁸⁰⁾.

Factor beta de transformación del crecimiento (TGF- β).

Es una proteína de 25 kD con dos polipéptidos idénticos unidos por puentes disulfuro. No comparte su receptor con otras formas y existen, por lo menos, cinco isoformas. Estimula la síntesis del ADN por el FGFb, el factor de crecimiento epidémico y el IGF-I. Está demostrado que el TGF- β es sintetizado por los mismos condrocitos y parece que también estimula la síntesis de proteoglicanos, al mismo tiempo que inhibe la síntesis de colágeno tipo II. Además, ayuda a la formación de la TIMP y del inhibidor-1 del activador del plasminógeno, dos sustancias que pueden prevenir el efecto de degradación de la estromelina y la plasmina.

Criopreservación

El empleo de injertos cartilagosos en la cirugía ortopédica es común, por lo que se ha requerido el perfeccionamiento de los procedimientos de almacenamiento para evitar el deterioro del tejido donado, y tener disponibilidad en el momento adecuado.

Pruden, 1881, ⁽¹⁴⁸⁾, sumergió el cartílago en alcohol 95°. En 1938, Peer ⁽¹³⁶⁻¹³⁷⁾ notó que la absorción de cartílago septal y costal humano, en alcohol, se produjo dos años después de su implante, mientras que los autoinjertos frescos tenían una apariencia normal hasta seis años después. En 1940, Brown ⁽¹³⁾ concluyó que los aloinjertos cartilaginosos preservados fueron inferiores a los autoinjertos frescos trasplantados.

En 1956, Curran y Gibson ⁽³⁵⁾ demostraron que el cartílago articular almacenado a 4 °C era capaz de sobrevivir cuarenta días. En 1957, Gibson ⁽⁵⁹⁾ usó glicerol en un intento de proteger el tejido contra la congelación, pero no consiguió una penetración adecuada y no se observó efecto crioprotector. En 1965, Smith ⁽¹⁷²⁾ obtuvo buenos resultados al preservar células de cartílago aisladas a -79° C, con dimetilsulfóxido (DMSO) y O'Connor y Price en 1938, ⁽¹²⁷⁾ demostraron que el cartílago preservado en solución salina y con mertiolate no se reabsorbió cinco años después del trasplante.

Los autoinjertos han conseguido buenos resultados a corto plazo ^(53,106,112,130), sin embargo, plantean problemas como la disponibilidad, debido a la dificultad de coordinar la extracción con el implante y se precisa dañar una zona para reparar otra. Para remediar este inconveniente se han almacenado largos períodos de tiempo en los bancos de hueso y de tejidos, que aseguran la disponibilidad de tejido donante, realizando pruebas serológicas que eviten la transmisión de enfermedades infecciosas y permitan adecuar las piezas a las características específicas de la lesión ⁽¹⁹³⁾.

La posibilidad de conservar en buen estado los injertos es posible gracias a la criopreservación, “conservar o mantener la integridad del tejido mediante el frío”, hace indefinido el tiempo de almacenamiento al detener el tiempo biológico. Sin embargo, conlleva un riesgo implícito a la viabilidad del tejido u órgano. La criopreservación del tejido cartilaginoso no representa un método sencillo ni asegura la integridad de dicho tejido pues el proceso puede dañar las células, la matriz extracelular o ambas, produciendo cristales por la presión osmótica, el choque térmico, la nucleación intracelular de los cristales de hielo, la toxicidad a los criopreservadores o la rotura de la matriz, etc ^(51,108).

Existen varias teorías para explicar el daño crioinducido en la célula. La más aceptable es que la lesión por frío ocurre cuando se congela el agua intra y extracelular ^(110,113). Con la formación de hielo extracelular durante el proceso de congelación, los solutos se

concentran fuera de la célula y producen un desequilibrio osmótico con el agua intracelular que provoca que ésta salga de la célula.

Con la pérdida de agua, aumenta la concentración de solutos intracelulares que contraen o encogen a la célula, lo cual daña las membranas y las moléculas intracelulares ^(105,111). La lesión también puede producirse cuando el agua es retenida dentro de la célula y forma hielo, aunque el mecanismo exacto de este tipo de daño no está completamente claro ^(78,104). Por todo esto, la condición de criopreservación debe conseguir un equilibrio del líquido intra y extracelular, con una mínima formación de hielo intracelular.

Los esfuerzos para conseguir un método eficaz para preservar tejido de donante en condiciones de viabilidad y funcionalidad, son debidos al deseo de 1) proveer una selección de material biológico que pueda ser usado como injerto, y que sea diseñado a voluntad del cirujano para que concuerde, en tamaño y forma, con el nicho receptor; 2) eliminar el tiempo impuesto al trasplante de un injerto fresco que en el caso de los aloinjertos, es el tiempo entre la muerte del donante y su colocación en el nicho receptor. Frente a los autoinjertos, el aloinjerto criopreservado evita el tiempo de la toma del injerto y la morbilidad del sitio donante; 3) la reducción por el almacenamiento de la antigenicidad del material del injerto, y 4) el tejido debe permanecer congelado hasta el momento de la cirugía, lo cual requiere facilidades para su almacenamiento y transporte.

Los estudios sobre criopreservación de la estructura y función de diversos tejidos y órganos se ha individualizado y perfeccionado ^(50,81,131), pero los protocolos de criopreservación del cartílago articular se encuentran en una etapa experimental.

Los avances en la cirugía ortopédica han hecho posible el uso de injertos frescos e injertos congelados de cartílago articular en la reparación o en el tratamiento de las enfermedades degenerativas articulares. Sin embargo, la degeneración del cartílago articular injertado, continúa siendo un problema a largo plazo. Por esta razón consideramos que el desarrollo de un método de criopreservación efectivo es un requisito esencial en el éxito de los trasplantes osteocondrales, el cual se verá reflejado directamente en la capacidad de mantener una viabilidad celular aceptable que permita el adecuado metabolismo del cartílago y la síntesis de los componentes de la matriz, sobreviviendo a la degeneración para realizar las funciones de soporte y transmisión de cargas.

En los protocolos modernos de criopreservación los agentes crioprotectores tienen una función importante. Desde los inicios de la criopreservación, sustancias tan sencillas como el alcohol, el mertiolate y el suero salino han sido usadas como crioprotectores, investigaciones ulteriores han introducido otro tipo de sustancias como la polivinilpirrolidona (PVP), los dextranos, el glicerol y el DMSO ⁽⁹⁴⁾.

El mantenimiento de la viabilidad condrocítica representa el principal condicionante para asegurar las propiedades mecánicas del cartílago articular a largo plazo ^(6,70,123) y la mayoría de los estudios demuestran que la viabilidad máxima se consigue con el empleo de protocolos de ritmo y temperatura controlados y con el uso de agentes crioprotectores ^(107,183).

Sin embargo, también es conocido el efecto citotóxico de los agentes criopreservadores ⁽¹⁵⁶⁾. El DMSO es considerado tóxico en base a sus efectos sobre las membranas y las enzimas intracelulares ^(150,198); el glicerol, por su parte, a altas concentraciones puede tener efectos letales sobre los potenciales eléctricos intracelulares ⁽⁴⁾, por esta razón se debe tomar en cuenta la concentración idónea y el tiempo de exposición ⁽⁷⁹⁾.

Por lo tanto, el uso de la congelación como método de conservación presenta también desventajas entre las que se encuentra el hecho de que éste es un factor que influye directamente en la supervivencia celular, a menos que se utilice alguna sustancia crioprotectora, la cual por sí misma representa un factor que puede ser benéfico pero también perjudicial ⁽²²⁾.

Los virus y bacterias pueden sobrevivir a la congelación. Se ha publicado la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana adquirida a través de un aloinjerto de tendón patelar ⁽¹⁸⁷⁾. Sin embargo, las pruebas serológicas que se realizan y el ser donantes multiorgánicos permiten el uso fiable de los aloinjertos ya que reducen al mínimo la posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas a través de los aloinjertos.

La criopreservación del cartílago se ve influenciado por múltiples variables y su análisis se ve dificultado por las características propias del cartílago como:

- Población celular escasa
- Matriz extracelular con elevado contenido acuoso
- Contenido de macromoléculas estructurales

No obstante se trabaja de manera experimental para encontrar el protocolo más adecuado que garantice la condroprotección y así, asegurar la viabilidad de los aloinjertos cartilaginosos.

Las lesiones de cartílago articular

La localización, el tamaño y la etiología de la lesión son factores importantes para determinar el tratamiento a seguir. Las lesiones articulares se pueden dividir en focales, cuando se limitan a una zona concreta de la superficie articular, o totales, cuando comprenden toda la superficie articular. Además, puede afectar únicamente al cartílago, lesiones condrales o, más frecuentemente, al cartílago y al hueso subyacente, lesiones osteocondrales.

El cóndilo femoral medial es el lugar de localización más frecuente de las lesiones focales, explicado por su morfología ⁽²⁴⁾ y la etiología se relaciona con factores tan variados como los traumatismos agudos, lesiones focales degenerativas, microtraumatismos repetitivos, isquemia, inflamación, tensiones acumulativas, alteración del eje de alineación de las extremidades inferiores, obesidad, actividades propias del paciente, la edad, factores hereditarios y enfermedades metabólicas como la diabetes. A pesar de las múltiples hipótesis relacionadas con su etiopatogenia, no se conoce bien la historia natural y la progresión de las lesiones articulares por lo cual muchos investigadores asumen que las lesiones cartilaginosas focales no reparadas progresan hacia la artrosis ⁽⁶¹⁾.

Clasificación de defectos articulares

Antes de intentar reparar la lesión, se debe valorar la extensión de la misma, lo cual es posible, con las técnicas artroscópicas.

La clasificación de Outerbridge, 1961, ⁽¹³³⁾ desarrollada inicialmente para la valoración de condromalacia patelar, puede ser útil para cualquier otro tipo de lesión ya que describe su forma y su extensión. (Tabla 1) (Fig. 6).

Otro sistema de clasificación es el de Bauer y Jackson ⁽¹¹⁴⁾, útil para describir la lesión cartilaginosa inicial y su causa potencial, los grados del I al IV se relacionan con traumatismos recientes, y los grados V y VI se corresponden con lesiones antiguas que pueden haber progresado desde grados más leves (Tabla 2).

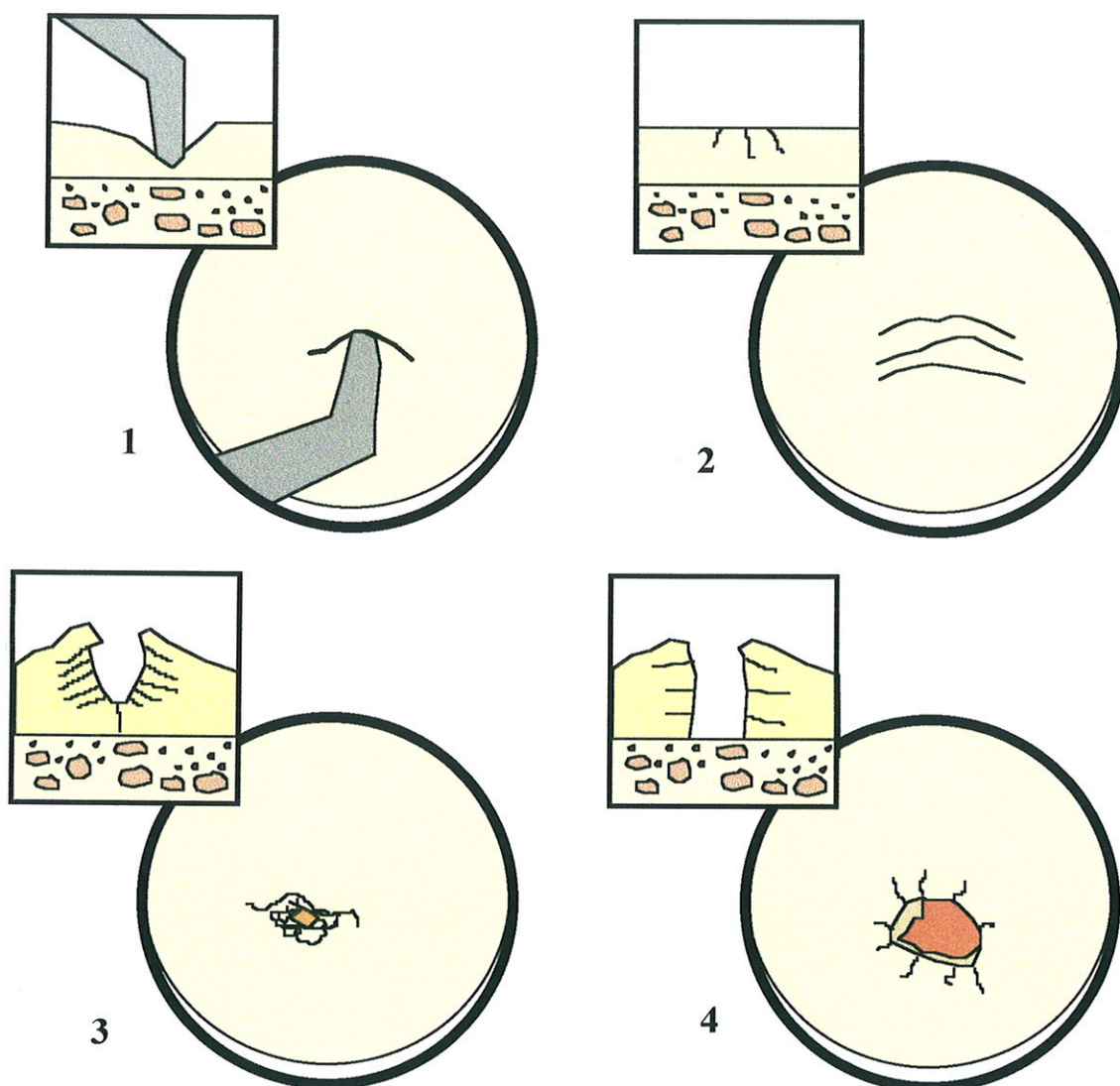


Figura 6. Fases de degradación del cartílago articular, 1. Grado I, 2. Grado II, 3. Grado III, 4. Grado IV.

El principal objetivo de cualquier sistema de clasificación no sólo es el de unificar criterios de manera tal que se pueda hablar un mismo lenguaje al referirse a una lesión sino que cualquier sistema de clasificación debe además de definir la lesión, plantear una orientación terapéutica, dar su pronóstico y prever las posibles complicaciones que se puedan presentar durante la aplicación del tratamiento. Las técnicas de imagen deben aportar una definición más exacta de la situación y evolución de estas lesiones. Por ello,

además de la artroscopia, los resultados de la radiología convencional, la TAC y, sobre todo, la Resonancia Magnética debe ser incluidas en los baremos.

También es interesante conocer las valoraciones histológicas experimentales de las lesiones y hallazgos del cartílago articular para conocer, medir y valorar la situación microscópica del cartílago. La más sencilla y utilizada es la escala de Mankin, 1973, ⁽⁹⁷⁾ (Tabla 3), si bien hay otras que tienen interés como es la de O'Driscoll, 1986, ⁽¹²⁹⁾ (Tabla 4) usada en la evaluación de la integración de los injertos cartilaginosos.

Tabla 1

Clasificación de Outerbridge

<i>Grado 0</i>	Superficie articular normal
<i>Grado I</i>	Reblandecimiento y edema de superficie articular
<i>Grado II</i>	Fibrilación parcial de superficie articular (< 1,5 cm)
<i>Grado III</i>	Fisuras que llegan a hueso subcondral sin exponerlo (> 1,5 cm)
<i>Grado IV</i>	Exposición de hueso subcondral

Tabla 2

Clasificación de Bauer y Jackson

<i>Grado I</i>	Línea de fractura en la superficie articular
<i>Grado II</i>	Fractura estrellada de la superficie articular
<i>Grado III</i>	Fractura con lesión pediculada
<i>Grado IV</i>	Cráter
<i>Grado V</i>	Fibrilación del cartílago
<i>Grado VI</i>	Degradación del cartílago

Tabla 3

Baremo de Mankin para cuantificar el daño a la superficie articular

Estructura	Puntuación
Normal	0
Superficie irregular	1
Pannus	2
Fisuras hasta zona de transición	3
Fisuras hasta zona radial	4
Fisuras hasta zona calcificada	5
Desorganización completa (estructura caótica, clones, actividad osteoclástica)	6
Células	
Normal	0
Hiper celularidad difusa (incluyendo pequeños clones superficiales)	1
Clones	2
Hipo celularidad	3
Tinción de la matriz (Safranina-O)	
Normal	0
Ligera reducción	1
Moderada reducción	2
Reducción severa	3
Ausente	4
Integridad de la “tidemark”	
Intacta	0
Cruzada por vasos sanguíneos	1

Tabla 4

Baremo de O'Driscoll para analizar el daño articular

Naturaleza del tejido predominante

- Cartílago Hialino
- Cartílago poco diferenciado
- Tejido Fibroso o Hueso

Exclusivamente tejido cartilaginoso

Regularidad de la superficie articular

- Lisa e intacta
- Fisuras menores y Fibrilaciones
- Desorganización completa

Integridad estructural

- Normal
- Ligera desorganización
- Desintegración severa

Unión al cartílago adyacente

- Completa
- Parcial
- Ninguna

Nivel de tejido neoformado

- A nivel
- Elevado
- Deprimido

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

El cartílago articular es un tejido con un poder de regeneración muy pobre por lo cuál las lesiones sufridas en zonas de carga tienden a ser sustituidas por un tejido fibrocartilaginoso. Sustituir una zona de carga, en una articulación dañada, por un aloinjerto osteocondral criopreservado y conseguir una viabilidad e integración de la porción cartilaginosa constituye una alternativa terapéutica que permitiría sustituir un cartílago por otro de las mismas características y de fácil disponibilidad.

Para comprobar esta hipótesis hemos planteado desarrollar un modelo de trasplante de cilindros osteocondrales, con los cuales se estudia:

- a. la respuesta a la criopreservación de aloinjertos osteocondrales, en nitrógeno líquido a -186°C con el uso de una sustancia criopreservadora (DMSO).
- b. el comportamiento histológico del cartílago articular en diferentes condiciones de crioprotección.

MATERIAL y MÉTODOS

Modelo experimental

Como modelo experimental utilizamos el cordero (*Ovis aries*), de 4-6 meses de edad, y con un peso comprendido entre los 25 - 30 Kg. Se utilizaron 36 animales como receptores, divididos en 6 grupos de 6 corderos cada uno, teniendo en cuenta las condiciones a las que se sometía el injerto. El proyecto fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Navarra.

Grupos de Estudio

Grupo I: cilindros conservados a -186 °C

Grupo II: cilindros conservados a -186 °C, con DMSO al 10 % durante todo el almacenamiento

Grupo III: cilindros conservados a -186 °C, con DMSO al 10 %, durante 90 min.

Obtención y proceso de los injertos (Figura 7)

Los injertos fueron obtenidos de corderos de las mismas características que el receptor, marcados previamente con rojo de alizerina, para identificar el injerto óseo en el cordero receptor.

Extracción de los injertos

La extracción de los injertos se realizó en quirófano en condiciones de esterilidad. Con una incisión pararrotiliana medial, en ambas rodillas, se disecó la cápsula articular y se realizó la artrotomía sobre el alerón medial y la membrana sinovial. Posteriormente, se desplazó lateralmente el mecanismo extensor e hiperflexionando la rodilla se expuso la zona condílea de carga.

Con una trefina de 8 mm de diámetro se extrajeron dos cilindros osteocondrales de 1,5 cm de profundidad, colocados en recipientes estériles de 2 ml, especiales para congelación (Costar®).

Los corderos donantes fueron sacrificados mediante la administración de Pentobarbital sódico 1,5 mg/Kg y 5 meq de cloruro potásico (KCl) por vía endovenosa.

Los injertos permanecieron en criopreservación durante, al menos, 4 semanas.

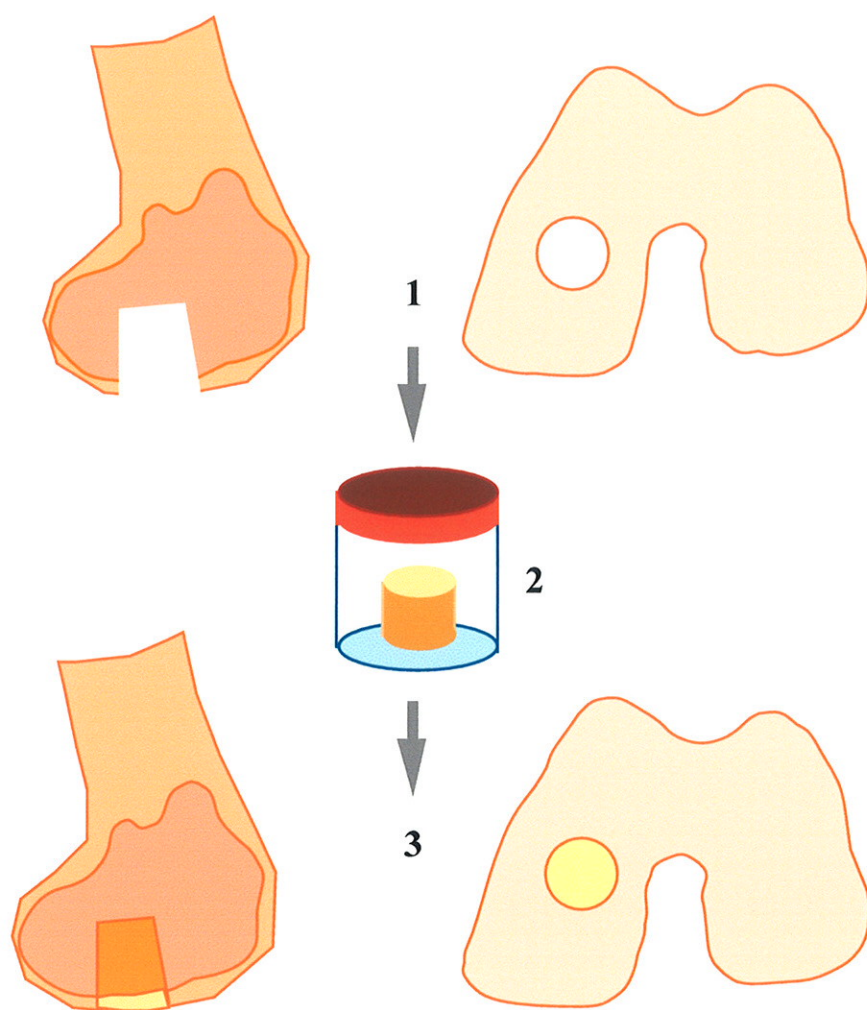


Figura 7. Método experimental

Fase quirúrgica

Preoperatorio

Los animales fueron trasladados al animalario una semana antes de la intervención y el día previo a la intervención fueron esquilados y lavados con solución antiséptica de povidona yodada. Posteriormente fueron trasladados a un habitáculo aislado donde permanecieron en ayuno absoluto.

En el quirófano experimental se realizó el rasurado de la extremidad posterior izquierda.

Material quirúrgico

En todos los procedimientos se empleó el instrumental y material quirúrgico convencional utilizado en cirugía ortopédica y, además, una broca de 7,5 mm de diámetro.

Anestesia

Se empleó anestesia general con intubación endotraqueal. Para la administración de la medicación anestésica se canalizó la vena cefálica del miembro superior derecho del animal con un Abbocat, nº 20, que se conectó a un sistema de goteo por el que se administró fluidoterapia de mantenimiento con suero glucosado al 5 %.

La inducción anestésica se consiguió mediante la administración intravenosa de:

Tiobarbital (1-2 mg/Kg peso)

Atropina (0,5 mg/Kg peso)

Ketamina (5 mg/Kg peso)

Fentanest (0,005 mg/Kg peso)

El mantenimiento se llevó a cabo mediante ventilación mecánica y respiración asistida, halotane, al 1 %, con oxígeno, al 40 %, y Fentanest®, cada 30 min.

Con esta medicación se consiguió una depresión del estado de consciencia y un efecto analgésico suficiente para realizar el procedimiento. El cordero despertó de manera espontánea en la misma sala de quirófano.

Técnica quirúrgica (Figura 8)

Una vez anestesiado el cordero fue colocado, en posición de decúbito supino, sobre la mesa quirúrgica. Sobre la zona a intervenir se realizó asepsia con solución alcohólica

yodada y se colocaron campos y sábanas estériles, dejando totalmente aislada la extremidad.

Se realizó una incisión cutánea pararrotiliana medial en la zona condílea femoral de la pata posterior izquierda, de aproximadamente 5-8 cm. Se disecó hasta alcanzar la cápsula articular, se procedió a realizar artrotomía sobre el alerón medial y la membrana sinovial; el mecanismo extensor se desplazó externamente y flexionando la rodilla se expuso la zona condílea de carga. Con una broca de 7,5 mm de diámetro se realizó el nicho receptor en la zona de carga del cóndilo femoral, con una profundidad de 1,5 cm. Se tomó el injerto, previamente sumergido en solución salina, a temperatura ambiente, para descongelarlo, y se colocó en el nicho receptor con un impactador de silicona quedando a presión y procurando que la porción cartilaginosa del injerto contactase con el cartílago receptor.

Se redujo el mecanismo extensor y se realizó un cierre por planos, suturando la cápsula articular y el tejido celular subcutáneo con puntos simples de Vicryl 3-0 (ETHICON® Johnson & Johnson S.A.), y la piel con seda 2-0 (Lorca Marín®).

Postoperatorio inmediato

Al finalizar el procedimiento los corderos permanecieron en el quirófano hasta despertar. Se les administró Finadyne®:Flunixin meglumine (50 mg/ml), IM, dos dosis de 1-2 ml/50 Kg, al terminar la intervención y doce horas más tarde. Cuando el animal intentó incorporarse se le trasladó a su jaula en el animalario.

Postoperatorio tardío

No se restringió el apoyo de la pata intervenida y los animales dispusieron de comida y agua “ad libitum”, desde el primer día después de la intervención.

Durante los siguientes cinco días a la cirugía se les administró Polipen®:Bencilpenicilina procaína (20 MUI), IM, Dihidroestreptomicina 25 gr/100 ml a dosis de 1 ml/10 Kg, IM, y se realizó la limpieza diaria de la herida, hasta su cicatrización, con solución antiséptica de povidona yodada al 10 % y Veterín Fenicol®.

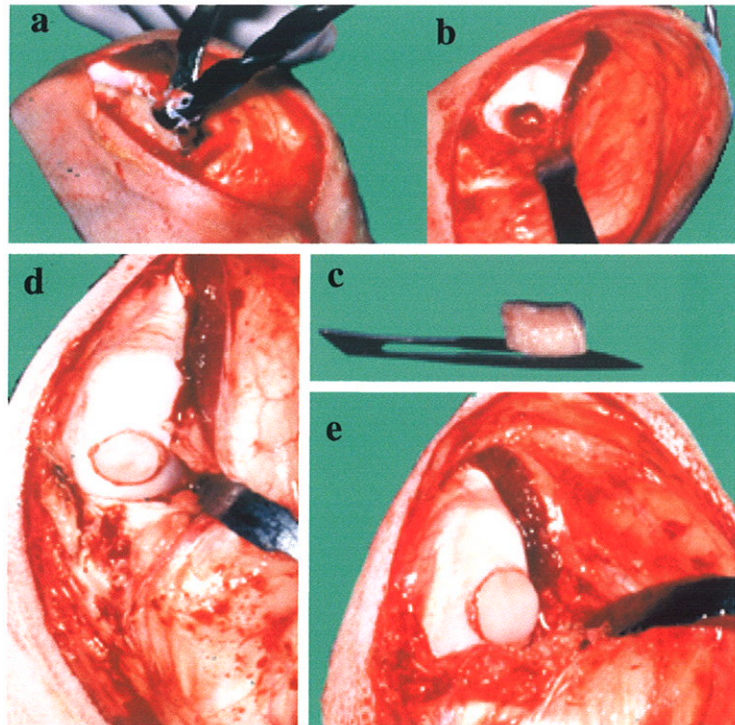


Figura 8. a) preparación del lecho receptor cilíndrico. b). perforación. c). injerto cilíndrico. d, e). colocación del injerto

Sacrificio

El sacrificio se realizó 5 meses después de la cirugía, en la sala de necropsias, mediante la administración de Pentobarbital sódico (1,5 mg/Kg peso) y 5 meq de cloruro potásico (KCl), IV.

Se extrajo la rodilla articulada y se realizó limpieza de partes blandas remanentes. Antes de realizar la artrotomía al espécimen “post mortem” se procedió a inyectar 10 ml de solución salina estéril. Posteriormente se extrajo el líquido sinovial, se colocó en un recipiente de 20 ml estéril (SARSTEDT®) y se mantuvo en congelación, a -80°C, hasta su posterior estudio.

Estudios realizados

Para la valoración de los resultados se efectuaron los siguientes estudios:

Estudio radiológico

Después de desarticular la rodilla y una vez liberada de las partes blandas, se realizó un estudio radiológico “post-mortem” con radiografías de contacto de la parte distal del fémur (Faxitron 43855A, Mc Minnville, Oregon), con una exposición de 35 segundos y un voltaje de 35 Kv.

El cóndilo femoral medial fue dividido y se realizó un corte con una sierra de diamante (Exakt®) incluyendo el injerto para su estudio histológico, inmunohistoquímico y marcaje de fluorocromos en metacrilato.

Estudio histológico

La fijación de las piezas se efectuó en formol, al 10 %, tamponado con fosfatos, durante 24 horas. Una vez fijadas, las piezas fueron decalcificadas en una solución de Polivinilpirrolidona (P.V.P), al 7,5 %, y E.D.T.A, al 10 %, en Tris Buffer, 0,1 M y pH 6,95, durante al menos 2 meses y a 4°C.

La deshidratación de las piezas se realizó mediante alcoholes de gradación creciente (70 %, 80 %, 96 % y 100 %), cambiando dichos alcoholes cada 12 horas manteniéndose en agitación constante. Posteriormente se introdujeron en xileno durante 4 horas y se incluyeron en parafina a una temperatura de 60 °C. Finalmente, se realizaron cortes de 4 µm de grosor en un microtomo convencional (Microm®, Modelo HM 340-E, Alemania) y se tiñeron con Tricrómico de Masson y Safranina-O.

Se valoró el grado de integridad de la porción cartilaginosa del injerto, y las características histológicas de la misma, teniendo en cuenta las condiciones de la matriz extracelular, la viabilidad celular, la presencia de tejido fibroso, la distribución del mismo y el grado de integración de la porción ósea del injerto.

Inmunohistoquímica

Con el objeto de identificar los antígenos relacionados con el cartílago normal y el degenerado, se realizó el estudio inmunohistoquímico, para detectar colágeno II, colágeno X, proteína S-100, Factor de crecimiento de fibroblastos ácidos (FGFa), Factor de crecimiento de fibroblastos básicos (FGFb), las proteasas MMP-1, MMP-2, MMP-3, y el inhibidor TIMP-1, usando anticuerpos específico para cada uno de ellos.

Tras desparafinar las muestras, mediante su introducción en la estufa a 60 °C, durante 15 min., y posterior tratamiento con xilol, durante otros 15 min., se colocaron en alcohol absoluto y se procedió a bloquear la peroxidasa endógena mediante peróxido de hidrógeno (H₂O₂), 3 %, en alcohol metílico, durante 30 min. 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).

Los anticuerpos que lo requirieron fueron introducidos en una solución de tripsina (tripsinización) para facilitar la exposición de los epítopes del antígeno (tripsina 0,1% Merck® 40 U/mg, CaCl₂ 0,1 % en TBS, a 37 °C). Posteriormente se realizó un lavado en TBS, y se bloqueó la tinción inespecífica de fondo mediante la incubación con suero normal no inmune, al 5 %, en TBS (suero normal de conejo o de cerdo, dependiendo de las características de cada anticuerpo primario y del anticuerpo secundario utilizado posteriormente). Las secciones fueron incubadas con los anticuerpos específicos durante una noche, a 4 °C, en cámara húmeda.

Al día siguiente, tras lavar los cortes, durante 5 min., en TBS, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, durante 30 min., a temperatura ambiente diluido a 1:200. Tras un nuevo lavado en TBS, las secciones se incubaron con el complejo avidina-biotina unido a peroxidasa (K0355 Dako®), durante 30 min., a temperatura ambiente y una dilución 1:100.

Se efectuaron dos lavados de 5 min. 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® D-5637) 0,3 mg/ml en TB, como cromógeno y peróxido de hidrógeno, 0,005 %, como sustrato.

El lavado final se efectuó en TB y agua corriente, se contrastaron todas las piezas en hematoxilina de Harris, durante 10 segundos, se deshidrataron mediante alcoholes de gradación creciente y finalmente se montaron en DPX.

Se realizaron controles negativos siguiendo los mismos pasos que en la técnica de inmunohistoquímica descrita anteriormente, reemplazando el anticuerpo por TBS.

En la Tabla 5 se relaciona cada anticuerpo utilizado, su fuente y origen.

Tabla 5

Anticuerpos utilizados, fuente y origen

Anticuerpo	Referencia	Firma	Origen
Anti – Colágeno II	2150 - 0060	Biogenesis®	Conejo
Anti – Colágeno X	234196	Calbiochem®	Conejo
Anti – FGFa	F-5521	Sigma®	Conejo
Anti – FGFb	F-3393	Sigma®	Conejo
Anti – S100	S-2644	Sigma®	Conejo
Anti – MMP-1 (Ab-1)	IM35L	Oncogene™	Ratón
Anti – MMP-2 (Ab-3)	IM33L	Oncogene™	Ratón
Anti – MMP-3 (Ab-1)	IM36L	Oncogene™	Ratón
Anti – TIMP-1 (Ab-1)	IM32L	Oncogene™	Ratón

Especificidad de los diferentes anticuerpos utilizados

En el siguiente apartado se describirán las características de cada anticuerpo utilizado, así como su concentración y el requerimiento o no de enzima (Tripsina).

Anti-Colágeno II

Es un anticuerpo policlonal que presenta inmunorreactividad de un 100 % con el colágeno tipo II humano, 10 % con el colágeno tipo I humano y 5 % con el colágeno tipo III humano, menos de 1 % con el colágeno tipo IV y V y menos de 0,1 % con fibronectina, fibrinógeno, albúmina y laminina. La dilución utilizada fue 1:20 con 1 hora en tripsina.

Anti-Colágeno X

Es un anticuerpo policlonal que presenta inmunorreactividad frente a colágeno tipo X humano, de ratón y rata. Presenta reactividad cruzada con fibronectina y colágenos tipo II y IX, sin embargo no presenta inmunorreactividad cruzada con los colágenos tipo I, III y XI.

La dilución utilizada fue 1:500 con 30 min en tripsina.

Anti-Factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGFa)

Este anticuerpo reacciona frente a FGFa de bovino pero no presenta reacción cruzada frente a FGFb. La dilución utilizada fue 1:100, sin tripsina.

Anti-Factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb)

No presenta reacción cruzada con FGFa bovina o seroalbúmina. La dilución utilizada fue 1:100 sin tripsina.

Anti-proteína S-100 (S-100)

Inmunoespecífico para la proteína S-100 de inmunoelectroforesis de extracto de cerebro bovino y S-100 purificada. En su caracterización técnica se advierte que no se registran reacciones cruzadas con otros péptidos o especies animales. La dilución utilizada fue 1:100 sin tripsina.

Anti-Metaloproteinasa tipo I (MMP-1)

La MMP-1 (colagenasa intersticial, colagenasa de tejido o colagenasa fibroblástica) puede reconocerse en su forma latente a 57/52 kD y en su forma activa a 46/42 kD. Esta enzima es el sustrato específico de los colágenos tipo I, II, III, VII, VIII, y X y de la gelatina. La MMP-1 se asocia con los procesos de degradación como la artritis reumatoide, la artrosis y la invasión de células cancerígenas.

Este anticuerpo no presenta reacción cruzada con MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 o MMP-13 humana. Los mejores resultados en parafina se obtienen mediante presión. Sin embargo, también se puede utilizar calor, saponificación o tripsinización en lugar de presión. La dilución utilizada fue 1:200 con 30 min en tripsina.

Anti-Metaloproteinasa tipo II (MMP-2)

La MMP-2 (gelatinasa A, 72 kD gelatinasa-colagenasa tipo IV, TBE-1) puede reconocerse en su forma latente a 72 kD y en su forma activa a 66 kD. Numerosos estudios han relacionado la expresión de la colagenasa y la metástasis potencial y han sugerido que puede llegar a ser utilizada como marcador o pronóstico del cáncer. Este anticuerpo no presenta reacción cruzada con MMP-1, MMP-3, MMP-9 o MMP-13 de humanos. La dilución utilizada fue 1:300 con 30 min en tripsina.

Anti-Metaloproteinasa tipo III (MMP-3)

La MMP-3 (estromelisin-1), es secretada a 59/57 kD y en procesos proteolíticos su forma activa se encuentra entre 45 y 28 kD. Esta enzima degrada las proteínas de la matriz extracelular, incluyendo los proteoglicanos del cartílago, fibronectina, colágeno tipo IV y IX y laminina. No presenta reacción cruzada con MMP-1, MMP-3, MMP-9 o MMP-13 de humanos. La MMP-3 se relaciona con los procesos de degradación como la artritis reumatoide y la invasión de células cancerígenas. La dilución utilizada fue 1:50 con 30 min en tripsina.

Anti-Inhibidor metaloproteinasa tipo I (TIMP-1)

La TIMP-1 humana puede ser reconocida a 28 kD y puede reaccionar con el complejo MMP/TIMP-1. Este anticuerpo puede ser utilizado en secciones de parafina fijadas con PLP (peróxido, lisina en paraformaldehído al 4 %) y en formaldehído al 10 %. La dilución utilizada fue 1:100 con 30 min en tripsina.

Analisis histomorfométrico

Las preparaciones histológicas teñidas con Safranina-O fueron evaluadas con histomorfometría. Se procedió al análisis de imagen, previo diseño de un programa específico para las mediciones, analizando el área total de cartílago, el porcentaje de área teñida con Safranina-O, la media de escala de gris (promedio de intensidad de la tinción) y el índice de escala de gris (cantidad total relativa de glicosaminoglicanos).

Las secciones histológicas fueron captadas digitalmente a través de un estereomicroscopio (modelo WILD M3Z®) con un dispositivo de vídeo a color de alta resolución (Cámara de vídeo de alta resolución 712 x vertical 512 pixels, montada en el estereomicroscopio).

Basándonos en otros trabajos ⁽¹⁶⁸⁾ que sugerían una mejoría en la uniformidad de la imagen, realizamos la conversión de la calidad de color después de una conversión a la escala de grises.

El límite entre el área teñida con Safranina-O y la no teñida fue determinado visualmente con el uso de la función de densidad de color contenida en el software. El umbral de esta función permite que la imagen capturada se diferencie en la escala de grises, con un límite superior y otro inferior.

Se midió el área de cartílago teñida con Safranina-O y se calculó tanto el promedio de la intensidad de la tinción como la media de la escala de grises dentro del área. El porcentaje del área teñida fue calculada dividiendo el área teñida con Safranina-O entre el área de cartílago total. El índice de escala de grises representa la cantidad total de glicosaminoglicanos en el cartílago y fue expresado como el producto del área teñida y la media de escala de grises de esta área.

Marcaje con flurocromos

Se inyectaron fluorocromos para estudiar la integración de la porción ósea al injerto, utilizando tres marcadores distintos, administrados por vía intramuscular:

Alizerina (rojo)(Sigma®)	30 mg/Kg
Calceína (verde) (Sigma®)	5 mg/Kg
Oxitetraciclina (amarillo) (Duphacycline®)	20 mg/Kg

En los corderos donantes, se inyectó alizerina una semana antes de la extracción de los injertos. Los marcadores utilizados en los corderos receptores fueron la calceína y la oxitetraciclina. Se administraron 40 ml aproximadamente de calceína, dos meses después de la cirugía, el segundo marcaje se realizó 5 meses después de la cirugía, administrando 5 ml de oxitetraciclina.

En todos los casos fue necesario preparar una disolución de los marcadores utilizando agua deionizada. Tras la disolución se procedió a estabilizar el pH, hasta alcanzar valores comprendidos entre 7,2 - 7,4. Las soluciones se filtraron en condiciones de esterilidad.

Procedimiento

Se tallaron las piezas que previamente fueron cortadas con la sierra de diamante (Exakt®). La longitud máxima de la pieza no superó los 3 cm y la anchura los 1,5 cm. Posteriormente se fijaron en formol, al 10 % tamponado con fosfatos, durante 96 horas; se deshidrataron mediante la inmersión sucesiva en alcoholes de gradación creciente. Los tiempos de permanencia en cada alcohol fueron de 24 horas, con un cambio a las 12 horas.

Posteriormente, se procedió a la infiltración de las muestras en una mezcla formada al 50 % de alcohol absoluto y Technovit 7200 VLC®, durante una semana, para incluirla después, únicamente, en Technovit 7200 VLC® durante tres semanas. Finalizado el plazo se polimerizaron las piezas en un fotopolimerizador (Histolux, Exakt®).

Tras obtener cortes de 1 mm de espesor, con la sierra de diamante, se procedió al pulido con papel de lija de diferentes tipos de grano, hasta conseguir un grosor entre 10 y 20 µm.

Estudio del líquido sinovial

Obtención

Se inyectaron 10 ml de suero fisiológico estéril, al 0,9 %, con un abordaje suprapatelar medial y se realizó aspiración del líquido inyectado. El fluido se recogió en recipientes de 20 ml estériles especiales para congelación (SARSTEDT®), a -80° C. Para su estudio se realizó una centrifugación del líquido a 1000 g durante 10 min. para remover las células y los desechos.

Determinación de GAG por ensayo con Azul de Dimetilmetileno

El uso del azul de dimetilmetileno (ADMM) fue adaptado del método de Farndale ⁽⁵²⁾. Las muestras de líquido sinovial (500 µl) fueron colocadas en recipientes de plástico y diluidas a 5 ml, con 50 mM, de solución buffer fosfato (PB), a pH 7, teniendo especial cuidado de lavar la punta de la pipeta con el fin de evitar el error por mezcla. Dichas muestras, se alicuotaron, a 100 µl, en tubos de poliestireno. Se añadió una nueva concentración del mismo buffer conteniendo N-acetilcisteína (concentración final de 2

mmol/l) y papaína, 0,13 U, y las muestras fueron incubadas a 65 °C durante 2 horas. Después de la digestión, la papaína fue inactivada con ácido yodo-acético (concentración final 4 mmol/l) y la concentración de NaCl de la digestión fue ajustada a 0,5 mol/l en un volumen final de 250 µl.

Se añadieron 2,5 ml del reactivo ADMM (3,04 g de glicina, 2,37 g de NaCl, y 16 mg de azul de 1,9-dimetilmetileno en un litro de agua desionizada y se ajustó el pH a 3 con ácido clorhídrico). La absorbancia fue leída a 540 nm en un espectofotómetro Titertek Multiskan® Plus MKII. El ensayo de ADMM fue calibrado con condroitín sulfato C, obtenido de cartílago de tiburón (C-4384, Sigma ®).

Análisis estadístico

Para la comparación entre los distintos grupos se utilizó el test de la t de Student, para muestras independientes si la variable en estudio seguía una distribución normal, y el test de Kruskal – Wallis seguido de la U de Mann – Whitney si no la seguía.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 9.00 para Windows

RESULTADOS

Estudio radiológico

A los cóndilos femorales, después de su extracción y desarticulación, se les realizó una radiografía antero-posterior, evaluada de manera subjetiva, analizando el colapso del injerto y el aplanamiento del cóndilo femoral medial. No se observaron signos de degeneración articular.

Grupo I

Sólo en dos casos se observaron datos radiológicos correspondientes al colapso del injerto y en uno de ellos se visualizó el aplanamiento del cóndilo femoral.

Grupo II

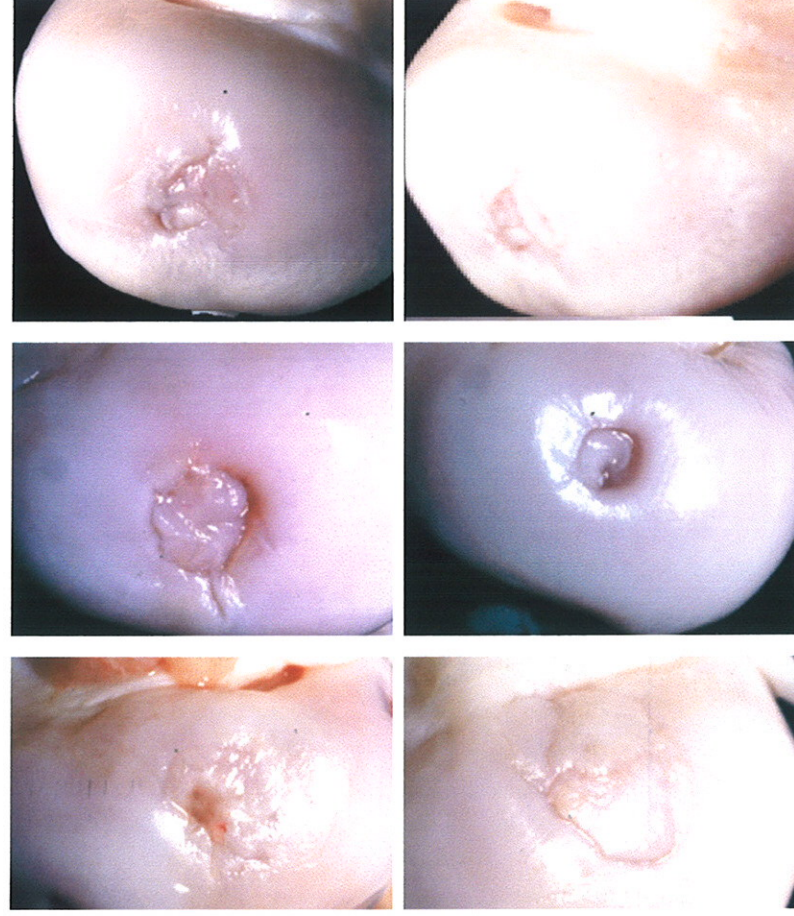
En cuatro casos se vió el colapso del aloinjerto y en tres de ellos se apreció el aplanamiento del cóndilo femoral.

Grupo III

Al igual que el grupo anterior, no presentó datos radiológicos compatibles con colapso del aloinjerto, y tampoco se observó el aplanamiento del cóndilo femoral.

Análisis del aspecto macroscópico de los aloinjertos (Figura 9)

La superficie cartilaginosa de los injertos osteocondrales no mostraron, en ningún grupo estudiado, una integración del cartílago trasplantado con el cartílago receptor. En todos los casos se observó el límite entre uno y otro. Se apreciaron colapsos y adelgazamientos del injerto y no se apreciaron diferencias entre los injertos tratados con criopresaervador y los que no lo fueron así como tampoco entre las diferentes temperaturas de conservación.



I II III

Figura 9. Aspecto macroscópico de los aloinjertos osteocondrales, en los distintos grupos, a los cinco meses de su implantación

Análisis histológico (Fig 10).(Fig 11).(Fig 12)

Grupo I

El cartílago que rodeaba al injerto presentó signos degenerativos en los bordes de transición entre el receptor y el injerto, donde se observó el predominio de clones celulares, que en una de las seis muestras, el injerto fue sustituido por tejido conectivo fibroso, vascularizado, con un infiltrado inflamatorio de tipo crónico.

De las cuatro muestras que conservaron la porción cartilaginosa del injerto en algunas permaneció un espacio entre el tejido receptor y el injerto y en otras, el cartílago se coaptó sin dejar espacio entre ellas.

En las muestras con un espacio entre el injerto y el tejido del receptor se observó el desarrollo de un tejido conectivo de características de tejido fibroso laxo que proliferó y se infiltró entre la porción ósea y la cartilaginosa del injerto.

La porción cartilaginosa presentó un adelgazamiento y características de fibrocartílago, con la sustitución de la matriz extracelular por haces fibrosos desorganizados. Se observó la presencia de condrocitos en su mayoría no viables.

De la misma manera que en los grupos anteriores en tres de las seis muestras se observó un colapso de la porción ósea que dejaba una cavidad recubierta por tejido conectivo fibroso que, en ocasiones, presentaba escasos islotes de tejido fibrocartilaginoso acelular y de características no viables.

Grupo II

El cartílago que rodeaba al injerto presentaba signos degenerativos con clones celulares y áreas de hipocelularidad. La porción cartilaginosa del cilindro mostró características de fibrocartílago, la matriz extracelular fue sustituida por haces de colágeno desorganizados, entre los cuales se observaron condrocitos no viables. En las áreas de transición de las muestras que presentaban un espacio entre el cartílago receptor y el donante, proliferó un tejido conectivo fibroso vascularizado que se infiltró hacia la porción ósea.

Cuatro de las seis muestras presentaron colapso, dejando una cavidad que en tres de ellas fue recubierta por tejido conectivo fibroso y no presentaron restos cartilaginosos. Por

otro parte, en una de las muestras se observó un islote de fibrocartilago acelular entre el tejido conectivo fibroso.

Grupo III

En la mayoría de las muestras permanecía la porción cartilaginosa del injerto que en un caso fue sustituida parcialmente, por tejido conectivo fibroso desarrollado desde las zonas de transición y que infiltró al injerto. Las porciones cartilaginosas que se conservaron presentaron características de fibrocartilago con escasos condrocitos. El tejido conectivo presentó abundantes fibroblastos y vasos sanguíneos. Los remanentes de tejido cartilaginoso del injerto, no mostraron colapso.

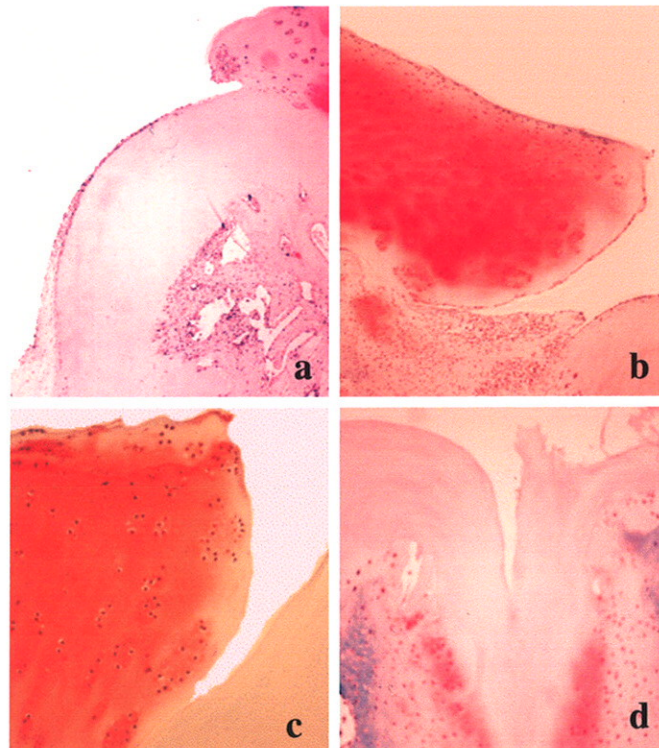
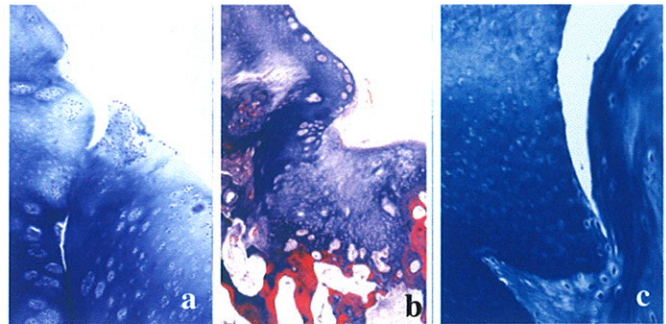
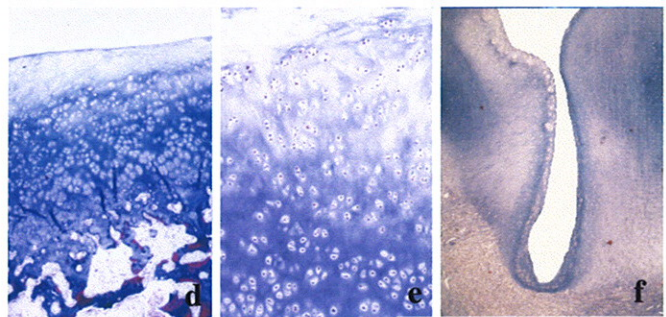


Figura 10. Diversas uniones cartílago receptor - aloinjerto. a) Integración completa injerto - receptor (Grupo I) (x40), b) tejido fibroso en la unión injerto - receptor (Grupo I) (x100). c) unión completa cartílago - receptor (Grupo III) (x100), d) unión injerto - receptor (Grupo III) (x40).

GRUPO I



GRUPO II



GRUPO III

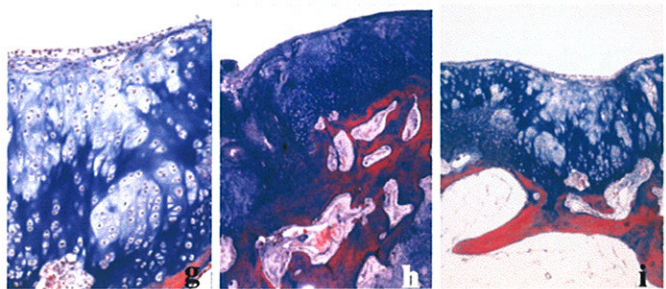


Figura 11. Unión injerto-receptor (Tricrómico de Masson). Grupo I a) x40, b) x40, c) x100. Grupo II d) x40 e) x100 f) x100. Grupo III g) x100 h) x40 i) x40.

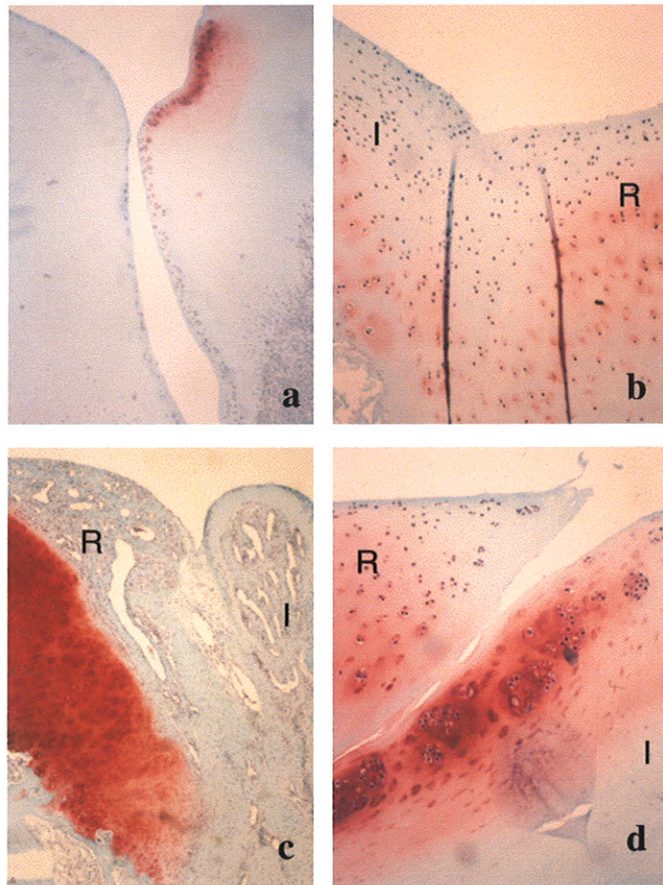


Figura 12. Uniones injerto osteocondral - cartílago receptora (Safranina - O).a) pliegue en el injerto Grupo I (x40), b) unión completa injerto - receptor Grupo II (x40), c) Grupo III (x40), d) Grupo III (x40)

Analisis histomorfométrico

En el análisis histomorfométrico, teniendo en cuenta la variable tiempo, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el porcentaje de área teñida con Safranina-O del Grupo II con el Grupo III, siendo este último el que presentaba menor porcentaje de área.

Por otro lado, teniendo en cuenta la variable criopreservador (con o sin DMSO), no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

Los resultados obtenidos para área teñida con Safranina-O, área total, porcentaje teñido e índice gris para cada grupo se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

	Área Safranina (mm ²)		Área Total (mm ²)		%Safranina O		Índice Gris	
	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS
GRUPO I	0,79	0,39	1,31	0,21	59,56	24,85	128,19	63,96
GRUPO II	0,58	0,15	1,12	0,36	56,68	22,93	94,77	24,68
GRUPO III	1,43	0,59	4,35	0,90	33,01	12,25	232,71	95,48

Inmunohistoquímica

Colágeno II (Fig 13)

Grupo I

El cartílago que rodeó el injerto presentó inmunorreactividad. La porción cartilaginosa del injerto no presentó inmunorreactividad o fue muy escasa rodeando algunos condrocitos viables en los remanentes cartilagosos.

Grupo II

En el cartílago que rodeaba el injerto se observó inmunorreactividad al igual que en el resto del cartílago del receptor. La porción cartilaginosa, en forma de islotes adelgazados, mostró una inmunorreactividad muy escasa o nula.

Grupo III

El cartílago que rodeaba al injerto presentó inmunorreactividad evidente, y las porciones cartilaginosas que se conservaron del injerto también mostraron inmunorreactividad. Las porciones cartilaginosas sustituidas por tejido conectivo fibroso no mostraron inmunorreactividad.

Colágeno X (Figura 14)

Grupo I

La porción cartilaginosa que rodeaba al injerto presentó escasa inmunorreactividad.

Grupo II

El cartílago alrededor del injerto presentó escasa inmunorreactividad. El cartílago del injerto fue hipocelular o incluso acelular y no mostró inmunorreactividad.

Grupo III

Se observó inmunorreactividad difusa en los remanentes de la porción cartilaginosa del injerto aunque estos fueron casi completamente acelulares.

FGFa

Grupo I

La inmunorreactividad se localizó en el tejido conectivo fibroso laxo, en las células fusiformes. El cartílago, en cuatro de las seis muestras, presentó características de fibrocartílago y escasa inmunorreactividad. El tejido conectivo en una de las muestras sustituyó al injerto y mostró inmunorreactividad.

Grupo II

En todas las muestras la porción cartilaginosa del injerto presentó una marcada inmunorreactividad. En las zonas de transición se observó tejido conectivo fibroso laxo vascularizado que presentó una evidente inmunorreactividad en células de apariencia fibroblástica.

Grupo III

Presentó inmunorreactividad muy evidente en el tejido conectivo fibroso que sustituyó a la porción cartilaginosa del injerto y en el situado entre la porción ósea y los remanentes cartilaginosos del injerto que se conservaron.

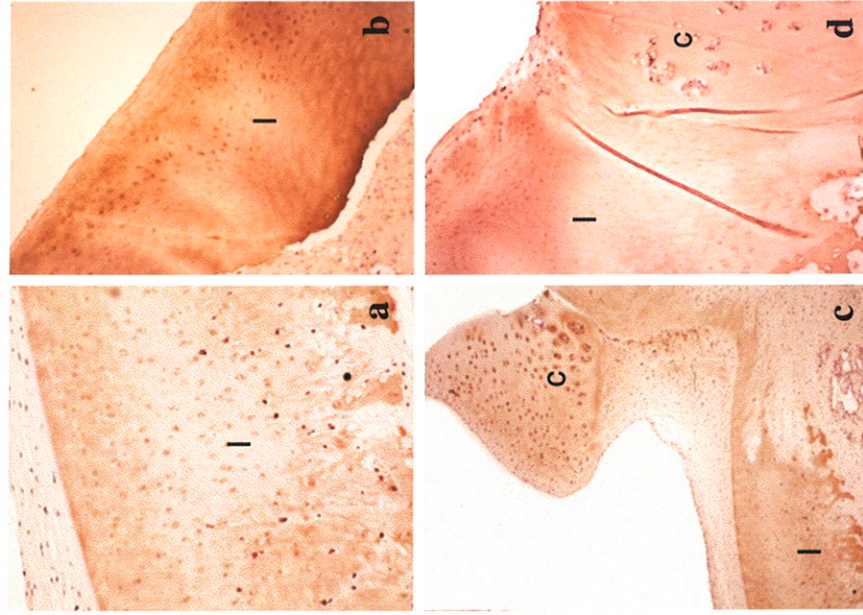


Figura 13. Inmunorreactividad frente anticuerpo anti colágeno II. a) Grupo I (x100), b) Grupo II (x40), c) Grupo III (x40), d) Grupo III (x100), (I = injerto; c = cartílago receptor)

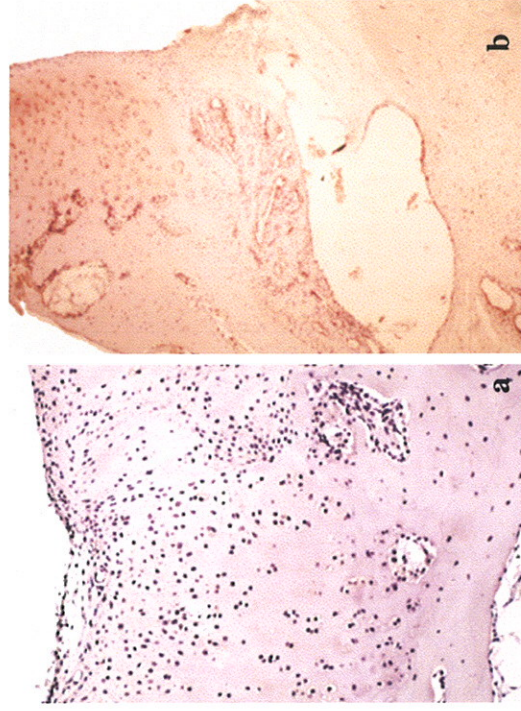


Figura 14. Inmunorreactividad frente a anticuerpo anti-colágeno X, alrededor de condrocitos hipertróficos. a) Grupo II (x40) b) Grupo III (x100)

FGFb

Grupo I

Los injertos conservaron la porción cartilaginosa sin mostrar inmunorreactividad.

Grupo II

Los injertos conservaron la porción cartilaginosa aunque con características de fibrocartilago inmunorreactivo. Se observó también la presencia de tejido conectivo fibroso laxo vascularizado con inmunorreactividad alrededor de células fusiformes de características fibroblásticas que se infiltraban desde las áreas de transición hasta la porción ósea.

Grupo III

La inmunorreactividad fue escasa en los remanentes de la porción cartilaginosa de injerto y muy intensa en el tejido conectivo fibroso vascularizado que los englobaba y sustituía en casi toda su totalidad.

S-100 (Fig 15)

Grupo I

Se observó inmunorreactividad de los condrocitos en los restos de cartilago y en las células fusiformes del tejido conectivo fibroso que proliferaban en las zonas de transición, donde también se observó inmunorreactividad en las células de apariencia condroide localizadas en el tejido conectivo fibroso que se encontraba en contacto con las trabéculas óseas.

Grupo II

Los restos de cartilago presentaron células de tipo condroide inmunorreactivas, en las zonas superficiales y en la unión con el hueso subcondral. Se observó también inmunorreactividad en las células de características fibrocondroide, localizadas en el tejido conectivo fibroso de las zonas de transición y en las células de aspecto condroide del tejido que se encontraba en contacto con las trabéculas óseas.

Grupo III

La mayor parte de las muestras no presentó inmunorreactividad.

Metaloproteinasas (Figura 16)

MMP-1

Grupo I

El tejido cartilaginoso del huésped en contacto con el injerto presentó inmunorreactividad moderada alrededor de los condrocitos. Los remanentes cartilaginosos, casi completamente acelulares no mostraron inmunorreactividad al igual que el tejido conectivo fibroso.

Grupo II

La inmunorreactividad fue escasa, tanto en el tejido cartilaginoso del huésped en contacto con el injerto como en los remanentes cartilaginosos del injerto y en el tejido conectivo fibroso de las áreas de transición.

Grupo III

En ninguna de las preparaciones se apreció inmunorreactividad.

MMP-2

Grupo I

En la porción cartilaginosa fue posible observar inmunorreactividad de manera escasa y difusa y ésta se localizó en células de aspecto fibrocondroide encontradas en el tejido conectivo fibroso que proliferó desde las zonas de unión entre el injerto y el tejido del huésped.

Grupo II

En la porción cartilaginosa fue posible observar inmunorreactividad evidente distribuida de manera difusa. En el tejido conectivo fibroso se observó inmunorreactividad de escasa a moderada intensidad, localizada sobre los grupos de células de aspecto fibrocondroide.

Grupo III

En este grupo fue posible observar inmunorreactividad evidente en los remanentes cartilaginosos y en el tejido conectivo que proliferó desde las áreas de transición.

MMP-3

Grupo I

En este grupo la inmunorreactividad fue evidente, localizada de forma difusa entre las áreas acelulares, alrededor de grupos de clones celulares y algunos condrocitos aislados de los remanentes cartilaginosos. También se observó marcada inmunorreactividad en el tejido conectivo fibroso, concentrándose alrededor de células de aspecto fibrocondroide.

Grupo II

Los remanentes de cartílago presentaron inmunorreactividad evidente, distribuida de manera difusa en toda su extensión. Fue muy notoria la inmunorreactividad presentada en el tejido conectivo fibroso, en este tejido fue posible observar nuevamente células de tipo fibrocondroide.

Grupo III

La marcada inmunorreactividad presentada por este grupo estuvo distribuida de manera difusa dentro de los remanentes cartilaginosos y en las áreas de tejido conectivo. Se observó especial marcaje alrededor de las clásicas células fibrocondroides características de este tejido fibroso.

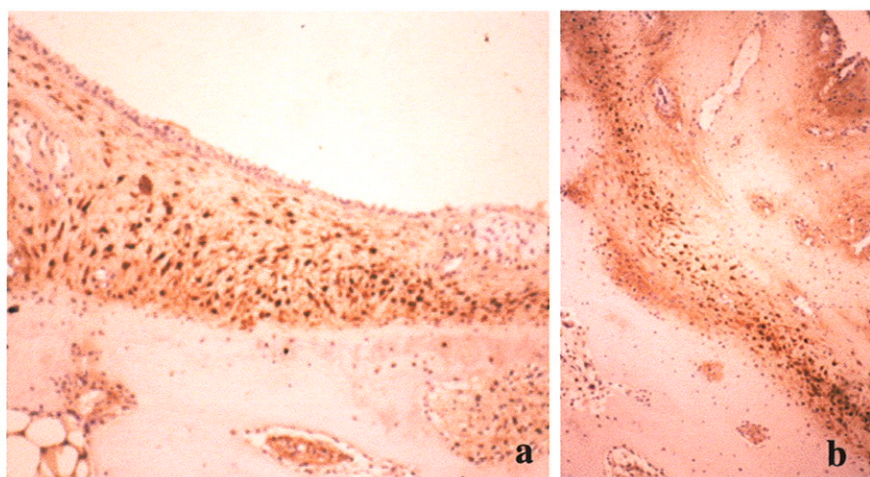


Figura 15. Marcaje con anticuerpo anti S-100. a) y b) inmunorreac-
tividad en bandas de células fibrocondroides, Grupo III (x40).

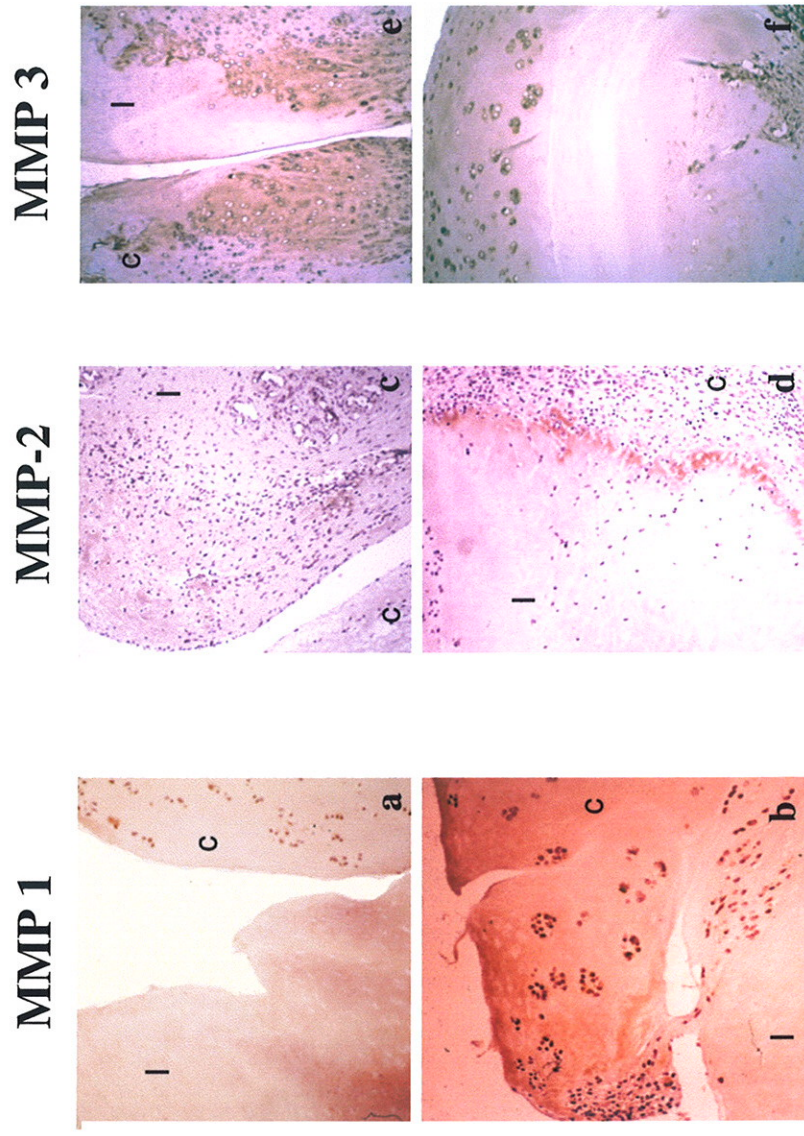


Figura 16. Inmunorreactividad frente MMP-1, MMP-2 y MMP-3. a) Grupo II (x100), b) Grupo III (x100), c) Grupo I (x100), d) Grupo II (x40), e) Grupo I (x100) (I= injerto; c = cartílago receptor)

TIMP-1

Grupo I

El grupo I no presentó inmunorreactividad.

Grupo II

En la mitad de las muestras no se encontró inmunorreactividad mientras que en la otra mitad fue escasa y muy difusa.

Grupo III

Se presentó inmunorreactividad difusa en toda la extensión de las muestras. Tan sólo en un espécimen no se observó inmunorreactividad.

Marcaje con Fluorocromos (Fig 17)

En general, la observación de las muestras marcadas con fluorocromos de los seis grupos mostró el mismo patrón de distribución de los marcajes, confirmando la adecuada incorporación de la porción ósea del injerto. Se encontró una distribución centripeta de los marcajes, de acuerdo a la secuencia de administración de los mismos. En la mayor parte de las muestras, el marcaje con alizerina, inyectada en los animales donantes, había desaparecido casi por completo, aunque permanecía en pequeñas zonas centrales o de localización subcondral, siempre rodeado por marcaje verde y amarillo. La secuencia de las marcas se mantuvo en toda la extensión del cilindro, siendo el color predominante el verde, aunque, en general la secuencia de colores permaneció distribuida de manera semejante en todos los grupos.

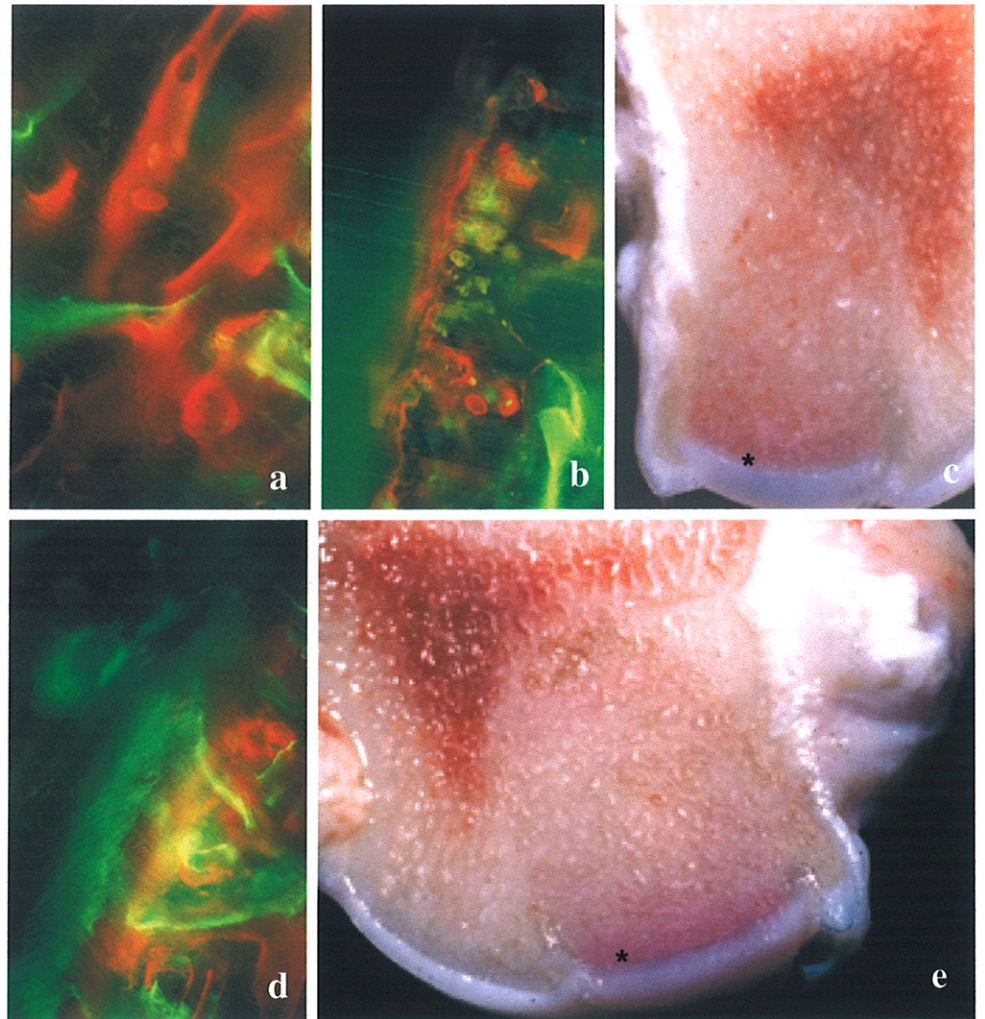


Figura 17. Integración ósea del aloinjerto osteocondral. a) b) y d) restos de alizerina en el hueso trasplantado. c) y e) Corte del cilindro trasplantado en un animal fallecido al mes de la intervención. Se aprecian restos de alizerina en el hueso subcondral (*) y falta de penetración de la médula ósea en el injerto.

Concentración de glicosaminoglicanos (Líquido sinovial)

El líquido sinovial fue evaluado por medio de un estudio espectrofotométrico y los resultados obtenidos, comparados en sí mediante el test estadístico correspondiente, mostraron que las concentraciones de glicosaminoglicanos fueron mayores en los corderos del Grupo III. Dichos valores presentaron diferencias muy significativas ($p \leq 0,002$) con respecto al grupo control.

En los demás grupos, aunque todos ellos presentaron concentraciones más elevadas que el líquido sinovial normal, no se presentaron diferencias significativas (Fig. 18).

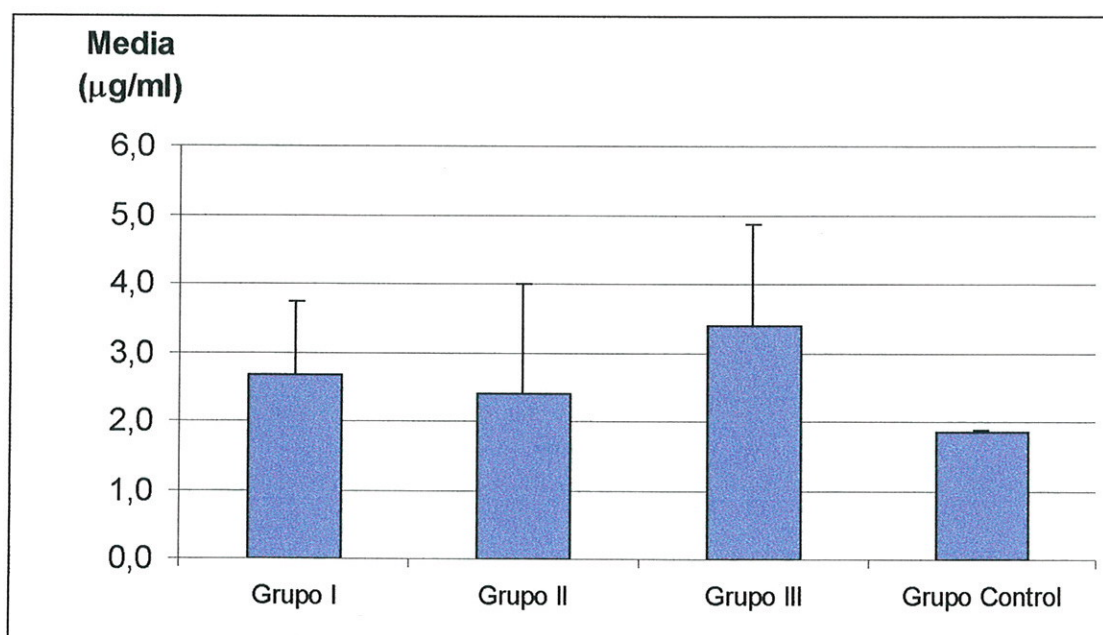


Fig. 18. Concentración de glicosaminoglicanos en líquido sinovial

DISCUSIÓN

Como animal de experimentación se eligió el cordero (*Ovis aries*), de 4-6 meses de edad y con un peso comprendido entre los 20-30 Kg, debido a su docilidad y el hecho de que como animal de rebaño, su interacción con otros animales de su misma especie es adecuada, permite que sea estabulado en un habitáculo común y aunando a la facilidad de su manejo. Además, a esta edad, el cordero presenta una madurez músculo-esquelética apropiada y representa un buen modelo experimental dentro de la escala filogenética y su condición de cuadrúpedos brinda una mejor opción de carga frente a otras especies filogenéticamente inferiores como los conejos y cobayas ^(23,118).

El cartílago de la zona distal del fémur en el cordero es de espesor inferior al humano pero lo suficientemente grueso como para ser estudiado histológica e histomorfométricamente. El hueso del cordero en la extremidad distal del fémur es una combinación de hueso reticular y laminar, con una vasta vascularización que ayuda a la integración de la porción ósea del injerto siendo un modelo adecuado para evaluar el proceso reparativo de las lesiones cartilaginosas.

Patofisiología y mecanismos reparativos del cartílago articular

El proceso reparativo del cartílago articular consiste en el reemplazo de la matriz extracelular y las células, dañadas o perdidas, por nuevo tejido. Los cambios histopatológicos del cartílago varían de acuerdo con el tipo de lesión. Por ejemplo, si la lesión se relaciona con un mecanismo de contacto persistente en una zona de la articulación, se observa, siguiendo el baremo de Outerbridge ⁽¹³³⁾, un reblandecimiento temprano de cartílago (Grado I); fibrilación en el defecto articular (Grado II); fisuras o grietas en la lesión (Grado III) hasta llegar a la exposición del hueso subcondral (Grado IV).

Si el defecto es causado por una lesión penetrante, una lesión aguda por abrasión, o un traumatismo contuso, la reacción del cartílago es diferente.

Como es sabido, la reparación de las lesiones tisulares del sistema músculo-esquelético empieza con el fenómeno de la inflamación que fomenta un aumento del riego sanguíneo en la zona lesionada, con la migración de células mesenquimales que proliferan, se diferencian y organizan para, finalmente, reparar el tejido lesionado. Debido a que el cartílago articular adulto es un tejido avascular, las lesiones en este tejido no comienzan

con el proceso inflamatorio. El cartílago carece de esta compleja cascada de eventos, a través de los cuales las células lesionadas ayudadas por otras células propias del proceso inflamatorio, como las plaquetas y los mediadores quimiotácticos liberados por éstas fomentan la migración de células mesenquimatosas indiferenciadas que colonizarán el coágulo de fibrina para proliferar y diferenciarse hacia el nuevo tejido.

El mecanismo de reparación involucrado depende de si la lesión se restringe al cartílago articular o se extiende hasta el hueso subcondral. Las laceraciones y abrasiones, causadas por algún objeto punzante o cortante, limitadas al cartílago articular no curan completamente, a diferencia de las que llegan hasta el hueso subcondral ^(69,98,116,152). En respuesta a una lesión los condrocitos proliferan e incrementan la síntesis de matriz que es insuficiente y fallan en su intento de restaurarla, incluso si el defecto es pequeño ⁽⁶⁹⁾.

Por la baja densidad celular y la falta de capacidad de los condrocitos para migrar hacia el defecto, la reparación requiere un considerable esfuerzo proliferativo, en un tejido ya comprometido por falta de riego sanguíneo. Cuando la lesión se extiende hasta el hueso subcondral, las células de la médula ósea y los vasos sanguíneos tienen acceso al defecto por lo que algunas lesiones se reparan aunque el resultado difiere del cartílago articular normal ⁽⁹⁸⁻⁹⁹⁾. Experimentalmente, en la mitad de las lesiones no se mantiene la integridad del tejido mas allá de 6 meses, después de los cuales se empieza a presentar fibrilación del cartílago, fisuras, y cambios degenerativos. Esto se explica porque el tejido de reparación es un tejido cicatrizal, en el cuál la macromolécula predominante de la matriz es el colágeno tipo I que no está diseñado para oponerse a las sollicitaciones a compresión, indispensable para cumplir adecuadamente las funciones del cartílago articular.

Las células que se encargan de la reparación no son capaces de producir las macromoléculas características del cartílago articular en cantidad suficiente para crear una matriz extracelular fuerte y cohesiva y fallan al organizar las moléculas que desarrollan la estructura normal de la matriz del cartílago.

Existen estudios que describen cómo el tamaño de la lesión condral influye directamente en la reparación ⁽¹¹²⁾, lesiones menores de 1 mm de diámetro curan con mucha facilidad mientras que lesiones de 3 mm de diámetro son más complicadas de reparar ^(116,179). Otro factor pronóstico del éxito en la reparación es cuando el defecto del cartílago

contacta con otra superficie articular. Se ha comprobado que los defectos osteocondrales que articulan con el cartílago de la superficie opuesta presentan una pobre curación en comparación con los que no articulan ⁽¹⁷⁹⁾.

También el movimiento es usado para la rehabilitación del defecto. La inmovilización no favorece la regeneración del cartílago, mientras que el movimiento pasivo es beneficioso ^(18-19,155-156). En clínica, la utilización de una máquina de movimiento continuo pasivo (MCP), después de la cirugía, 6-8 horas al día, junto con carga parcial y un régimen de ejercicios isométricos, parece mejorar la curación de defectos cartilaginosos después de tratamientos como el debridamiento, microfracturas y perforaciones en el defecto ⁽¹⁵²⁾. Sin embargo, hay estudios que sugieren que la resistencia del tejido de reparación no depende de la carga y el movimiento ⁽¹⁵³⁾.

La reparación de las lesiones articulares mejora cuando la lesión se extiende hacia hueso subcondral, gracias a que la matriz ósea contiene factores de crecimiento y diferenciación que estimulan la reparación del cartílago ^(19,57,80,150,165).

Las células cartilaginosas difieren en su actividad metabólica según la zona donde ocurra la lesión. Las células de la zona superficial tangencial son aplanadas y tienen una mínima actividad metabólica ^(15,57) mientras que las de la zona calcificada están degeneradas o muertas. La orientación de las fibras de colágeno en las diferentes zonas también es de interés, cerca de la superficie, las fibras de colágeno son paralelas a la superficie articular, mientras que en la zona de transición, se encuentran orientadas verticalmente ^(15,74), en la zona radial se disponen perpendiculares a la superficie articular y en la zona de transición tienen una disposición arciforme.

Una lesión profunda produce un combinado de células en el interior del cartílago además de penetrar células de la membrana sinovial.

El tejido cartilaginoso no posee terminaciones nerviosas; el dolor asociado con las lesiones degenerativas proviene de los tejidos cercanos, consecuencia de la tensión al cual está sometido el hueso subcondral o el tejido sinovial, el cuál frecuentemente se encuentra inflamado, de los ligamentos y la cápsula articular, que se tensan y estiran por la inestabilidad o de los tendones y músculos, próximos a la articulación, que suelen presentar espasmos.

En la osteocondritis disecante, la patofisiología es diferente. La lesión puede variar desde una forma leve, afectando a una pequeña parte de la articulación, a formas más graves, que alteran una porción mayor, con una necrosis extendida. En la rodilla, el fragmento femoral es referido como a que está disecado del hueso, de ahí el nombre de osteocondritis disecante. Esta patología es propia de la cara lateral del cóndilo medial, aunque puede encontrarse en otras articulaciones del cuerpo. El paciente puede estar asintomático durante la fase avascular y aparecer un dolor leve durante la fase de revascularización ^(24,188).

Si la disección es más completa, el fragmento y el cartílago suprayacente pueden perderse parcialmente y cuando el fragmento se desprende, la articulación se bloquea. La necrosis avascular secundaria es otra forma de lesión avascular del hueso subcondral asociada con la anemia de células falciformes o enfermedad de Gaucher, con el alcoholismo crónico, las altas dosis de esteroides, particularmente en pacientes con trasplante renal, y con la enfermedad de Caisson, por descompresión o enfermedad del buzo. También hay causas de origen traumático como la luxación de cadera, las fracturas del cuello femoral o las fracturas-luxación del astrágalo.

El colapso del hueso subcondral propio de la artrosis usualmente no ocurre en los primeros dos años después del inicio de la lesión avascular. El inicio de la sintomatología está caracterizado por el dolor progresivo de la articulación después de una lesión menor. La radiología muestra esclerosis en parches del hueso subcondral y muestra un colapso subcondral, manifestado por el signo crescente, por debajo de la superficie articular. El hueso avascular es eventualmente remodelado, pero se pierde la congruencia articular que ocasiona el desarrollo de la artrosis.

Nuestro trabajo propone el uso de aloinjertos osteocondrales criopreservados como alternativa en el tratamiento de lesiones articulares focalizadas. El objetivo es producir con un trasplante de aloinjerto osteocondral criopreservado, superficies articulares de cartílago hialino capaces de soportar las sollicitaciones de carga corporal. Se han obtenido resultados favorables con el uso de autoinjertos osteocondrales obtenidos en zonas de descarga ^(64,103), derivando la carga en el preoperatorio inmediato ⁽⁶⁵⁾. Con esta técnica se ha producido de 60 % a 80 % de cartílago hialino y entre 20 % y 40 % de fibrocartílago en el lugar receptor.

Posibilidades terapéuticas de las lesiones del cartílago

Los procedimientos propuestos actualmente pueden demorar la degeneración articular pero no evitarla ^(25,71,74,147,177). Cuando la lesión osteocondral es pequeña, menor de 2 cm de diámetro con bordes cartilaginosos firmes, técnicas como las que estimulan a la médula ósea con perforaciones, microfracturas o artroplastias de abrasión pueden ser de ayuda para rellenar el defecto con un tejido fibroso, que a diferencia de la superficie convexa normal del cóndilo femoral, el tejido resultante suele tener una superficie cóncava, al rellenarse el defecto, la lesión permanece silente inicialmente.

Clasificación de técnicas terapéuticas

1. Lavado y Abrasión
2. Estimulación de medula ósea
 - Perforaciones
 - Microfracturas
3. Osteotomías
4. Injertos
 - Periostio / Pericondrio
 - Mosaicoplastia
 - Implante sintéticos
 - Injertos osteocondrales
5. Ingeniería tisular
 - Implantación de condrocitos autólogos
 - Factores de crecimiento
 - Terapia génica
6. Artroplastias

1.- Lavados y abrasión articular

Una de las técnicas de tratamiento básicas es el lavado articular para remover de la articulación, por vía artroscópica, los cuerpos libres, los residuos articulares y los mediadores de la inflamación presentes en el líquido articular. Se observa mejoría en la sintomatología del paciente ⁽⁷³⁾. El lavado puede proveer un alivio temporal de la

sinomatología de hasta 3 años, aunque los resultados clínicos obtenidos son insuficientes en atletas o en pacientes activos.

La abrasión es una debridación del defecto articular que llega a los bordes de tejido normal de forma que el colágeno expuesto se une al coágulo de fibrina. El hueso subcondral queda expuesto y superficialmente penetrado, formando un coágulo de sangre sobre su superficie que se diferencia posteriormente en fibrocartílago e incrementa la cantidad de colágeno tipo II, hasta 2 años después de la intervención.

2.- Técnicas de estimulación de médula ósea

Engloban varios procedimientos para estimular la reparación del cartílago, intentando utilizar células madre, capaces de diferenciarse en hueso y cartílago bajo la influencia de los factores biológicos y mecánicos. Para ello se perfora el hueso subcondral hasta alcanzar la zona vascularizada, estimulando la formación de un coágulo de fibrina que contiene las células madre pluripotenciales que se diferencian y remodelan, produciendo un tejido fibrocartilaginoso.

Hay controversia en el uso de este tipo de técnicas, pues las células pluripotenciales liberadas de la médula ósea, se diferenciarán hacia tejido de reparación y con un estímulo adecuado, hacia cartílago. Sin embargo, también parece que el coágulo con las células madre pluripotenciales, se desprende de la zona de la lesión al liberar el torniquete una vez terminada la intervención y el líquido sinovial no permite la coagulación de la sangre.

a) Perforaciones del hueso subcondral

Es una variante de las técnicas de estimulación de médula ósea que consiste en realizar perforaciones en el hueso subcondral expuesto de tal manera que origina la formación de un coágulo de fibrina ⁽³²⁾. El cartílago y el fibrocartílago de reparación cubre los orificios realizados. En la literatura se han reflejado buenos resultados con el uso de esta técnica clásica (a 62 meses, 70,8 % excelentes resultados, 15,4 % buenos y 6,9 % malos) ⁽¹⁸²⁾. El efecto positivo de las perforaciones también ha sido puesto en duda por muchos autores.

b) Microfracturas

Es una técnica de estimulación de médula ósea, semejante a la anterior. El hueso subcondral es expuesto y se realiza una cuidadosa abrasión mientras que el cartílago dañado es debridado hasta llegar al cartílago sano. El hueso subcondral es fracturado con

pequeños punzones comunicando con la médula ósea, con la consiguiente formación de un coágulo.

3.-Técnicas de modificación del eje de la extremidad:osteotomías

La mala alineación de un hueso, produce una sobrecarga que predispone a lesiones degenerativas focales de la superficie articular por lo que la corrección quirúrgica de las deformidades, en varo y valgo, en combinación con las técnicas de estimulación de médula ósea puede ser una indicación.

4.-Técnicas de reparación biológica:tratamiento con injerto autólogo

a) Injertos de periostio y pericondrio

Son técnicas utilizadas para la reparación de la superficie articular lesionada, que tienen como objetivo producir cartílago hialino viable. Estos tejidos contienen células mesenquimales indiferenciadas que pueden diferenciarse a cartílago y hueso según las circunstancias. Estudios realizados por varios autores han demostrado que el pericondrio colocado sobre la lesión articular estimula la formación de cartílago articular ^(68,128). El fenotipo de las células trasplantadas y el manejo postoperatorio, en zonas de baja tensión de oxígeno, en presencia de líquido articular y sometidos a movimientos continuos pasivos postoperatorios, pueden provocar la diferenciación en cartílago.

Las zonas donadoras de pericondrio son limitadas y el cartílago hialino que se produce suele degenerar en menos de un año mientras que los injertos de periostio producen un tejido, morfológica y bioquímicamente, muy similar al cartílago articular normal. Los resultados clínicos a corto plazo son alentadores, aunque su evolución a largo plazo no parece solucionar el problema.

b) Injertos en mosaico (Mosaicoplastia)

Esta técnica fue desarrollada y perfeccionada por Hangody ⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾, en Hungría, en los años 90. Los primeros trabajos experimentales se realizaron en 1991 y las primeras intervenciones clínicas en 1992.

Es un procedimiento único, en el cual autoinjertos osteocondrales cilíndricos son extraídos del sitio donante y transportados a nichos preparados en el sitio receptor. Los lugares más comúnmente usados como donantes son, en orden de preferencia, el área patelofemoral no sometida a carga, el área medial, lateral, el borde de la tróclea femoral y

la periferia de la escotadura intertroclear. Los orificios cilíndricos son de una profundidad y diámetro apropiados a los injertos tomados con lo que se restaura la curvatura original de la articulación.

Estudios experimentales han mostrado que para obtener buenos resultados debe de ser reparado, al menos, el 70 % del defecto y a las 10 semanas, el área injertada contiene un 60-70 % de cartílago hialino y un 30-40 % de fibrocartílago. Resultados idénticos han sido encontrados en biopsias realizadas en pacientes hasta 5 años después de la intervención, pero el hecho de que el sitio donante no sea área de carga condiciona un cartílago incapaz de cumplir con las propiedades mecánicas adecuadas.

c) Implante sintético de la superficie articular

También se ha propuesto el uso de diversos materiales sintéticos para tratar los defectos de la superficie articular, implantes de fibra de carbono, gel de polivinil-alcohol, redes de titanio y aluminio, etc.

Los implantes de fibra de carbono, se han utilizado en el tratamiento de las lesiones patelares, como la condromalacia, y de los cóndilos femorales, como la osteocondritis disecante. Este método fomenta el crecimiento dentro del implante de fibrocartílago y aumenta su durabilidad, siendo bien tolerado. Las series publicadas, experimentales y clínicas, no presentan resultados alentadores y aunque se trata de una técnica sencilla, su durabilidad es desconocida hasta el momento.

d) Aloinjertos osteocondrales

La extracción, procesamiento y preservación de injertos óseos son un procedimiento actualmente bien establecido. Los injertos de cartílago son una técnica poco utilizada por la dificultad de mantener viables los condrocitos, aunque en la actualidad se han propuesto técnicas de congelación que mantienen la viabilidad de las células condrales ⁽¹⁸³⁾.

Como la capa calcificada no ofrece fijación al hueso subcondral, se propuso el trasplante de la unidad osteocondral y el uso de aloinjertos osteocondrales tanto frescos como criopreservados, para la reconstrucción de los defectos articulares por traumatismos, artrosis u otras patologías como la osteocondritis disecante. También se han utilizado aloinjertos masivos para la sustitución de toda una superficie articular en la cirugía tumoral y pequeños injertos osteocondrales para el tratamiento de lesiones localizadas.

Los injertos masivos tienen una evolución más favorable que cuando se utilizan en las lesiones focales, de tal manera que hacia las 6 semanas se observa la integración en el hueso receptor, pero la parte cartilaginosa degenera presentando deterioro, con fisuras, fibrilación y fibrosis, sustituyendo cartílago hialino por fibrocartilago de propiedades mecánicas inferiores. Esto demuestra la dificultad de conseguir un protocolo de conservación adecuado que permita tener una viabilidad aceptable.

Wayne et al., ⁽¹⁹⁷⁾ estudiaron el efecto del almacenamiento de injertos osteocondrales durante 60 días, a 4°C, concluyendo que largos períodos de almacenamiento no son aconsejables para mantener la viabilidad de las células del cartílago, a menos que se modifiquen las condiciones de preservación.

En esa misma línea, Baver y Gross ⁽⁵⁾, vieron que los injertos osteocondrales frescos no congelados, ofrecían más esperanza de viabilidad a los condrocitos que los congelados.

Sin embargo, la dificultad de contar con injertos frescos ha obligado a buscar la forma de mantener la arquitectura microscópica de la superficie articular durante la congelación. Se ha propuesto que el mecanismo inmunológico puede ser la causa de la degeneración del cartílago y, una vez que se exponen los antígenos celulares del donante, la respuesta inmune es estimulada alterando el cartílago por los agentes citotóxicos o por los linfocitos, e indirectamente por mediadores de la inflamación, de tal manera que después de 2-3 semanas el tejido empieza a degenerar ⁽¹⁷⁸⁾. Otros autores señalan que la respuesta inmune tiene poca importancia por lo que no es necesario administrar ningún tipo de inmunosupresión.

Al igual que en la utilización de cualquier aloinjerto, existe riesgo de transmisión de enfermedades virales. Sin embargo, con el cumplimiento de los protocolos establecidos en los bancos de hueso este riesgo queda muy reducido, descartando infecciones, neoplasias y enfermedades degenerativas y una muestra de sangre que incluye sífilis, hepatitis B y C, VIH y citomegalovirus ⁽¹⁸⁷⁾. Además, los injertos deben tomarse y almacenarse en condiciones de estricta esterilidad.

Un aloinjerto osteocondral está indicado en pacientes jóvenes con limitación funcional y una lesión localizada, artrosis postraumática, defectos osteocondrales focales como la osteocondritis disecante, siendo de mayor utilidad cuando el defecto es único y focal. La

edad avanzada y las alteraciones en las funciones cognoscitivas son consideradas contraindicaciones relativas ya que se ha visto en las series más grandes, que una de las causas principales de fracasos es el temprano apoyo de la extremidad. Sin embargo, una gran ventaja de este método, es la posibilidad de disponer en cualquier momento de un cartílago procedente de una zona de carga, del tamaño necesario.

5.-Ingeniería tisular del cartílago articular

El principal factor que distingue las técnicas de ingeniería tisular de otras, es la inclusión de células vivas dentro del tejido implantado. Las técnicas de ingeniería tisular actualmente usadas en la reparación de cartílago son:

- a. Trasplante de condrocitos, solos o en combinación con algún tipo de material biocompatible;
- b. Trasplante de una población celular capaz de diferenciarse hacia condrocitos, células pluripotenciales medulares, periostio o pericondrio;
- c. Implante de materiales con otros factores de crecimiento;
- d. El uso de células como plataformas para la entrega de productos genéticos que aumenten la reparación, o genes modificados por ingeniería genética.

Debido a las limitaciones de los tejidos donadores ya mencionados, se han propuesto fuentes alternativas de material biológico para la reparación. Una de ellas es la colocación de condrocitos autólogos después de ser cultivados “in vitro”, una de las primeras biotecnologías aplicadas a la cirugía ortopédica. Los estudios originales de esta técnica fueron realizados en conejos con un 82 % de buenos resultados ⁽⁶¹⁾.

La técnica indicada por Brittberg et al., 1994, ⁽¹⁰⁾ recoge cartílago de zonas expuestas a mínima carga, en la mitad superior del cóndilo femoral medial de la rodilla afectada. Después de ser digerido con colagenasa, es filtrado y resuspendido en un medio de cultivo suplementado con suero del paciente y las células están listas para su implantación después de 14-21 días.

En el momento de la implantación el sitio de la lesión condral es escindido hasta observar tejido cartilaginoso de apariencia normal. El defecto es cubierto con periostio, obtenido de la cara medial de la tibia proximal, y suturado en el borde del defecto. Los

condrocitos cultivados son inyectados debajo del parche. Se recomiendan movimientos activos y sin carga, 2-3 días después de la intervención.

Se han publicado resultados muy variados según la patología. Sin embargo, en términos generales los resultados fueron buenos en un 75 % de los pacientes, estableciendo una relación entre la morfología del cartílago hialino y los buenos resultados. Se han propuesto tres teorías para explicar los mecanismos de la reparación con el trasplante de células cultivadas 1) los condrocitos implantados repueblan el defecto y producen una nueva matriz de cartílago. El parche de periostio funciona como un cierre hermético, que aísla las células y permite que se incuben, diferencien y rellenen el defecto; 2) los factores de crecimiento son capaces de estimular los condrocitos cultivados para que se dividan; y 3) el parche de periostio estimula los condrocitos en el cartílago adyacente, en el hueso subcondral o en el periostio, para entrar en el defecto y reparar el mismo.

Esta técnica incorpora varios de los procedimientos descritos anteriormente, lavado, abrasión injerto de periostio y trasplante celular.

6.- Artroplastias

Antes de tomar la decisión de realizar un reemplazo articular de rodilla, debe intentarse el tratamiento médico y pensar en tratamientos alternativos, como son la osteotomía tibial, reducir la actividad, la marcha asistida con bastón o muletas y la fisioterapia. Sin embargo, a pesar de esto la historia natural de la artrosis es generalmente desfavorable.

Si la lesión progresa hacia la degeneración articular se debe valorar la realización de un reemplazo articular cuya finalidad es eliminar el dolor y restaurar la función articular.

Desde su concepción los diseños de las prótesis han evolucionado, ofreciendo hoy una gama muy amplia de posibilidades con buenos resultados a largo plazo. La artroplastia total de rodilla está indicada siempre y cuando el dolor y la limitación funcional así lo aconsejen.

Injertos osteocondrales

Los injertos analizados fueron de predominio fibrocartilaginoso, con una vida de los condrocitos limitada, si bien la prevalencia del tejido cartilaginoso en los diferentes grupos fue variable, lo cual puede estar relacionado directamente con el método de criopreservación.

Al igual que Lexer, 1908, ⁽⁸⁹⁾ otros autores han reportado que la complicación más frecuente es la transformación del cartílago trasplantado en fibrocartílago, tal vez debido a la interacción inmunológica.

Se han estudiado los injertos osteocondrales masivos, sin embargo las complicaciones relacionadas con este tipo de técnica han sido muchas, como la incongruencia de las superficies articulares, la necrosis del cartílago hialino y la morbilidad del sitio donante ⁽⁶⁵⁾.

Otro punto a tomar en consideración es la respuesta inmunológica. Los aloinjertos osteocondrales son inmunogénicos ⁽⁵⁵⁾ debido al contenido de diferentes proteínas, elementos medulares, matriz cartilaginosa y condrocitos.

Estudios de laboratorio han comprobado que aloinjertos serológicamente compatibles pueden ser mejor aceptados que aquellos que no lo son ⁽¹⁷⁶⁾. Sin embargo, los aloinjertos óseos han sido utilizados durante décadas sin necesidad de estudiar la compatibilidad serológica y en varios estudios se habla del privilegio inmunológico del cartílago ^(45,85-87). Nuestro modelo presenta la ventaja, comprobada, de que la criopreservación disminuye la respuesta inmunológica, pero sin suprimirla del todo ⁽⁵⁵⁾ aunque la criopreservación tiene otro factor a considerar, la citotoxicidad de los agentes crioprotectores utilizados también disminuye la viabilidad de los condrocitos ⁽¹⁸⁴⁾.

La porción ósea de los aloinjertos osteocondrales actúa como un entarimado por el que los osteoblastos penetran desde los bordes, los cuales con el tiempo reemplazarán el hueso muerto del aloinjerto con hueso vivo. Durante este tiempo, el hueso se puede reblandecer y colapsarse o sufrir fractura por fatiga en las porciones de hueso no reemplazadas ⁽¹¹⁾.

Otro factor observado en las piezas de nuestros corderos fue el colapso del injerto ya que debido a la forma hemisférica del cóndilo femoral, no tienen protección y se sobrecarga el cartílago que lo rodea, favoreciendo así el desarrollo de la degeneración cartilaginosa. Para evitarlo diversos autores recomiendan una altura mínima del injerto de 1 cm ⁽¹¹⁾.

A pesar de la dificultad para mantener la viabilidad de la porción cartilaginosa del injerto son muchas las publicaciones sobre el uso de aloinjertos en el tratamiento de las lesiones tumorales ^(96,132,134) y también en lesiones osteocondrales focalizadas ⁽¹⁸⁵⁾. Un punto importante en nuestro trabajo es la determinación del método criopreservador más adecuado para conservar la mayor porción cartilaginosa viable. Además de factores propios

del paciente hay que cuidar la técnica de extracción, el instrumental utilizado para ello la técnica quirúrgica para el diseño del nicho receptor así como para su implantación.

Técnica

El diseño del cilindro es muy importante y el injerto debe quedar nivelado con el cartílago que lo rodea, para evitar movimientos o la formación de una interfaz entre el tejido óseo del donante y del receptor y evitar también así la necesidad de cualquier tipo de fijación haciendo que el injerto quede insertado a presión. La presencia de cualquier espacio, entre las porciones óseas, o de un espacio o desnivel entre las superficies cartilaginosas predispone al desarrollo de tejido conectivo fibroso que engloba la porción cartilaginosa y en muchos casos la sustituye casi por completo, y llega hasta la porción ósea.

Un paciente joven con una lesión solitaria, como la osteocondritis disecante, con un cartílago que rodee a la lesión en buen estado y con ligamentos y meniscos intactos sería el candidato ideal para favorecerse de este método.

A pesar de que el cartílago articular cuenta apenas con unos milímetros de espesor sorprende su resistencia a la compresión, su capacidad resiliente y de distribución de cargas evitando la concentración de solicitaciones en el hueso subcondral. Unido a la capa calcificada, el cartílago presenta una transición entre el tejido óseo y el cartilaginoso que consideramos de suma importancia para el adecuado mantenimiento del aloinjerto cartilaginoso.

Los buenos resultados obtenidos en la integración con los injertos de hueso esponjoso nos hace pensar que para obtener la integración de un injerto condral éste debe estar unido al hueso subcondral y epifisario.

El uso de los aloinjertos osteocondrales frescos ha sido apoyado con evidencias clínicas y experimentales (27,34,37,58,77,84,124,130,194). Sin embargo, de la misma manera que los aloinjertos congelados no han demostrado su eficacia para sustituir una superficie articular por otra de las mismas características, en nuestra serie, la unión entre el tejido del huésped y el injerto se observó completamente a los cinco meses, aunque una parte de las muestras presentaron importante colapso y sustitución por tejido conectivo. Esto se debió, probablemente, a que no derivamos la carga de la extremidad operada y a que el

instrumental utilizado no permitió siempre que la porción cartilaginosa del injerto quedara nivelada con la superficie articular del huésped, quedando en ocasiones espacios entre éstas.

En la actualidad se cuenta con una limitada información del metabolismo de los condrocitos y de su función tisular.

Según Tomford et al., 1985, ⁽¹⁸³⁾ el resultado definitivo de la conservación del cartílago debe de ser determinado por su implantación "in vivo".

Teniendo en cuenta los malos resultados de los protocolos de criopreservación para cartílago intacto usados actualmente, se pueden determinar los posibles factores de fracaso y en términos generales pueden ser la falta de contacto entre las células cartilaginosas y el agente crioprotector o la toxicidad del mismo.

Muldrew et al., 1990, ⁽¹²²⁾ atribuye la lesión crioinducida a la susceptibilidad propia del tejido por frío y a la toxicidad del crioprotector.

Meryman et al., 1971, ⁽¹¹⁰⁾ sugieren que los crioprotectores que penetran en la célula, como el glicerol y el DMSO, ejercen un efecto benéfico por sus propiedades de cohesión intramolecular. La difusión del agente crioprotector se puede definir en función al tiempo de penetración de éste a través del cartílago. Esto es considerado como un parámetro descriptivo, y no como una propiedad de alguna función fisiológica. El transporte de los crioprotectores es completamente pasivo, estando determinado por los potenciales químicos propios del compuesto.

La difusión de los agentes crioprotectores corresponde a un movimiento microscópico de partículas a través de un medio y está en función del tiempo.

La diferencia entre las distintas sustancias se debe al coeficiente de autodifusión, propiedad característica de cada compuesto e influenciado por la temperatura. La concentración de los agentes influye también, aunque no de forma determinante, puesto que se puede observar una penetración semejante a concentraciones mayores. Un fragmento osteocondral completo requerirá más tiempo para lograr la difusión completa.

Por esto, en dos de nuestros grupos hemos intentado mantener el aloinjerto congelado todo el tiempo con DMSO para ver si a pesar del efecto tóxico sobre las capas superficiales se mantenían las células en las capas profundas. Esto no ha sido así. En el ambiente de

congelación, el DMSO como una molécula intracelular adicional, ejerce un efecto físico incrementando la concentración de solutos intracelularmente y retiene agua dentro de la célula, lo cual incrementa la viscosidad del líquido intracelular y retarda el movimiento de moléculas de agua fuera de la célula, previniendo de esta manera la contracción celular. Al parecer, compuestos como el DMSO poseen una alta afinidad a los enlaces de hidrógeno, lo cual favorece que el agua sea retenida dentro de la célula por un período de tiempo largo, manteniendo el ambiente celular durante la congelación ⁽⁴³⁾.

Se ha comprobado que los condrocitos más afectados por el frío son los de la capa intermedia ⁽¹²¹⁾ porque su estructura y función es diferente, son más lábiles al daño por congelación y descongelación, el agente crioprotector no se difunde de manera homogénea a través del cartílago y su velocidad de penetración es insuficiente para atravesar íntegramente su espesor.

Ante el uso de un agente crioprotector, se plantea el desconocimiento exacto del ritmo de penetración en el tejido y su toxicidad en las células a proteger, además de la dificultad de obtener una temperatura uniforme de la pieza durante la congelación. Por todo lo anterior, la conservación del cartílago articular intacto en la actualidad no es del todo alentadora. Los mejores resultados en estos procedimientos reportan una vida del 50 % de la población inicial, y aún queda por demostrar si los condrocitos supervivientes son capaces de realizar una función correcta para mantener la estructura tisular, tanto por su número como por su actividad metabólica específica ⁽¹⁵⁹⁾.

El agente crioprotector usado en nuestro estudio fue el dimetilsulfóxido (DMSO o Me₂SO) muy utilizado en la literatura ^(8,167).

Se ha observado una disminución del efecto tóxico del DMSO si el tejido es expuesto durante no más de 90 min. a una concentración de 10 % y una temperatura de 4 °C previo a su congelación, el motivo del uso de este agente crioprotector es que en la actualidad junto con el glicerol son las sustancias más usadas y con mejores resultados en todos los protocolos de criopreservación para tejido y células aisladas. Sin embargo, el glicerol tiene más efectos tóxicos a la misma concentración, con menor tiempo de exposición ⁽¹⁸⁶⁾. Como ya se ha mencionado la congelación y la descongelación de un tejido tiene un efecto sobre

las células causando lesiones en las membranas, las mitocondrias, otros organelos intracelulares y lisosomas ^(141,163).

Son muchos los buenos resultados obtenidos con la conservación exitosa de células aisladas de todo tipo, sanguíneas, espermatozoides y condrocitos. Estos últimos después de ser tratados con crioprotectores, al descongelarlos son capaces de producir tejido cartilaginoso "in vitro" ⁽¹⁷²⁾. Sin embargo, también es conocido que los protocolos usados en la criopreservación de células aisladas no son capaces de conseguir los mismos resultados al intentar criopreservar piezas de cartílago intacto, lo que demuestra que la criobiología de un tejido aparentemente sencillo, como el cartílago, es más complicado que el de su célula base, el condrocito ⁽¹⁶⁰⁾.

La compleja interacción entre las células y la matriz que las rodea hace que la viabilidad tras la congelación varíe desde un 90 % en células aisladas ⁽¹⁸³⁾ a un 30-50 % en el cartílago intacto ⁽¹⁶¹⁾. Esto supone más variables al plantear un protocolo de criopreservación para conservar piezas de cartílago.

Consideramos que muchos aspectos de la criopreservación continúan inexplorados entre los cuales se encuentran: las concentraciones, temperaturas y tiempos de exposición exactas para disminuir los efectos tóxicos de los crioprotectores, la temperatura ideal de almacenaje del cartílago articular y la capacidad del cartílago para cumplir su función una vez implantado después de la congelación.

Una opción propuesta en la literatura y ampliamente explorada es el cultivo y congelación de condrocitos aislados para incrementar la supervivencia celular. Sin embargo, la tasa de éxito en la reparación de los defectos articulares mediante el uso de condrocitos aislados publicada en la literatura no excede el 40 % ⁽²⁸⁾ y se trabaja para aumentar la permanencia de los condrocitos en los defectos, mediante el uso de algún tipo de matriz artificial como vehículo, tal como la fibrina, el gel de colágeno o la fibra de carbono ^(171,175,193).

En nuestro modelo y con nuestra idea, el problema es que la morfología del cilindro no coincide, en ocasiones, con la curvatura del cóndilo femoral, motivo por el cual en algunas ocasiones entre la superficie articular del injerto y la del cóndilo receptor quedó un escalón. Sin embargo, en todos los casos se consiguió que ambas superficies quedaran en contacto

pues al ser el diámetro del nicho igual que el del injerto permitió un encaje a presión, evitando cualquier sistema de fijación para el injerto.

Evolución y futuro

Los resultados no han sido todo lo halagüeños que esperábamos. Hicimos seis grupos de conservación de aloinjertos intentando estudiar diferentes variables jugando con la temperatura y el criopreservador. Llegados a este punto vemos que la temperatura y el tipo de congelación no mejoran la conservación del cartílago y tampoco lo hace el poner un criopreservador o no. Es más, intentamos aunque no está recomendado, por sus efectos citotóxicos, mantener el DMSO durante toda la congelación intentando mantener la viabilidad de las células más profundas.

A la vista de nuestros resultados nos planteamos dos líneas de trabajo. Por un lado el diseño de un instrumental adecuado que facilite la extracción y colocación de los cilindros osteocondrales procurando dañarlos lo menos posible y, por otro, estudiar nuevas maneras de conservación del cartílago, tal vez a temperaturas menos profundas y en medio de cultivo.

También puede ser de interés cuidar el postoperatorio, aplicando descarga después de la intervención y, uno de los aspectos que más nos atraen es la aplicación de técnicas propias de bioingeniería o de la terapia génica que permitan introducir condrocitos cultivados en el cartílago trasplantado o que estimulen, por medio de vectores adecuados, la actividad celular del aloinjerto condral.

CONCLUSIONES

Los protocolos de crioconservación utilizados no brindan un método efectivo para preservar adecuadamente el tejido cartilaginoso. No se han encontrado diferencias entre la conservación de injerto osteocondral a -80°C y a -186°C . Tampoco se han encontrado diferencias entre utilizar criopreservadores (DMSO) y no utilizarlos. Así mismo, la inmersión durante un largo periodo de tiempo en DMSO no mantiene la viabilidad de los condrocitos de las capas profundas del cartílago.

La técnica debe ser cuidadosa y delicada pues si no hay contacto entre el cartílago del injerto y el cartílago receptor nunca se producirá una unión entre ambos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alini M, Matsui Y, Dodge GR, Poole AR. The extracellular matrix of cartilage in the growth plate before and during calcification: changes in composition and degradation of type II collagen. *Calcif Tissue Int* 1992; 50:327-35.
2. Armstrong CG, Bahrani AS, Gardner DL. Alteration with age in compliance of human femoral-head cartilage. *Lancet* 1997; 1:1103-4.
3. Armstrong CG, Bahrani AS, Gardner DL. In vitro measurement of articular cartilage deformations in the intact human hip joint under load. *J Bone Joint Surg* 1976; 61A:744-55.
4. Baker H, Schork P. The effects of glycerol and ethylene glycol on the excitability and contractility of frog ventricular muscle. *Cryobiology* 1972; 9:321-22.
5. Baver RJ, Gross AE. Fresh small-fragment osteochondral allografts in the knee joint. In: Aichroth PM, Cannon WD (eds). *Knee Surgery. Current Practice*. Londres, Martin Dunitz, 1992:464-71.
6. Blaser RB, Matthews LS. Complications of prosthetic knee arthroplasty. En: *Complications in orthopedic surgery*. CH Epps (ed), Philadelphia, 1994, 1057-86.
7. Bonner WM, Jonsson H, Malanos C, Bryant M. Changes in the lipids of the articular cartilage with age. *Arthritis Rheum* 1975; 18:461-73.
8. Bourongcle BA. Preservation of normal and leukemic cells with dimethyl sulfoxide at -80° C. *Cryobiology* 1967; 2:445-55.
9. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte implantation. *N Engl J Med* 1994; 331:889-95.
10. Brittberg M, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. *Biomaterials* 1997; 18:235-42.
11. Brooks PJ. Role of osteochondral Transplantation in the treatment of joint surface defects. *Sports Med Arthrosc Rev* 1994; 2:59-64.
12. Brown CC, Hembry RM, Reynolds JJ. Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibition in the rabbit growth plate. *J Bone Joint Surg* 1989; 71A:580-93.
13. Brown JB. Preserved and fresh homotransplants of cartilage. *Surg Gynecol Obstet* 1940; 70:1079.

14. Buckwalter JA, Kuettner KE, Thonar EJM. Age-related changes in articular cartilage proteoglycans: electron microscopic studies. *J Orthop Res* 1985; 3:251-57.
15. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage, Part II: Degradation and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg* 1997; 79A:608-12.
16. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: An instructional course lecture, The Academy of Orthopaedic Surgeons. *J Bone Joint Surg* 1989; 71A:600-32.
17. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *AAOS Instructional Course Lectures*, 1998; 47:477-86.
18. Buckwalter JA, Rosenberg LC, Courts R. Articular cartilage: injury and repair. En: Woo SL, Buckwalter JA (eds). *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*, Park Ridge, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1988:465-73.
19. Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB. Articular cartilage: composition, structure, response, to injury and methods of repair. En: Ewing JW, ed. *Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy*. New York: Raven Press; 1990:19-28.
20. Buckwalter JA, Rosenberg LC. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Micro Rev* 1998; 1:87-112.
21. Buckwalter JA, Roughley PG. Age-related changes in human articular cartilage proteoglycans. *Trans Orthop Res Soc* 1987; 12:152.
22. Burnstein D, Gray ML, Hartman AL, Gipe R, Foy BD: Diffusion of small solutes in cartilage as measured by NMR spectroscopy and imaging. *J Orthop Res* 1993; 11:465-78.
23. Burwell GR. Studies in the transplantation of bone, VII. The fresh composite homograft- autografts of cancellous bone: an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow containing bone grafts. *J Bone Joint Surg* 1964; 46A:110-40.
24. Cahill BR. Treatment of juvenile osteochondritis of knee. *Sports Med Arthroscop Rev* 1994; 2:65-71.
25. Campbell CJ. The healing of cartilage defects. *Clin Orthop* 1969; 64:65.
26. Campbell IK, Piccoli DS, Butler DM, Singleton DK, Hamilton JA. Recombinant human interleukin-1 stimulates human articular cartilage to undergo resorption and human

- chondrocytes to produce both tissue- and urokinase-type plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta* 1988; 987:183-94.
27. Campell CJ, Ishida H, Takahashi H, Kelly F. The transplantation of articular cartilage:an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg* 1963; 45A:1579-92.
 28. Caplan AI, Goto T, Wakitani S, Pineda SJ, Haynesworth SE, Goldberg VM. Cell-based technologies for cartilage repair. En: *Biology and biomechanics of the traumatized synovial joint: The knee as a model*. G Finerman, F Noyes (eds). Rosemont, Illinois, AAOS, 1992, 111-112.
 29. Carroll G. Measurement of sulphated glycosaminoglycans and proteoglycan fragments in arthritic synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:17-24.
 30. Carroll G. Spectrophotometric measurement of proteoglycans in osteoarthritic synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1987; 46:375-79.
 31. Cawston T. Matrix metalloproteinases and TIMPs:properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today* 1998; 4:130-7.
 32. Childers JC Jr, Ellwood SC. Partial chondrectomy and subchondral bone drilling chondromalacia. *Clin Orthop* 1979; 144:114-20.
 33. Combe B. Inflammation and joint destruction during rheumatoid polyarthritis:What relation?. *Press Med* 1998; 27:481-3.
 34. Craigmyle MBL. An autoradiographic and histochemical study of long-term cartilage graft in the rabbit. *J Anat* 1958; 92:467-72.
 35. Curran RC, Gibson T. The uptake of labelled sulphate by human cartilage cells and its use as a test for viability. *Proc R Soc London B*, 1956; 144:562-76.
 36. Czitrom AA, Keating S, Gross AE. The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. *J Bone Joint Surg* 1990; 72A:574-81.
 37. Czitrom AA, Gross AE. *Allografts in orthopaedic practice*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1992.
 38. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factor I and II peptide messenger ribonucleic and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrine Rev* 1989; 10:68-91.

39. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Howell DS, Woessner JF Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989; 84:678-85.
40. Dean DD, Muniz OE, Berman I, Pita JC, Carreno MR, Woessner JF Jr. Localization of collagenase in the growth plate of rachitic rats. *J Clin Invest* 1985; 76:778-22.
41. Dean DD, Muniz OE, Woessner JF, Howell DS. Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by rat growth plates in culture. *Matrix* 1990; 10:320-30.
42. Dijkgraaf LC, De Bont LGM, Boering G, Leim RSM. Normal cartilage structure, biochemistry and metabolism:a review of the literature. *J Oral maxillofac Surg* 1995; 53:924-29.
43. Doebbler GF, Rinfret AP. The influence of protective compounds and cooling and warming conditions on hemolysis of erythrocytes by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1962; 58:449-58.
44. Dragoslav R, Mitrovic MD. Articular cartilage; composition and metabolism in health and disease. *Curr Opin Orthop* 1993; 4:69-79.
45. Elves MW:Newer knowledge of the immunology of bone and cartilage. *Clin Orthop* 1979; 120:232-49.
46. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Deryinck R. Towards a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 1995; 80:371-78.
47. Ewing JW. Arthroscopic treatment of degenerative meniscal lesions and early degenerative arthritis of the knee. En: *Articular Cartilage and Knee Joint Function. Basic Science and Arthroscopy*, Ewing JW (ed). New York, Raven Press, 1990, 137-45.
48. Eyre DR, Wu JJ, Wodds P. Cartilage-specific collagens:Structural studies. En: *Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG et al (eds). Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York, Raven Press, 1992, 119-31.
49. Eyre DR. Collagen structure and function in articular cartilage:Metabolic changes in the development of osteoarthritis. En: *Kuettner KE, Goldberg VM (eds). Osteoarthritic Disorders*. Rosemont, IL. AAOS, 1995, 219-29.

50. Fahy GM, Khirabadi BS, Mehl P: Equipment, solutions, perfusion techniques and medications permitting survival of kidneys perfused with vitrifiable media. *Cryobiol* 1991; 28:511.
51. Fahy GM: The potential future utility of organ cryopreservation. *Cryobiol* 1991; 28:513.
52. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ: Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosamino glycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochem Biophys Acta* 1986; 883:173-77.
53. Flynn JM, Springfield DS, Mankin HJ. Osteoarticular allografts to treat distal Femoral Osteonecrosis. *Clin Orthop* 1994; 303:38-43.
54. Freaser JR, Kimpton WG, Laurent TC, Cahill RN, Vakakis N. Uptake and degradation of Hyaluronan in lymphatic tissue. *Biochem J* 1988; 256:153-8.
55. Friedlaender GE, Mankin HJ, Langer F. Immunology of osteochondral allografts: background and general considerations. En: Friedlaender GE, Mankin HJ, Shell KW (eds) *Osteochondral allografts: biology, banking and clinical applications*. Boston, Little Brown, 1983:133-40.
56. Garrett JC. Fresh osteochondral allografts for treatment of articular defects in osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle in adults. *Clin Orthop* 1994; 303:33-37.
57. Ghadially FN, Roy S. *Ultrastructure of Synovial Joints in Health and Disease*. New York, Appleton- Century-Crofts, 1969.
58. Gibson T, Davis WB, Curran RC. The long-term survival of cartilage homografts in man. *Br J Plast Surg* 1958; 11:177-87.
59. Gibson T. Viability of cartilage after freezing. *Proc R Soc London B* 1957; 147:528-29
60. Glant TT, Hadhazy CS, Mickez K, Sipos A. Appearance and persistence of fibronectin in cartilage. Specific interactions of fibronectin with collagen Type II. *Histochemistry* 1985; 82:149-58.

61. Grande DA, Pitman MI, Peterson L. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res* 1989; 7:208-18.
62. Guerne PA, Carson DA, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol* 1990; 144:499-505.
63. Gunja-Smith Z, Nagase H, Woessner JF Jr. Purification of the neutral proteoglycan-degrading metalloproteinase from human articular cartilage tissue and its identification as stromelysin matrix metalloproteinase. *Biochem J* 1989; 258:115-19.
64. Hangody L, Kárpáti Z. A new surgical treatment of localized cartilaginous defect of the knee. *Hungarian J Orthop Trauma* 1994; 37:237.
65. Hangody L, Kish G, Kárpáti Z et al. Basic Science:Autogenous Osteochondral Graft Technique for Replacing Knee Cartilage Defects in Dogs. *Orthop Inter Ed* 1997; 5:3:175-81.
66. Hascal VC. Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid. *J Supramol Struct* 1977; 7:101-20.
67. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM et al. Interactions of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with Transforming Growth Factor Beta. *Biochem J* 1994; 302:527-34.
68. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PSM, Van Der Linden AJ. Perichondrial grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg* 1990; 72B:1003-7.
69. Huntziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial thickness defects in articular cartilage:cell recruitment from synovial membrane. *J Bone Joint Surg* 1996; 78A:721-28.
70. Hurting M, McGann LE, McPherson R, Muldrew K, Novak K, Scharchar NS. Surgical and analytical techniques for assessment of transplanted articular cartilage:A pilot study. *Cryobiol* 1992; 29:45-56.
71. Insall J. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop* 1974; 101:61.

72. Itay S, Abramovici A, Yosipovitch Z, Nevo Z. Correction of defects in articular cartilage by implants of culture of embryonic chondrocytes. *Trans Orthop Res Soc* 1988; 13:112.
73. Jackson RW. Arthroscopic treatment of degenerative arthritis. In: McGinty JB, ed. *Operative Arthroscopy*. New York, Raven Press; 1991:319-23.
74. Jaffe HL. *Metabolic, Degenerative and Inflammatory Diseases of Bones and Joints*. Philadelphia, Lea and Febinger, 1972
75. Johnson LL. *Surgical Arthroscopy: Principles and Practice*. St Louis, CV Mosby Co, 1986.
76. Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM, Kelley SS, Hochmuth RM, Guiliak F. Mechanical properties of human chondrocytes and chondrons from normal and osteoarthritic cartilage. *Trans Orthop Res Soc* 1997; 22:199.
77. Kandel RA, Gross AE, Ganel A. Histopathology of failed osteoarticular shell allografts. *Clin Orthop* 1985; 197:103-10.
78. Karow AM. Dimethylsulfoxide effect on Myocardial-Adenoreceptors (letter). *J Pharm and Pharmacol* 1972; 24:419-21.
79. Karow AM. Cryopreservation: Pharmacological considerations. In: Organ preservation for transplantation. Karow AM Jr., Abouna GJM, Humphries AL (eds). Boston, Little Brown, 1974, 86-107.
80. Kempson GE, Spivey CJ, Swanson SAV, Freeman MAR. Patterns of cartilage stiffness on normal and degenerative human femoral heads. *J Biomechanics* 1971; 4:597.
81. Khirabadi BS, Fahy GM, Antonovich T, Sabnis S, Saur J: Life support function of rabbit kidneys cooled to -30°C . *Cryobiol* 1992; 29:721-22.
82. Kielty CM, Whitaker SP, Grant ME, Shuttle CA. Type VI microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *Journal of Cell Biology* 1992; 118:979-90.
83. Kreder HJ, Moran M, Keeley FW. Biologic resurfacing of a major joint defect with cryopreserved allogenic periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model. *Clin Orthop* 1994; 300:288-96.

84. Lane JM, Brighton CT, Ottens HR, Lipton M. Joint resurfacing in the rabbit using an autologous osteochondral graft:a biochemical and metabolic study of cartilage viability. *J Bone Joint Surg* 1977; 59A:218-22.
85. Langer F, Czitrom A, Pritzker KP. The immunogenicity of fresh and frozen allogenic bone *J Bone Joint Surg* 1975; 57A:216-20.
86. Langer F, Gross AE, West M, Urovitz EP. The immunogenicity of allograft knee joint transplants. *Clin Orthop* 1978; 132:155-62.
87. Langer F, Gross AE. Immunogenicity of allograft articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1974; 56A:297-304.
88. Leitman SA, Yanagishita M, Sampath TK, Reddi HA. Stimulation of proteoglycan synthesis in porcine articular cartilage explants by recombinant osteogenic protein-1 (BMP-7). *J Bone Joint Surg* 1997; 79A:1132-36.
89. Lexer E. Substitution of whole or half joint from freshly amputated extremities by freeplastic operation. *Surg Gynecol Obstet* 1908; 6:601.
90. Lindhorst E, Vali TP, Guilak F et al. Longitudinal characterization of synovial fluids biomarkers in the canine meniscectomy model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 2000; 18:269-80.
91. Loch RC, Gross AE, Langer F. Late osteochondral allografts resurfacing for tibial plateau fractures. *J Bone J Surg* 1984; 66A:328-35.
92. Lohmander LS, Dahlberg L, Ryd L, Heinegrad D. Increased levels of proteoglycan fragments in knee joint fluid after injury. *Arthritis Rheum* 1989; 32:11:1434-42.
93. Lohmander LS. Markers of catilage metabolism in arthrosis:A review. *Acta Orthop Scand* 1991; 62:623-32.
94. Loretz LJ, Li AP, Flye MW, Wilson AG. Optimization of cryopreservation procedures for rat and human hepatocytes. *Xenobiotica* 1989; 19:489-98.
95. MacConaill MA. The movements of bones and joints:The mechanical structure of articulating cartilage. *J Bone Joint Surg* 1951; 33B:251-57.
96. Mankin HJ, Doppelt S, Tomford WW. Clinical experience with allograft implantation:The first ten years. *Clin Orthop* 1983; 174:69-86.

97. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. *J Bone Surg* 1971; 53A:523-37.
98. Mankin HJ. The response of articular cartilage to injury and osteoarthritis. Part I. *N Engl J Med* 1974; 291:1285-96.
99. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg*, 1982; 64A:460-70.
100. Martell-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP. Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. *J Orthop Res* 1990; 8:336-44.
101. Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA. Age-related decline in chondrocytes response to insulin-like growth factor binding proteins. *J Orthop Res* 1997; 15:491-98.
102. Matsumoto T, Tsukazaki T, Enomoto H, Iwasaki K, Yamashita S. effects of interleukin-1 on insulin-growth factor - I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 1994; 53:128-33.
103. Matsusue Y, Yamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 1993; 9:318-21.
104. Mazur P. Causes of injury in Frozen and Thawed cells. *Fed Proc* 1965; 24:175-82.
105. Mazur P. Cryobiology. The Freezing of biological systems. *Science* 1970; 168:939-49.
106. McDermott AGP, Langer F, Pritzker KPH, Gross AE. Fresh small-fragment osteochondral allografts. Long-Term follow-up study on first 100 cases. *Clin Orthop* 1985; 197:96.
107. McGann LE, Muldrew K, Hurtig M, Novak K, Scharchar NS. Cryopreservation of articular cartilage for transplantation. *Cryobiol* 1993; 30:659.
108. McGann LE, Stevenson M, Mcallister D, Muldrew K, Shachar NS. Osmotic water permeability properties of isolated chondrocytes and its application to cryopreservation. *Cryobiol* 1987; 24:545.

109. Meachim G, Stockwell RA. The matrix, in *Adult Articular Cartilage*. 2^a Ed, Freeman MAE (ed). Tunbridge Wells: Pitman Medical, 1979; 1-67.
110. Meryman HT, Williams RJ, Douglas M. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 1971; 14:287-302.
111. Meryman HT. Freezing Injury and its prevention in living cells. *Ann Rev Biophys and Bioeng* 1974; 3:341-63.
112. Messner K, Møller W. The long -term prognosis for severe damage to weight bearing cartilage in the knee. *Acta Orthop Scand* 1996; 67:165-68.
113. Meyers MH, Akeson W, Convery FR. Resurfacing of the knee with fresh osteochondral allograft. *J Bone Joint Surg* 1989; 71A:704-8.
114. Minas T, Nehrer S. Current Concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics* 1997; 20:525-38.
115. Miosge N, Flachsbarth K, Goetz W, Schultz W, Kresse H, Herken R. Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. *Histochem J* 1994; 149:132-40.
116. Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg* 1976; 58A:2230-36.
117. Mitchell PG, Cheung HS. Tumor necrosis factor and epidermal growth factor regulation of collagenase and stromelysin in adult porcine articular chondrocytes. *J cell Physiol* 1991; 149:132-40.
118. Mizutani A, Fujita T, Watanabe S, Sakakida K, Okada Y. Experiments on antigenicity in allotransplanted cancellous bone. *Int Orthop* 1990; 14:243-8.
119. Mow VC, Evan LF, Foster RJ, Biomecánica. En: Simon RD (ed). *Ciencias Básicas en Ortopedia*, American Academy of Orthopedic Surgeons 1992:447-51.
120. Muir E. The chondrocyte, architect of cartilage: Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays* 1995; 17:1039-48.
121. Muldrew K, Hurtig M, Vak K, Schachar N, Gann LE. Localization of freezing injury in articular cartilage. *Cryobiol* 1994; 31:1-31.

122. Muldrew K, McGann LE. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J* 1990; 57:3:525.
123. Muldrew K, McGann LE. The osmotic rupture Hypothesis of intracellular freezing. *Cryobiol*, 1993; 30:620.
124. Mulholland RS, Gross AE. Osteochondral lesions of the talus treated with fresh osteochondral allograft transplantation. *Transplantation/Implantation Today*, 1990; 7:15-23.
125. Nguyen Q, Murphy G, Roughley PJ, Mort JS. Degradation of proteoglycan aggregate by a cartilage metalloproteinase: Evidence for the involvement of stromelysin in the generation of link protein heterogeneity in situ. *Biochem J* 1989; 259:81-7.
126. Nixon AJ, Lillich JT, Burton-Wurster N, Lust G, Mohammed HO. Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultures with insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- β and transforming growth factor. *J Orthop Res* 1998; 16:531-41.
127. O'Connor GB, Pricce GW. Refrigerated cartilage isografts. *Surg Gynecol Obstet* 1938; 67:796.
128. O'Driscoll S. Articular cartilage regeneration: Chondrocyte transplantation and other technologies. AAOS, 64th Ann Meeting; San Francisco, 1997.
129. O'Driscoll S, Kelly FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion: An experimental investigation in rabbit. *J Bone Joint Surg* 1986; 68A:1017-34
130. Oakeshott RD, Farine Y, Pritzker KPH, Langer F, Gross AE. A clinical and histological analysis of failed fresh osteochondral allografts. *Clin Orthop* 1988; 233:283-94.
131. Okouchi Y, Tamaki T, Kozaki M. The optimal temperature for hypothermic liver preservation in the rat. *Transplantation* 1993; 54:1129.
132. Ottolenghi CE. Massive osteo and osteo-articular bone grafts: technique and results of 62 cases. *Clin Orthop* 1972; 87:156-64.
133. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg* 1961; 43B:752-67.

134. Parrish FF. Allograft replacement of all or part of the end of a long bone following excision of a tumor. *J Bone Joint Surg* 1973; 55A:1-22.
135. Peeg DE. Long-term preservation of cells and tissues:A review. *J Clin Pathol* 1976; 29:271-85.
136. Peer LA. Experiments on alcohol preserved cartilage in humans. *Arch Otolaryngol* 1938; 27:42.
137. Peer LA. Fate of living and dead cartilage transplanted in humans. *Surg Gynecol Obstet* 1939; 68:603.
138. Persidsky MD. Lysosomes as primary targets of cryoinjury. *Cryobiology* 1971; 8:482-88.
139. Pfaffle M, Borchers M, Deutzmann R et al. Anchorin CII, A collagen-binding chondrocyte surface protein of calpactin family. *Prog Clin Biol Res* 1990;349:147-57.
140. Pita JC, Müller FJ, Manicourt DH. Early matrix changes in experimental osteoarthritis and joint disuse atrophy. En: *Articular cartilage and osteoarthritis*. Kuettner KE, Schleverbach R, Peyron JG, et al (eds). Raven Press, New York, 1992; 445-69.
141. Plaas AHK, Sandy JD. Age-related decrease in the link stability of proteoglycan aggregates formed by articular chondrocytes. *Biochem J* 1984; 220:337-40.
142. Poole AR, Matsui Y, Hinek A, Lee R. Cartilage macromolecules and the calcification of the cartilage matrix. *Anat Rec* 1989; 224:167-79.
143. Poole CA, Ayad S, Gilbert RT. Chondrons from articular cartilage (V). Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organization in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Science* 1992; 103:1101-10.
144. Poole CA, Ayad S, Schofield JR. Chondrons from articular cartilage (I). Immunolocalisation of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine chondrons. *J Cell Science* 1988; 90:635-45.
145. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J Anat* 1984; 138:113-38.
146. Poole CA, Wotton S, Duance VC. Localisation of type IX collagen in Chondrons isolated from porcine articular cartilage and rat chondrosarcoma. *Histochem J* 1998; 20:567-74.

147. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joint. *J Bone Joint Surg* 1959; 41B:618.
148. Prudden TM. Experimental studies on the transplantation of cartilage. *Am J Med Sci* 1881; 82:360.
149. Rammner DH. The effect of DMSO on several enzyme systems. *Ann New York Acad Sci* 1967; 141:291-99.
150. Reddi AH. Extracellular bone matrix dependent local induction of cartilage and bone. *J Rheumatol* 1983; 10 (suppl 11):67-78.
151. Ritsilä VA, Santavirta S, Alhopuro S. Periosteal and perichondrial grafting in grafting in reconstructive surgery. *Clin Orthop* 1994; 302:259-65.
152. Rodrigo JJ, Steadman JR, Siliman JF, Fulston A. Improvement of full thickness chondral defect healing in the human knee after debridement and microfracture by use of continuous passive motion. *Am J Knee Surg* 1994; 7:3:109-12.
153. Rodrigo JJ. New techniques of cartilage healing and cartilage grafting. *Sports Med Arthroscop Rev* 1998; 6:2:132-42.
154. Rosenberg LC, Buckwalter JA. Cartilage proteoglycans. En: Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC (eds). *Articular cartilage biochemistry*, New York, Raven Press, 1986; 39-57.
155. Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW. The biological effect of continuous passive motion on the healing of the full-thickness defects in articular cartilage:an experimental investigation in rabbit, *J Bone Joint Surg* 1980; 62:1232-48.
156. Salter RB. The biologic concept of continuous passive motion of synovial joints:the first 18 years of research and its clinical application. *Clin Orthop* 1989; 242:12-18.
157. Sandell LJ. Molecular biology of collagens in normal and osteoarthritic cartilage, En: Kuettner KEE, Goldberg VM (eds):*Osteoarthritic Disorders*. Rosemont, IL. AAOS, 1995; 131-46.
158. Saxne T, Heinegard D, Wollheim FA. Therapeutic effects on cartilage metabolism in arthritis as measured by release of proteoglycan structures into the synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1986; 45:491-97.

159. Schachar NS, McAllister D, Stevenson M. Metabolic and biochemical status of articular cartilage following cryopreservation and transplantation:a rabbit model. *J Orthop Res* 1992; 10:603-8.
160. Schachar NS, McGann LE, Nigel S. Cryopreservation of articular cartilage for transplantation. *Current Opinion Orthop* 1993; 4:90-7.
161. Schachar NS, McGann LE. Investigations of low-temperature storage of articular cartilage transplantation. *Clin Orthop* 1986; 208:146.
162. Schafer SJ, Luyten FP, Yanagishita M, Reddi AH. Proteoglycan metabolism is age related and modulated by isoforms of platelet- derived growth factors in bovine articular cartilage explants cultures. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302:431-38.
163. Schlafer M, Karow AM. Ultrstructure-Function Correlative studies for cardiac cryopreservation II. Hearts frozen to various temperatures without a cryoprotectant. *Cryobiology* 1971; 8:350-60.
164. Schlafer M. Drugs that modify cellular responses to low temperature (cryoprotectants): a pharmacological perspective of preserving biological system by freezing. *Fed Proc* 1977; 36:2590-94.
165. Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human morphogenetic protein-2 (rhBMP2) on healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1997; 79A:1452-57.
166. Seyedin SM, Rosen DM. Matrix proteins of the skeleton. *Current Opinion Cell Biol* 1990; 2:914-19.
167. Sherman JK. Pretreatment with protective substances as a factor in freeze-thaw survival. *Cryobiology* 1965; 1:298-300.
168. Shimizu C, Coutts RD, Healey RM, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D. Method of histomorphometric assessment of glycosaminoglycans in articular cartilage. *J Orthop Res* 1997; 15:670-674
169. Shin D, Athanasiou KA. Biomechanical properties of the individual cell. *Trans Orthop Res Soc* 1997; 22:1:352.
170. Sipe JD. Acute-phases proteins in osteoarthritis. *Semin Arthritis Reum* 1995; 25:75-86.

171. Sittering M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester G. In vitro formation of cartilage using bioresorbable polymer fleeces. *Biomaterials* 1994;15:451.
172. Smith AU. Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals. *Nature* 1965; 205:782-84.
173. Smith RJ, Justen JM, Sam LM et al. Platelet-derived growth factor potentiates cellular responses of articular chondrocytes to interleukin-1. *Arthr Rheum* 1991; 34:697-706.
174. Sokoloff L. Elasticity of ageing cartilage. *Fed. Proc* 1966; 25:1089.
175. Speer DP, Chvapil M, Volz RG, Holmes MD. Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants. *Clin Orthop* 1979; 144:326.
176. Steadman JR, Stereet WI. The surgical treatment of knee injuries in skiers. *Med Sci Sport Exerc* 1995; 27:328.
177. Stevenson S, Dannucci GA, Sharkey NA, Pool RR. The fate of articular cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg* 1992; 74A:1287-307.
178. Stevenson S. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg* 1987; 69A:573-82.
179. Stover SS, Pool RR, Fischer AT. Healing in osteochondral defects: a comparison of articulating and nonarticulating locations. *Trans Orthop Res Soc* 1987; 12:275-85.
180. Takigawa M, Okawa T, Pan H et al. Insulin-like growth factors I and II are autocrine factors in stimulation proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective receptors on a clonal human chondrosarcoma derived cell line HCS-2/8. *Endocrinology* 1997; 138:4390-400.
181. Thumb N. Function of cytokines in cartilage degradation. *Wien med Wochenschr*, 1995; 266:1947-54.
182. Tippet JW. Articular cartilage drilling and osteotomy in osteoarthritis of the knee. In: McGinty JB (ed). *Operative Arthroscopy*. New York, Raven Press; 1991:325-39.
183. Tomford WW, Duff GP, Mankin HJ. Experimental freeze preservation of chondrocytes. *Clin Orthop* 1985; 197:11.

184. Tomford WW, Fredericks GR, Mankin HJ. Cryopreservation of intact articular cartilage. *Trans Orthop Res Soc*, 1982; 7:276.
185. Tomford WW, Henry WB, Trahan CA, Mankin HJ. The fate of allograft articular cartilage: fresh and frozen. *Trans 30th Meeting Orthop Res Soc* 1984;6:9. 217.
186. Tomford WW, Mankin HJ. Investigational approaches to articular cartilage preservation. *Clin Orthop* 1983; 174:22-27.
187. Tomford WW. Current Concepts Review: Transmission of disease through Transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg* 1995; 77A:1742-54.
188. Useche R, Barriga A, Barroso JL, Valentí JR. Tratamiento de la osteocondritis disecante de la rodilla mediante la técnica de Pridie. *Rev Patol Rod* 2000; 9:37-41.
189. Vega JA, García-Suárez O. Regulación de la biología del cartilago articular normal y patológico por los factores de crecimiento. *Rev Ortop Trauma*, 2000; 3:316-23.
190. Vignon E, Mathieu P, Louisot P, Vilamitjana J, Harmand MF, Richard M. Phospholipase A2 activity in human osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol (suppl)* 1989; 18:35-8.
191. Villinger PM, Kusari AB, Ten Duke P, Lotz M. IL-1 and IL-6 selectively induce transforming growth factor isoforms in human articular chondrocytes. *J Immunol* 1993; 151:3337-44.
192. Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 1984; 223:587-97.
193. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ et al. Mesenchymal cell-based repair of large articular and bone defect. *Trans Orthop Res Soc* 1994; 19:481.
194. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg* 1989; 71B:74-80.
195. Wallis WJ, Simkin PA, Nelp WB. Protein traffic in human synovial effusions. *Arthritis Rheum* 1987; 30:57-63.
196. Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J, Bandy CA. Cellular patterns of insulin like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis. *Endocrinology* 1995; 136:2741-51.

197. Wayne JS, Amiel D, Kwan MK, Woo SL, Fierer A, Meyers MH. Long- term storage effects on canine osteochondral allografts. *Acta orthop scand* 1990; 61:539-45.
198. Weiner ND, Lu MY, Rosoff M. Interactions of Dimethyl Sulfoxide with lipid and protein monolayers. *J Pharmaceut Sci* 1972; 61:1098-1101.
199. Westacott CI, Sharif M. Citokynes in Osteoarthritis:mediators or markers of joint destruction? . *Sem Arthritis Reum* 1996; 25:254-72.
200. Wotton SF, Duance VC, Fyer PR. Type IX collagen:a possible function in articular cartilage. *FEBS letters* 1998; 234:14-17.
201. Wotton SF, Jeacocke RE, Maciewicz RA, Wardale RJ, Duance VC. The application of scanning confocal microscopy in cartilage research. *Histochem J* 1991; 23:328-35.
202. Xu C, Oyajobi BO, Frazer A, Kozaci LD, Russell RG, Hollander AP. Effects of growth factors and interleukin-1 on proteoglycan and type II collagen turnover in bovine nasal and articular chondrocyte pellet cultures. *Endocrinology* 1996; 137:3557-65.
203. Yamada H, Nakagawa T, Stephens RW, Nagai Y. Proteinases and their inhibitors in normal and osteoarthritic cartilage. *Biomed Res* 1987; 8:289-300.
204. Yamada Y, Stephens RW, Nakagawa T, McNicol D. Human articular cartilage contains an inhibitor of plasminogen activator. *J Rheumatol* 1988; 15:1138-43.