

Universitat de Barcelona

Divisió de Ciències de la Salut
Facultat de Medicina
Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques

Tesis Doctoral

Estudio de la morfología de la superficie articular
de injertos osteocondrales frescos, congelados y
criopreservados empleando un
Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental

Presentado por el Licenciado en Medicina y Cirugía

José Antonio Carbonell Di Mola

Bajo la dirección de los doctores:

Santiago Suso Vergara

Josep Maria Segur Vilalta

Para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía

Barcelona, septiembre 2.002



Agradecimientos

Al Prof. Dr. Santiago Suso Vergara, Profesor Titular del Departamento de Cirugía y Especialidades Quirúrgicas de la Universidad de Barcelona, Director del Institut Clínic de L'Aparell Locomotor (ICAL), Jefe del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Clínic de Barcelona, por ser director de esta Tesis, por la ayuda prestada a mi desarrollo profesional y por haber depositado en mi su confianza en la creación de esta línea de investigación en su Servicio.

Al Dr. Josep Maria Segur, codirector del Banco de Huesos del Hospital Clínic de Barcelona y especialista Senior del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología de esa misma institución, por ser codirector de esta Tesis y por toda su dedicación, orientación y consejos.

Al Prof. Dr. Josep Antoni Planell, Catedrático de Ciencias de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC) por su apoyo en los temas vinculados a ingeniería que se tratan en este trabajo de investigación.

Al Dr. José María Manero, miembro investigador del Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica (CREB) de la Universitat Politècnica de Catalunya, por todas las horas que compartimos frente al Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental en el estudio de las muestras.

Al Prof. Dr. Carlos Vilalta Bou, por todas sus recomendaciones y ejemplos en la elaboración de mi Tesis y en mi práctica profesional.

A la Dra. Carmen Mallofré, especialista del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona por su docencia y ayuda en la manipulación de las muestras e interpretación de las imágenes obtenidas.

A la Dra. Elba Martí, miembro del laboratorio de Criopreservación de tejidos de la Corporació Sanitària Clínic, por todo su tiempo, ayuda y colaboración prestada en el procesamiento de los tejidos empleados en este estudio.

Al los Dres. Tomasso Bile, Gregorio Avilan, y Federico Merck, del Departamento de Salud Pública y Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela y al Departamento de Bioestadística del Hospital Clínic de Barcelona por su asistencia y orientación en el diseño y cálculos estadísticos que fueron necesarios para este estudio.

A la Transplant Services Foundation (T.S.F.), empresa miembro de la Corporació Sanitària Clínic, por la beca que ha permitido el financiamiento completo de este trabajo.

A todas aquellas personas que en el pasado y en el presente han sido mis docentes, a mi familia y a todos los que luchan por preservar la nobleza del acto médico.

Indice

AGRADECIMIENTOS	6
INTRODUCCIÓN	16
Estructura y función del cartílago articular.....	18
Los condrocitos.....	18
La matriz extracelular.....	21
El fluido tisular.....	21
La red estructural de macromoléculas.....	22
Los colágenos.....	22
Los proteoglicanos... ..	23
Las proteínas no colágenas y las glicoproteínas.....	25
Regiones del cartílago articular.....	26
Zonas del cartílago articular.....	26
La zona superficial.....	27
La zona transicional.....	29
La zona media (radial o profunda).....	29
La zona de cartílago calcificado.....	29
Las regiones de la matriz extracelular.....	30
La región pericelular.....	30
La región territorial.....	31
La región interterritorial.....	31
Interacciones entre los condrocitos y la matriz.....	32
Obstáculos en la reparación fisiológica del cartílago articular.....	33
Factores vinculados a la anatomía del cartílago articular.....	34
Factores inherentes a los condrocitos.....	35
Factores relacionados con la matriz extracelular.....	35
Respuesta del cartílago articular a las lesiones mecánicas.....	35
Historia natural de las lesiones del cartílago articular.....	36
Diagnóstico de las lesiones condrales.....	38
Clasificaciones de las lesiones condrales.....	39
Prevalencia e incidencia de las lesiones condrales.....	41

Tratamiento de las lesiones condrales.....	42
Tamaño de la lesión.....	42
Localización de la lesión.....	43
Alineación de los componentes articulares.....	43
Lesiones concomitantes.....	43
Alternativas quirúrgicas para la reparación de las lesiones del cartílago articular....	44
Desbridamiento artroscópico.....	44
Brocado subcondral y técnica de microfractura.....	44
Autoinjertos osteocondrales (técnica de mosaicoplastia).....	45
Implante de condrocitos autólogos cultivados (transplante de condrocitos).	46
Matrices para la reparación del cartílago.....	48
Implantes de aloinjerto osteocondral.....	50
Almacenaje a bajas temperaturas del cartílago articular.....	53
Almacenaje a bajas temperaturas y criopreservación.....	54
Características de los factores de la criopreservación.....	59
El agente refrigerante o criógeno.....	59
Los agentes crioprotectores.....	60
La L-Glutamina y la Albúmina Humana.....	61
Los agentes antimicrobianos.....	61
La viabilidad post-criopreservación.....	62
Importancia de la superficie del aloinjerto osteocondral.....	66
Escalas para el estudio de la morfología de la superficie.....	67
El microscopio electrónico de barrido (MEB).....	70
El microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA).....	70
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	71
MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
El modelo animal.....	77
Diseño del experimento.....	78

El cálculo del tamaño de la muestra.....	78
Protocolo de eutanasia.....	79
Técnica de disección.....	79
Preservación de los injertos osteocondrales.....	80
Injerto osteocondral en estado fresco.....	80
Injerto osteocondral congelado.....	81
Descongelación del injerto preservado por congelación.....	81
Injerto osteocondral criopreservado.....	82
Solución crioprotectora.....	84
Descongelación del injerto preservado por criopreservación.....	84
Microscopía electrónica ambiental de barrido de la superficie del cartílago.....	86
Estudio fotográfico.....	87
Clasificación de la superficie cartilaginosa.....	88
Confiabilidad, validez y varibilidad del sistema de clasificación.....	89
Medición de la confiabilidad (variabilidad intra-observador).....	89
Medición de la validez.....	90
Medición de la variabilidad (variabilidad inter-observador).....	91
Comparación entre grupos de estudio.....	94
RESULTADOS.....	95
1º.- Fotografiar con un microscopio electrónico de barrido ambiental la superficie articular de injertos osteocondrales en estado fresco, conservados por congelación y por criopreservación, sin emplear métodos físico-químicos de fijación de la muestra.....	97
2º.- Diseñar un sistema de clasificación de los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, empleando fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental y validando dicho sistema por variabilidad intra e interobservador.	113
3º.- Emplear un sistema de clasificación validado para comparar los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, con los de injertos que han sido almacenados por congelación y por criopreservación, a partir de fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental.....	142
DISCUSIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS.....	153
El modelo animal.....	155

Diseño del experimento y cálculo del tamaño de la muestra.....	155
Diseño del experimento.....	155
Principio de la replicación.....	156
Principio de la aleatorización.....	157
Principio del control local o bloqueo.....	157
El cálculo del tamaño de la muestra.....	158
Protocolo de eutanasia.....	158
Técnica de disección.....	159
Preservación de los injertos osteocondrales.....	159
Injerto osteocondral en estado fresco.....	159
Injerto osteocondral congelado.....	160
Injerto osteocondral criopreservado.....	160
Solución crioprotectora.....	160
Solución RPMI sin L-Glutamina.....	161
Solución de Albúmina Humana al 20 %.....	161
Solución de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 %.....	161
Curvas de congelación y recalentamiento de los injertos mantenidos en congelación o criopreservación.....	162
Curva de congelación.....	162
Curva de recalentamiento.....	164
Toma de la muestra del cartílago.....	165
Microscopía electrónica.....	165
Análisis de la variabilidad intra e interobservador.....	174
Comparación entre los grupos de estudio.....	177
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	179
1º.- Fotografiar con un microscopio electrónico de barrido ambiental la superficie articular de injertos osteocondrales en estado fresco, conservados por congelación y por criopreservación, sin emplear métodos físico-químicos de fijación de la muestra.....	181

2º.- Diseñar un sistema de clasificación de los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, empleando fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental y validando dicho sistema por variabilidad intra e interobservador.	190
3º.- Emplear un sistema de clasificación validado para comparar los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, con los de injertos que han sido almacenados por congelación y por criopreservación, a partir de fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental.....	198
CONCLUSIONES	205
REFERENCIAS	209

Introducción

Estructura y función del cartílago articular

El cartílago hialino (también llamado cartílago articular), es un tejido elástico avascular, aneural y alinfático, que recubre la superficie articular de los huesos de las articulaciones diartroidales y que tiene como función soportar las cargas, proporcionar una excelente fricción, lubricación y las características de desgaste requeridas para el continuo movimiento de deslizamiento. También funciona absorbiendo el choque mecánico y distribuyendo la fuerza aplicada sobre las estructuras óseas de soporte. En condiciones fisiológicas, el cartílago articular (Fig. 1) puede llevar a cabo sus funciones biomecánicas esenciales durante cinco o seis décadas experimentando poco deterioro.

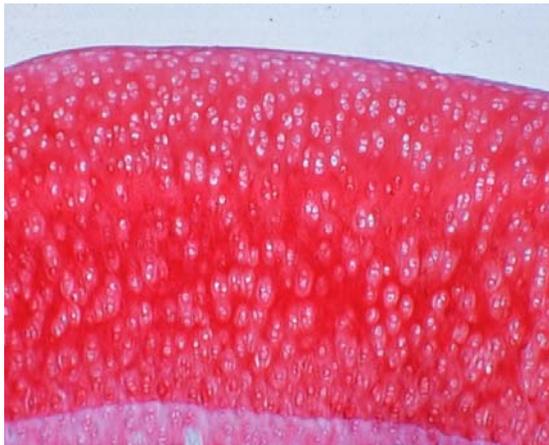


Figura 1: Corte histológico de cartílago articular o hialino

Al igual que otros tejidos conectivos del organismo, incluyendo tendones, ligamentos y meniscos, el cartílago articular está constituido por una matriz rica en agua, una estructura de fibras macromoleculares y por un número relativamente pequeño de células que reciben el nombre de condrocitos.

Los condrocitos

Los condrocitos (Fig. 2) son células altamente especializadas que producen y mantienen la matriz extracelular del cartílago. Ocupan menos del 10 % del volumen tisular total, con variaciones de unas articulaciones a otras (Buckwalter, 1999).

Los condrocitos de las distintas capas del cartílago articular difieren en forma, tamaño y probablemente en actividad metabólica (Aydelotte y col, 1992). Todos ellos poseen la ultraestructura necesaria para la síntesis de los componentes de la matriz extracelular. Además, estas células cuentan con filamentos intracitoplasmáticos, lípidos, glucógenos y cilios de la célula a la matriz, que se cree que tienen un rol de detección de cambios en la mecánica del entorno (Buckwalter y Mankin, 1998).

Los condrocitos no mantienen contacto entre sí y están rodeados por tres capas concéntricas de matriz extracelular distinguibles en su composición. Estas capas, desde la célula a la periferia, se denominan: región pericelular, región territorial y región interterritorial, las cuales son descritas posteriormente. Al conjunto formado por un condrocito y el microambiente que le rodea (matriz pericelular y matriz territorial), se llama condrón o condrona y constituye la unidad anatómica, mecánica e histogenética del cartílago.

Cuando los condrocitos llegan a su madurez, tienen un aspecto esférico al microscopio electrónico de transmisión y sintetizan colágeno tipo II, agregados de proteoglicanos y proteínas no-colágeno-específicas. Cuando se mide la actividad metabólica del condrocito como célula individual se observa que ésta

es muy elevada, pero al medir la actividad metabólica del cartílago articular como tejido nos encontramos que es escasa debido a la poca densidad celular.

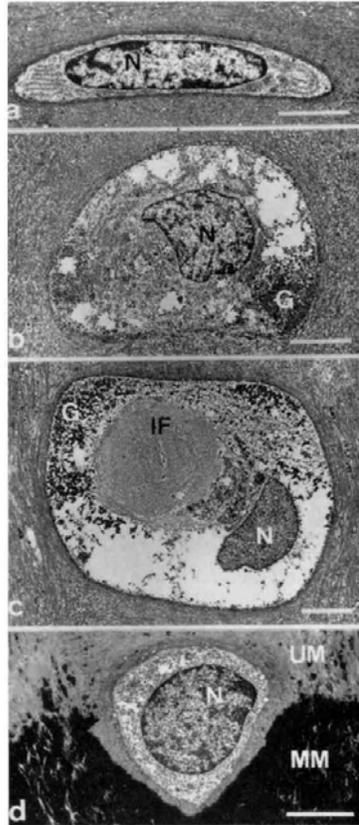


Figura 2: Fotografías de condrocitos con microscopio electrónico de transmisión, a partir de cartílago articular de cóndilo femoral medial de un conejo esqueléticamente maduro.
Leyenda: a: zona superficial, b: zona intermedia, c: zona radial, d: zona de cartílago calcificado, N: núcleo, G: glucógeno, IF= Filamentos intermedios, UM: Matriz no mineralizada. MM: Matriz mineralizada. La barra representa tres micrómetros. (Buckwalter y Mankin, 1998).

Por todas estas características parece que, en primera instancia, los condrocitos juegan un papel secundario en el funcionamiento del cartílago articular maduro, pues las propiedades mecánicas del tejido dependen básicamente de su matriz extracelular. Sin embargo, una matriz formada artificialmente combinando únicamente las proporciones adecuadas de agua y de macromoléculas, no es suficiente para obtener los mismos resultados que el tejido natural. El mantenimiento de esas propiedades mecánicas requiere

de un recambio de macromoléculas de la matriz, consistente en la reposición continua de los elementos que hayan sido degradados. Probablemente requieran, además, de alteraciones en la red macromolecular en respuesta al uso de la articulación, por lo que se cree que son los condrocitos los que responden sintetizando tipos apropiados de macromoléculas en cantidades justas.

En el cartílago maduro los condrocitos se nutren de moléculas que deben vencer una doble barrera de difusión para alcanzar a la célula. La primera barrera es el tejido y el líquido sinovial y la segunda es la matriz del cartílago. Esta última no solo es restrictiva con respecto al tamaño de los materiales, también lo es a la carga eléctrica de los nutrientes y a su configuración molecular. Las características de estas barreras dejan a los condrocitos en una baja concentración relativa de oxígeno por lo que cuentan principalmente con un metabolismo anaeróbico.

La actividad y función de los condrocitos durante el crecimiento esquelético cambian en función de las fases del crecimiento. En las primeras etapas del desarrollo, el cartílago tiene una alta densidad de condrocitos que proliferan rápidamente y que producen tejido nuevo para expandir y remodelar la superficie articular, por lo que es en este momento cuando alcanzan su máxima actividad metabólica. En los mamíferos en crecimiento, los condrocitos producen matriz extracelular fundamentalmente en dos zonas: la zona periférica, que aumenta y expande la superficie articular y la zona central que sirve como centro de osificación endocondral de la epífisis.

Cuando se alcanza la madurez esquelética, las tasas de actividad metabólica, síntesis de matriz y de división celular, disminuyen notoriamente. Al completar el crecimiento, probablemente la mayoría de los condrocitos no volverán a

dividirse, pero continuarán sintetizando colágeno, proteoglicanos y proteínas no colágenas.

La permanencia de esta capacidad de síntesis sugiere que el cartílago articular requiere de una renovación continua de la red de macromoléculas de la matriz, regulada por las mismas células, pero influenciadas por otros factores tales como la frecuencia e intensidad de las cargas articulares.

A medida que envejece el individuo, la capacidad de las células de sintetizar algunos tipos de proteoglicanos y de responder al estímulo externo, incluyendo factores de crecimiento, disminuyen. Estos cambios relacionados con la edad, pueden limitar la habilidad de las células en mantener el tejido y por lo tanto contribuir al desarrollo de la degeneración del cartílago articular (Bentley y Minas, 2000).

La matriz extracelular

La matriz extracelular del cartílago articular tiene fundamentalmente dos componentes: el fluido tisular y la red de macromoléculas. La asociación de ambas le confieren al tejido forma y propiedades mecánicas de rigidez y resistencia.

El fluido tisular

El fluido tisular del cartílago está constituido por agua, gases, pequeñas proteínas, metabolitos y una alta concentración de cationes para equilibrar la carga negativa de los proteoglicanos.

El agua puede constituir hasta un 80 % del peso húmedo del cartílago articular. Su volumen y concentración está determinada por la interacción con las macromoléculas de la matriz (fundamentalmente con los proteoglicanos) y es un factor importante en determinar la propiedades mecánicas del tejido.

La red estructural de macromoléculas

Las macromoléculas estructurales del cartílago son fundamentalmente los colágenos, los proteoglicanos y algunas proteínas no colágenas (se incluyen en este grupo a las glicoproteínas) (Bruckwalter y col 1998, 1994, 1982). Estas tres clases de macromoléculas se diferencian en su concentración en el tejido y en su contribución a las propiedades tisulares. Los colágenos constituyen cerca del 60 % del peso seco del cartílago; los proteoglicanos de un 25 % a 35 % y las proteínas no colágenas y glicoproteínas de un 15 % a 20 %. Los colágenos están distribuidos relativamente de modo uniforme en la profundidad del cartílago, a excepción de la zona superficial rica en colágeno. La red de colágeno fibrilar da al cartílago forma y fuerza tensil (Bruckwalter y Mankin, 1998). Los proteoglicanos y las proteínas no colágenas se unen a la red de colágeno para interactuar mecánicamente con el agua. Algunas proteínas no colágenas ayudan a organizar y estabilizar la red de macromoléculas de la matriz, mientras que otras ayudan a los condrocitos a mantenerse unidos a esta red.

Los colágenos

El cartílago articular contiene múltiples tipos de colágeno genéticamente distintos. (Eyre, 1995; Eyre y col., 1992; Sandell, 1995). Estas moléculas se disponen en redes a lo largo del tejido, confiriéndole rigidez, fuerza y cohesividad, gracias a su interacción con los proteoglicanos.

El colágeno tipo II es el principal tipo de colágeno en el cartílago, ya que está presente en un 90 % a 95 % y conforma el componente más importante de las fibrillas de bandas cruzadas. Las moléculas de colágeno tipo IX tienen enlaces covalentes con las capas más superficiales de las fibrillas de banda cruzadas y se proyectan a la matriz, donde pueden formar nuevos enlaces covalentes con otras moléculas de colágeno tipo IX. Las moléculas de colágeno tipo XI tienen enlaces covalentes con moléculas de colágeno tipo II y probablemente forman parte de la estructura interna de las fibrillas de bandas cruzadas. Todavía no se conoce si el colágeno IX y el XI tienen funciones específicas, pero presuntamente ayudan a formar y a estabilizar las fibras de colágeno compuestas de moléculas de colágeno tipo II. Aparentemente, el colágeno tipo VI forma parte importante de la matriz que rodea inmediatamente al condrocito y lo ayuda a unirse al resto de la matriz extracelular (Hagiwara y col, 1993; Martell-Pelletier, 1998). La presencia de colágeno tipo X únicamente en las proximidades de las células de la zona calcificada del cartílago articular y de la zona hipertrófica de la placa de crecimiento, sugiere un rol en la mineralización del cartílago.

Los proteoglicanos

Los proteoglicanos son macromoléculas constituidas por un centro proteico con una o más cadenas de glicosaminoglicanos. Entre algunos de los glicosaminoglicanos que se han detectado en el cartílago articular están el ácido hialurónico, el condroitín sulfato, el keratán sulfato y el dermatán sulfato. La concentración de estas moléculas varía según la región interna del cartílago, así como con la edad del individuo y la enfermedad o lesión que en él pudieran estar presentes.

El cartílago articular contiene dos grandes clases de proteoglicanos: los grandes monómeros de proteoglicanos agregantes (agreganos) y los pequeños proteoglicanos que incluyen la decorina, el biglicano y la fibromodulina. Debido a que el colágeno tipo IX puede poseer un componente glicosaminoglicano, es considerado también como un proteoglicano. Los agreganos poseen un gran número de cadenas de condroitin sulfato y keratan sulfato unidos a una molécula central de proteína. El cartílago también contiene grandes proteoglicanos no agregantes (Ratcliffe y Mow, 1996; Buckwalter, 1995b) que parecen agreganos en estructura y composición, por lo que se ha pensado que pueden ser agreganos degradados.

Probablemente el cartílago contiene otros pequeños proteoglicanos que todavía no han sido identificados. Las moléculas de agreganos completan mucho del espacio interfibrilar de la matriz del cartílago, contribuyendo así a casi un 90 % de la masa total de proteoglicanos extracelulares del tejido. Los proteoglicanos largos no agregantes solo constituyen un 10 % o menos, y los pequeños proteoglicanos no agregantes conforman cerca del 3 %. Aunque los pequeños proteoglicanos contribuyen relativamente poco a la masa total de proteoglicanos del cartílago, al compararlos con los agreganos, por su pequeño tamaño podrían estar presente en cantidades molares iguales o mayores a estos.

En la matriz del cartílago articular muchos agreganos no-covalentes se asocian al ácido hialurónico (hialuronato) y a la vez se unen a proteínas (pequeñas proteínas no colágenas) para conformar agregados proteoglicanos. Estas grandes moléculas contienen una molécula central de hialuronato. La formación de estos agregados ayuda a anclar los proteoglicanos en la matriz, previniendo así su desplazamiento durante la deformación del tejido. Además, permiten organizar y estabilizar las relaciones entre proteoglicanos y la red colágena.

La pérdida de los agregados proteoglicanos parece ser uno de los cambios más tempranos asociados con la artrosis y los cambios secundarios a la inmovilización de una articulación. Además, el proceso de envejecimiento de un individuo, per se, también está asociado con la pérdida de proteoglicanos del cartílago articular (Buckwalter y col., 1985, 1994).

Las proteínas no colágenas y las glicoproteínas

No se conoce tanto de las proteínas no colágenas y de las glicoproteínas como se conoce del colágeno y de los proteoglicanos. Existe una amplia variedad de estas moléculas en el cartílago articular normal, pero solo algunas pocas han sido estudiadas. En general, consisten principalmente en cadenas de aminoácidos y algunas poseen, adicionalmente, monosacáridos y oligosacáridos unidos directamente a ellas. Se cree que algunas de estas moléculas ayudan a organizar y mantener la estructura de la red macromolecular de la matriz. La Ancorina C-II es una proteína de superficie unidora de colágeno que está presente en el condrocito y que le ayuda a mantenerse unido a las fibras colágenas de la matriz (Pfaffle y col, 1990). La proteína oligomérica del cartílago está concentrada mayormente en la matriz próxima al condrocito por lo que se sospecha que su función también es fijar la posición del condrocito en relación a la matriz extracelular. La Fibronectina se encuentra presente en una variedad de tejidos, pero su función no está esclarecida todavía, aunque se sospecha que juega distintos roles en la organización de la matriz, en la interacción célula-matriz y en las respuestas del cartílago en la artritis reumatoidea y la artrosis (Glant y col, 1985).

Regiones del cartílago articular

Para formar el cartílago articular, los condrocitos organizan las moléculas de colágenos, proteoglicanos y proteínas no colágenas en una estructura altamente organizada cuya composición, distribución y disposición cambia según su profundidad en el tejido y su proximidad al condrocito (Buckwalter, 1999).

Las zonas del cartílago articular

Los cambios morfológicos de los condrocitos y de la matriz extracelular desde la superficie articular hasta el hueso subcondral, hacen posible identificar en el cartílago articular cuatro capas o zonas: la zona superficial, la zona transicional, la zona media (también llamada zona radial o profunda) y la zona del cartílago calcificado (Mankin y col, 1997). El tamaño relativo y aspecto de estas zonas varían según la especie del individuo, e incluso entre las articulaciones de una misma especie, por lo que es importante no extrapolar directamente los resultados de experimentos de cartílago de una especie a otra (Buckwalter y col, 1998, 1996, 1994). Aunque cada zona tiene aspectos morfológicos distintos, no siempre es fácil encontrar los límites entre ellas. Sin embargo, estudios biológicos y mecánicos han demostrado que la organización zonal tienen importancia funcional (Aydelotte, 1992; Buckwalter, 1999).

Según la zona, la matriz extracelular difiere en concentración de agua, proteoglicanos y en el tamaño de los agregados (Buckwalter, 1999). Las células, de acuerdo a la región donde se encuentren, varían en forma, tamaño, orientación relativa a la superficie articular y en actividad metabólica (Aydelotte, 1992) (Fig. 3). Ellas responden distintamente a la carga mecánica, sugiriendo que el desarrollo y mantenimiento del cartílago articular

normal depende, en parte, de las variadas poblaciones fenotípicas de los condrocitos.

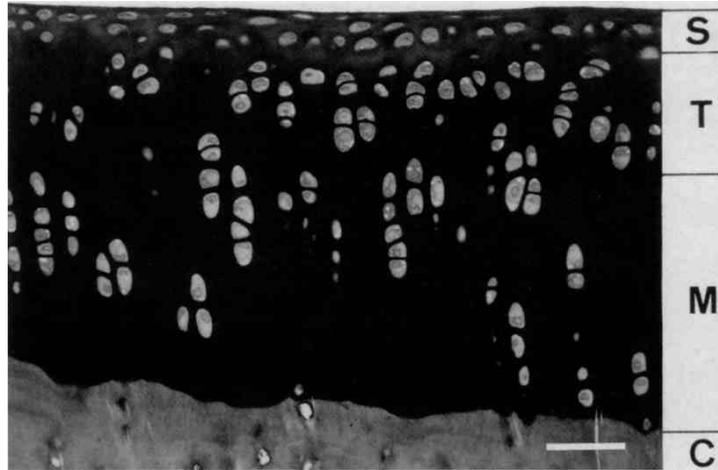


Figura 3: Estructura del cartílago articular de cóndilo femoral medial de conejo New Zealand de ocho meses de edad. El tejido está organizado en cuatro capas o zonas. S: zona superficial, T: zona transicional, M: zona media o radial, C: zona de cartílago calcificado. La barra representa cincuenta micrómetros. (Buckwalter y Mankin, 1998).

La zona superficial

La estructura y composición de esta zona le confieren propiedades mecánicas y biológicas especiales para soportar el deslizamiento articular. Esta región está compuesta por dos capas, una superficial y otra profunda. La capa superficial recibe el nombre de *lamina splendens* y está conformada por finas fibras, con pocos polisacáridos y sin células. En la segunda capa, más profunda que la primera, los condrocitos poseen forma elipsoidal y se disponen de modo tal que su eje mayor es paralelo a la superficie articular. Estos condrocitos sintetizan una matriz que, en relación con las demás zonas del cartílago, tiene una baja concentración de proteoglicanos y una alta concentración de colágeno. Igualmente, las concentraciones de fibronectina y de agua son altas en estas zonas. Los cultivos celulares de los condrocitos de

la zona superficial han demostrado que estos degradan más rápidamente a los proteoglicanos y sintetizan menos colágeno y proteoglicanos que lo que lo hacen sus homólogos de las zonas más profundas (Aydelotte, 1992).

La densa matriz de fibrillas colágenas dispuestas paralelamente a la superficie articular en la zona superficial, ayuda a determinar las propiedades mecánicas del tejido y afecta el movimiento de moléculas hacia y desde el cartílago. Estas fibrillas confieren a esta zona una gran rigidez y resistencia en comparación con las zonas más profundas (Buckwalter y col, 1985; Ratcliffe y Mow, 1996; Dijkgraaf y col, 1995). Experimentos in vitro han demostrado que la zona superficial contribuye considerablemente al comportamiento del cartílago cuando éste es comprimido (Mankin y col, 1997). Si se elimina esta zona aumenta la permeabilidad del tejido y posiblemente aumenta la carga física de la red de macromoléculas durante la compresión. La disrupción o alteración de la matriz colágena densa de la zona superficial es uno de los primeros cambios en la degeneración experimental inducida del cartílago articular (Guilak, 1994), lo cual sugiere que alteraciones en esta zona pueden contribuir al desarrollo de artrosis por cambio del comportamiento mecánico del tejido.

Las fibrillas de colágeno, densamente empaquetadas, crean una delgada capa que limita el ingreso y salida de grandes moléculas a la matriz celular, tal y como ocurre con los anticuerpos y otras proteínas. Por este motivo se dice que el cartílago cuenta con una barrera efectiva contra el sistema inmunológico. Estas propiedades han hecho sospechar que si se produjera la disrupción de la zona superficial, además de alterar la estructura y propiedades mecánicas del cartílago, se podría inducir una respuesta inflamatoria o inmunológica patológica (Friedlander y col, 1999).

La zona transicional

Como su nombre lo indica, la morfología y composición de la matriz en esta región es intermedia entre la zona superficial y la zona media. Las células en la zona transicional presentan forma esferoidal y una mayor concentración de organelos destinados a sintetizar una matriz que se caracteriza por poseer un conjunto desorganizado de fibrillas colágenas de mayor diámetro, de mayor concentración de proteoglicanos y de menor concentración de agua y colágeno, en comparación con la matriz de la zona superficial.

La zona media (radial o profunda)

Los condrocitos en la zona media poseen forma esferoidal y tienen tendencia a alinearse en columnas perpendiculares a la superficie articular. Esta zona posee las fibras colágenas de mayor diámetro en el cartílago, así como la mayor concentración de proteoglicanos y la menor concentración de agua. Las fibras colágenas pasan a través de la marca de agua, que es una tenue línea basófila visible a la microscopia de luz. La naturaleza de la marca de agua todavía no está esclarecida. Puede que resulte de la concentración de material basófilo calcificado en la interfase entre la matriz calcificada y la no calcificada. Otra alternativa es que se trate de una estructura matricial bien definida compuesta de una banda de fibrillas finas.

La zona de cartílago calcificado

Una delgada zona de cartílago calcificado separa la zona media de la zona de hueso subcondral. Las células de la zona de cartílago calcificado tienen un menor volumen que las zonas de la zona radial y contienen solo pequeñas

cantidades de retículo endoplasmático rugoso y de membrana de Golgi. En algunas regiones estas células parecen estar rodeadas completamente de cartílago calcificado, lo que sugiere que tienen una tasa metabólica muy baja. Oegema y Thompson (1995) sugirieron que estas células podían jugar algún papel en el desarrollo y progresión de la artrosis.

Las regiones de la matriz extracelular

Las variaciones en la matriz extracelular dentro de las zonas del cartílago articular permiten distinguir tres compartimientos o regiones: una región pericelular, una región territorial y una región interterritorial.

Las regiones pericelulares y territoriales contienen las moléculas que unen las membranas celulares de los condrocitos a las macromoléculas de la matriz. A la vez protegen a las células del daño que pueden sufrir durante la carga y la deformación del tejido. Estas regiones también pueden ayudar a transmitir señales mecánicas del tejido cuando la matriz se deforma durante la carga articular. Por otra parte, la función primaria de la matriz interterritorial es proveer propiedades mecánicas al tejido, las cuales serán mencionadas más adelante.

La región pericelular

Las membranas celulares de los condrocitos, aparentemente, se unen al delgado borde de la matriz pericelular que cubre la superficie celular. Esta región es rica en proteoglicanos, proteínas no colágenas tales como la Ancorina C-II (Mollenhauer y col. 1984; Pfaffle y col, 1990) y colágenos no

fibrilares (amorfo) tales como el colágeno tipo VI (Hagiwara, 1993). En esta región es muy escaso el colágeno fibrilar.

La región territorial

En esta región se encuentran fibras colágenas delgadas que parecen adherirse a la matriz pericelular rodeando a los condrocitos, proporcionándoles protección mecánica durante la carga y la deformación del tejido. Es precisamente esta red colágena la que marca la frontera entre las matrices territoriales e interterritoriales. Sin embargo, muchas fibras colágenas interconectan a las dos regiones haciendo difícil, en ocasiones, identificar los límites entre ellas.

La región interterritorial

La matriz interterritorial constituye la mayor parte del volumen del cartílago articular maduro y contiene las fibrillas colágenas de mayor diámetro. A diferencia de las fibras colágenas de la matriz territorial, estas fibras no rodean al condrocito y cambian noventa grados de orientación en relación a la superficie articular, desde la zona superficial hasta la zona radial. En la zona superficial las fibrillas tienen un diámetro relativamente pequeño y generalmente se encuentran paralelas a la superficie articular. En la zona transicional las fibrillas asumen ángulos más oblicuos que en la zona superficial y en la zona radial se disponen, en su mayoría, perpendicularmente a la superficie articular.

Interacciones entre los condrocitos y la matriz

La relación entre los condrocitos y la matriz hace posible el mantenimiento del cartílago a lo largo de la vida del individuo. La matriz protege a los condrocitos del daño mecánico durante el uso normal de la articulación, ayudando a mantener su forma y fenotipo. Nutrientes, substratos para la síntesis de las moléculas de la matriz, moléculas recientemente sintetizadas, moléculas matriciales degradadas, productos de desecho metabólico y moléculas que ayudan a regular el funcionalismo celular, tales como citoquinas y factores de crecimiento, pasan a través de la matriz extracelular y en algunos casos pueden ser almacenadas allí. Los tipos de moléculas que pueden pasar a través de la matriz, así como la tasa a la cual lo hacen, dependen de la composición y organización de la matriz, principalmente por la concentración, composición y organización de los grandes proteoglicanos.

A lo largo del ciclo vital, los condrocitos degradan y sintetizan las macromoléculas de la matriz. Los mecanismos que controlan el equilibrio entre estas actividades permanecen poco comprendidos hasta ahora, pero se cree que hay citoquinas con efectos anabólicos y catabólicos que juegan roles importantes (Van Den Berg, 1999). Por ejemplo, la interleukina-1 induce la síntesis de proteasas capaces de degradar las macromoléculas de la matriz e interferir con la síntesis de proteoglicanos a nivel transcripcional. Otras citoquinas se oponen a actividades catabólicas estimulando la síntesis de matriz y la proliferación celular. En respuesta a una variedad de estímulos, los condrocitos sintetizan y liberan estas citoquinas a la matriz, donde se unen a receptores de la superficies celulares (de la misma célula o sus vecinas) o simplemente permanecen en la matriz.

La matriz extracelular también actúa como un transductor de señal para los condrocitos. Esta transmite las señales que resultan de la carga mecánica de la superficie articular a los condrocitos y estos responden alterando la composición de la matriz (Eyre, 1995).

Los detalles de cómo la carga articular influyen en la función de los condrocitos permanecen todavía desconocidos, pero se sabe que la deformación de la matriz produce efectos físicos, químicos y eléctricos que pueden influenciar a estas células, produciendo la circulación de fluido tisular que induce cambios en los flujos de nutrientes, metabolitos, e iones a través de la matriz. Del mismo modo, la carga también puede causar cambios persistentes en la organización molecular de la matriz, alterando la respuesta de los condrocitos. Por lo tanto, la matriz no solo traduce y transmite señales, también puede registrar la historia de la carga física del tejido y alterar la respuesta de las células sobre la base de la historia de esa carga (Buckwalter y Mankin, 1998).

Obstáculos en la reparación fisiológica del cartílago articular

La escasa capacidad regenerativa del cartílago articular se conoce desde los tiempos de Hipócrates (Gillooly y col, 1998), pero fue Hunter (1743) quien describió explícitamente que las lesiones en el cartílago articular no curaban espontáneamente (Fig. 4). Según Shortkroff y col. (1996), los factores relacionados con la ineficiente reparación del cartílago articular son múltiples y pueden clasificarse en tres grupos: factores vinculados a la anatomía del tejido, factores inherentes a los condrocitos y factores relacionados a la matriz extracelular.

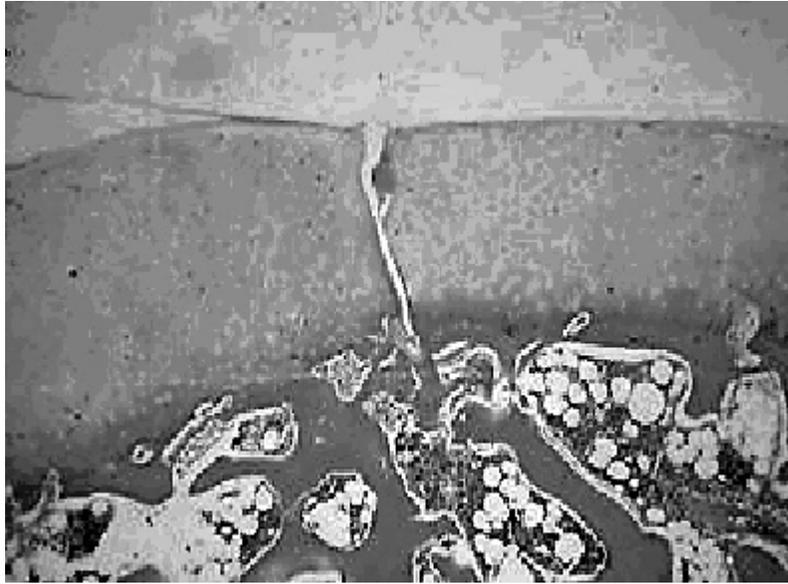


Figura 4: Debido a la escasa capacidad de regeneración del cartílago articular, las lesiones de todo el espesor del tejido no son capaces de curarse espontáneamente y tienden a degenerar, probablemente hacia la artrosis.

Factores vinculados a la anatomía del cartílago articular

El cartílago articular carece de nervios, vasos sanguíneos y linfáticos, lo cuál lo sitúan en una verdadera condición de aislamiento con el resto del organismo. En caso de producirse una lesión no hay forma de comunicar su presencia a los demás órganos, hasta que ocurra una irritación sinovial.

Agentes químicos inyectados dentro de una articulación, como los utilizados para el tratamiento de enfermedades sinoviales, pueden tener efectos adversos sobre el cartílago, pero la ausencia de terminaciones nerviosas previenen el reconocimiento de la lesión. Del mismo modo, la ausencia de elementos vasculares impide que se establezca una reacción inflamatoria ante un traumatismo, por lo que en estos casos no estará presente esta fase crucial del proceso de reparación.

El aislamiento del cartílago se agrava todavía más si se recuerda que los nutrientes de los condrocitos deben vencer la doble barrera fisiológica antes de alcanzar a estas células.

Factores inherentes a los condrocitos

La baja densidad de células en el cartílago articular en comparación con otros tejidos, influye directamente en su capacidad de regeneración, pues son estas las encargadas de mantener las propiedades de la red de macromoléculas de la matriz extracelular. La limitada actividad mitótica de los condrocitos del cartílago adulto y su bajo número de células precursoras en la médula ósea, son otros de los factores que inciden desfavorablemente en este sentido.

Factores relacionados con la matriz extracelular

Debido a las cargas eléctricas de la red de macromoléculas y a la presencia de fibras de colágenos en los aspectos más superficiales de la matriz extracelular, se obstaculiza la migración de moléculas y enzimas que podrían favorecer el remodelado interno del cartílago.

Respuesta del cartílago articular a las lesiones mecánicas

En lesiones mecánicas limitadas a la sustancia del tejido cartilaginoso (lesiones condrales), la respuesta del tejido carece de un componente inflamatorio por la falta de red de capilares. La reacción, independientemente de su extensión, se caracteriza por un aumento de la actividad metabólica de los condrocitos próximos a los bordes de la lesión y un relativo aumento del comportamiento mitótico de los mismos. Esta actividad, está vinculada con modificaciones en la tasa de síntesis de componentes de la matriz, tal y como Schachar y col.

(1977) demostraron con sus experimentos de captación de $^{35}\text{SO}_4$ (como indicador de la síntesis de glucosaminoglicanos) y de ^3H -glicina (como indicador de la síntesis de proteínas). Este proceso reparativo es muy limitado, poco eficiente y al cabo de una semana los niveles de captación de los marcadores radiactivos son equivalentes a los encontrados en tejidos no lesionados.

En lesiones más profundas, donde se afecta la placa ósea subyacente al tejido cartilaginoso (lesiones osteocondrales), la respuesta inflamatoria es mayor y está mediada por la red vascular del hueso. El efecto de esta respuesta del organismo, es similar a la que ocurre en otros tejidos vascularizados. Inicialmente, el defecto es ocupado por sangre que se organiza en un coágulo fibroso englobando eritrocitos, plaquetas y elementos celulares de la médula ósea. Las células indiferenciadas se transforman en fibroblastos que junto a la red capilar creciente van produciendo, dentro del coágulo de fibrina, un tejido granuloso reparativo. Con la fibrosis progresiva, el defecto queda ocupado con una cicatriz laxa en aproximadamente diez días, la cual se va haciendo paulatinamente menos vascularizada y más esclerótica. Finalmente se produce una masa fibrocartilaginosa que rellena y une firmemente los bordes de la lesión original.

Historia natural de las lesiones del cartílago articular

Debido a la falta de inervación del cartílago, una lesión aislada en este tejido no produce dolor. Por lo tanto, los pacientes desconocen su situación, no acuden al médico y no se documenta la historia natural de las lesiones condrales (Fig. 5).

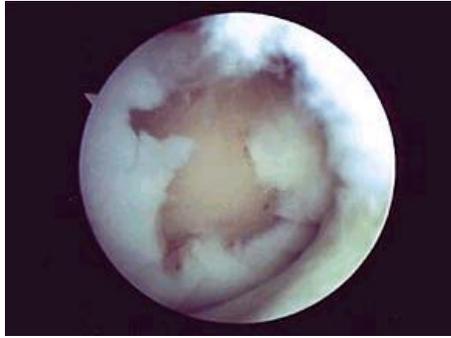


Figura 5: Lesiones del cartílago como la que muestra esta fotografía son asintomáticas a menos que haya afectación de estructuras próximas inervadas.

Aunque existen pocas evidencias en la literatura médica sobre la relación entre el daño del cartílago articular y el desarrollo de artrosis, muchos investigadores han asumido que las lesiones del cartílago se originan durante la actividad física cotidiana o deportiva y progresan tempranamente hasta la artrosis por los efectos de sobrecarga y fricción que se generan en las superficies articulares (Minas y Nehrer, 1997).

El conocimiento actual de la historia natural de las lesiones del cartílago articular se debe en gran parte a los estudios experimentales y en humanos de la artrosis fémoro patelar, así como del seguimiento de pacientes con ostecondritis disecante (Jobanputran y col, 2000).

Los trabajos de Ficat (1973, 1979), con microscopía electrónica de barrido, sobre la condropatía post-contusiva en patelas de conejos y de humanos, le permitió concluir que existían varias fases de la enfermedad, reflejada en fenómenos macro y microscópicos. A nivel macroscópico Ficat (1979) describió que ocurría: 1º. Edema: fenómeno prácticamente inmediato y constante a la contusión y que el autor pensaba que disminuía espontáneamente después del sexto mes. 2º. Fisura: es inmediata en muchos de los casos, no cura. 3º. Ulceración: es consecuencia de la de la degeneración de la fisura. A nivel

microscópico describió: 1º. Fisura: puede ser parcial o total en relación a la profundidad del tejido. 2º. Los condrocitos de la capa superficial: tienden a desaparecer y tienen aspecto preneocrótico y degenerativo. 3º. Deterioro de las fibras de la matriz.

Otros estudios que han aportado conocimiento sobre la artrosis son los de osteocondritis disecante. Según Insall y col (1993) la osteocondritis disecante es un proceso en el cual un segmento de cartílago, junto a hueso subcondral, se separa de una superficie articular. Suele ocurrir en el cóndilo femoral medial de personas jóvenes, de preferencia atletas. Su origen se debate entre los que piensan que puede tener exclusivamente un origen vascular con necrosis ósea (Jobanputra y col, 2000) y los que apoyan, además de esta hipótesis, el antecedente traumático como evento inicial (Insall y col, 1993).

Linden encontró que el 55 % de los adultos que sufrían de osteocondritis disecante, al cabo de 33 años de seguimiento, presentaban artrosis. Pero ninguno de los niños de esta serie presentó artrosis al cabo del mismo tiempo. Esto hizo concluir al investigador que la reparación de la lesión de la osteocondritis disecante era más eficiente en los niños que en los adultos (Jobanputra y col, 2000).

Diagnóstico de las lesiones condrales

La historia clínica es fundamental para el diagnóstico de una lesión en una articulación. Los síntomas asociados con lesiones del cartílago que abarcan todo su grosor son similares a los producidos en una lesión meniscal (Jobanputra y col, 2000). Los pacientes pueden presentar dolor por inflamación de estructuras próximas y bloqueo e inestabilidad de la articulación afectada.

La mayoría de las veces el diagnóstico de las lesiones del cartílago se hacen por artroscopia, pero según su tamaño, también pueden ser vistas empleando protocolos específicos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), o inclusive con radiografías simples si se trata de una fractura osteocondral, dependiendo del tamaño del componente óseo del cuerpo libre (LaPrade y col, 2001).

Jobanputra y colaboradores (2000) plantean que hay muchos autores que utilizan indistintamente los términos de fractura osteocondral y osteocondritis disecante, con lo cual se ha llevado a múltiples confusiones. Estos autores proponen que las lesiones de osteocondritis disecante son concéntricas, suelen ocurrir en la segunda década de la vida y carecen de antecedente traumático. En cambio, en las lesiones de fracturas osteocondrales hay un antecedente traumático y puede producirse el defecto prácticamente en cualquier parte de la superficie articular.

Clasificaciones de las lesiones del cartílago articular

Las lesiones del cartílago articular pueden ser clasificadas en varias formas. Hay dos sistemas de clasificación muy utilizados hoy en día para clasificar y publicar la severidad de las lesiones articulares por aspecto artroscópico: la clasificación de Outerbridge (1961) y la de Bauer y Jackson (1988).

El sistema de clasificación de Outerbridge fue diseñado para evaluar el grado de condromalacia patelar de un paciente y frecuentemente se utiliza para clasificar las lesiones del cartílago en otras superficies de la rodilla (Outerbridge, 1961). Esta clasificación permite documentar, de acuerdo a las dimensiones, la teórica progresión de los defectos del cartílago. El grado 0 representa el cartílago articular normal. El grado I se refiere a los defectos de reblandecimiento del cartílago. El grado II se refiere a lesiones de la sustancia

sin alcanzar al hueso subcondral ni tener un tamaño superior a 0,5 pulgadas. Hay fisuras tempranas en la superficie. Con los defectos grado III hay fisuras de la superficie que llegan al hueso subcondral en un área con diámetro mayor a 0,5 pulgadas. El hueso no está expuesto visiblemente. En las lesiones grado IV el hueso subcondral está expuesto. En la práctica clínica esta clasificación es ampliamente adoptada especificando por separado el tamaño del defecto.

En un sistema de clasificación alternativo, Bauer y Jackson (1988) describieron seis categorías distintas de lesiones en función del tipo de fractura de la superficie. La clasificación de Bauer y Jackson es útil para detallar la morfología inicial de la lesión y su causa probable. Por ejemplo, los grados I al IV están asociados usualmente a un traumatismo reciente. Los grados V y VI, por lo general, son lesiones antiguas que han progresado de un grado anterior o pueden representar una enfermedad degenerativa articular. La clasificación de Outerbridge está dirigida principalmente a un proceso degenerativo. Minas y Nehrer (1997) consideran que la clasificación de Outerbridge está más aceptada para los procedimientos referentes a la reparación del cartílago, ya que se puede determinar un área focal sintomática candidata a reparación (grados III - IV de Outerbridge) y todavía clasificar el resto de la superficie por grado de degeneración. Esto es importante al momento de establecer comparaciones de resultados clínicos entre rodillas de igual grado degenerativo tratadas por técnicas distintas.

En el año 2000, la International Cartilage Research Society (ICRS) acordó un conjunto de cuestionarios aplicables al paciente y al cirujano para la evaluación de las lesiones del cartílago, combinando de este modo los hallazgos clínicos y anatómicos con una inspección artroscópica. En estos cuestionarios se adapta un sistema de clasificación propio de cinco grados (Grados ICRS del 0 al 4), donde se admite el uso de Indentómetro. Esta

clasificación reconoce básicamente como lesiones a las hendiduras superficiales, hendiduras profundas y prominencias. Cada grado puede contar con uno o más subgrados. Adicionalmente, en estos cuestionarios, se incluye una escala propia diseñada por la ICRS para la osteocondritis disecante (ICRS, 2000)

Prevalencia e incidencia de las lesiones condrales

Por ser asintomáticas, no existen estimaciones precisas de la prevalencia e incidencia de las lesiones condrales en la población en general. Se sabe que las lesiones del cartílago pueden originarse directamente por traumas articulares que no se registran, pero además pueden ocurrir secundariamente a otro tipo de lesiones articulares que causen inestabilidad o una distribución anormal de fuerzas (Jobanputra y col, 2000).

Los pacientes con síntomas articulares suelen ser investigados, diagnosticados y tratados por artroscopia. Curl y colaboradores (1997) presentaron una revisión de más de 30.000 artroscopias evidenciando más de 53.000 lesiones del cartílago en casi 20.000 pacientes con un promedio de 2,7 lesiones por rodilla. En este grupo, el 9,7 % de los pacientes presentaba reblandecimiento del cartílago articular en alguna región (la lesión más simple y asintomática del cartílago), lo cual da una idea del número de lesiones de diagnóstico casual que pueden estar presentes en pacientes con otros síntomas en la rodilla.

La incidencia de osteocondritis disecante, en comparación con las lesiones de cartílago por causas traumáticas, es baja y se encuentra en el orden de 6 a 14 pacientes por 100.000 habitantes (Insall y col, 1993).

Tratamiento de las lesiones condrales

Según Minas y Nehrer (1997) los objetivos de la reparación del cartílago articular deben ser restaurar la integridad de la superficie de la articulación, restablecer el rango completo de movimiento sin dolor y prevenir el deterioro futuro del tejido. No existe una guía clínica única en el tratamiento de estas lesiones, por lo que puede haber algunas diferencias entre los distintos centros en función de la experiencia de su equipo médico y de los recursos económicos disponibles.

Para alcanzar los objetivos que se han comentado, La Prade y colaboradores (2001) sugieren considerar primero los siguientes factores: tamaño de la lesión, localización, alineación de los componentes articulares y las lesiones concomitantes.

Tamaño de la lesión

El tamaño de la lesión tiene una influencia significativa en los síntomas que puede presentar el paciente y en sus actividades funcionales. Debido a que el tamaño de la lesión es importante para estimar un pronóstico, se debe estimar en función de las técnicas de imagen disponibles (Rayos X ó RMN). Es necesario recordar que, a pesar del avance alcanzado con los múltiples protocolos de RMN, el "patrón oro" para determinar las características de las lesiones del cartílago es la medición directa durante una artrotomía a cielo abierto o por la observación directa empleando artroscopia (LaPrade y col, 2001).

Localización de la lesión

Es importante reconocer si hay una única lesión o si son varias. En caso de ser varias lesiones se ha de reconocer si se oponen (disposición especular o bipolar) o están separadas, y en que zona de carga del cóndilo femoral se encuentran. Las lesiones de la patela y del platillo tibial suelen tener peor pronóstico que las ubicadas en fémur, ya que éstas cuentan con menos tratamientos disponibles.

Alineación de los componentes articulares

Minas (1998) plantea que los pacientes sintomáticos que presentan una mala alineación de la articulación y un defecto subyacente o lesiones en espejo, deben ser sometidos a una osteotomía correctiva previo al tratamiento de las lesiones condrales.

Lesiones concomitantes

Lesiones que puedan causar inestabilidad de la articulación (por ejemplo la lesión de ligamentos cruzados en la rodilla) deben ser reparadas antes del tratamiento del defecto articular.

Alternativas quirúrgicas para la reparación de las lesiones del cartílago articular

Desbridamiento artroscópico

Está indicado generalmente en pacientes que tienen lesiones articulares de menos de 1 cm² de superficie o que presenten disposición en espejo (bipolar). Los síntomas (si los hay) deben ser vigilados después del desbridamiento y los pacientes deben participar en un programa de rehabilitación postoperatoria. Los enfermos que con desbridamiento simple por artroscopia no responden satisfactoriamente al procedimiento, son candidatos a nueva valoración y a ser sometidos a una nueva técnica (Curl y col, 1997).

Brocado subcondral y técnica de microfractura

Ambas son técnicas artroscópicas que pueden ser utilizadas, en algunos casos, para estimular la formación fibrocartílago sobre un defecto localizado en los cóndilos femorales (Minas, 1998). El cirujano se vale de un instrumento cortante y rompe en varios puntos la placa de hueso subcondral (microfracturas) o la perfora con una broca, originando un coágulo (Fig. 6). Se cree que algunas de las células progenitoras de la médula ósea se adhieren a la solución de continuidad generada y se diferencian en fibrocartílago o material similar a este. Estos procedimientos suelen tener éxito en pacientes de menos de 30 años que presentan lesiones de 1 a 2 cm² de superficie. Es importante controlar al paciente a lo largo del tiempo, pues al principio pueden responder muy bien al tratamiento y al cabo de unos pocos años recidivar en sus síntomas por el desgaste o pérdida del fibrocartílago de reparación (Gilligly, 1998).

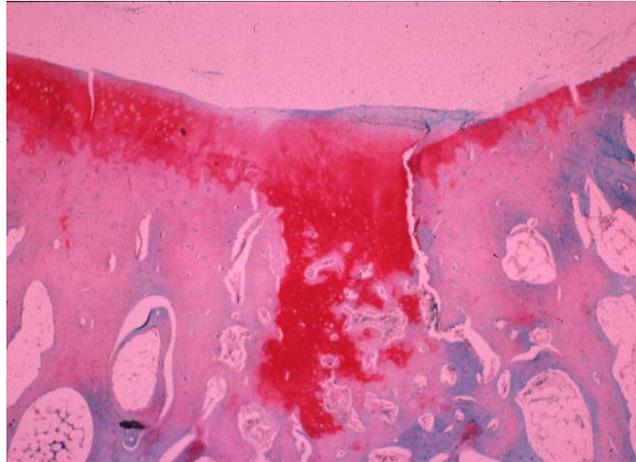


Figura 6: Corte histológico de cartílago hialino donde se observa un coágulo de sangre ocupando el defecto. Los factores inflamatorios y celulares que quedan englobados en este coágulo son los que darán origen al fibrocartílago de reparación.

Autoinjertos osteocondrales (técnica de mosaicoplastia)

Consiste en extraer fragmentos de hueso y cartílago sano de áreas de menos carga de la misma articulación del individuo y transferirlos al área del defecto del cartílago (Fig. 7). En esta técnica se estila perforar la placa de hueso subcondral para facilitar la inserción de los tacos (plugs) osteocondrales, por lo que adicionalmente se beneficia de los principios de las técnicas de microfractura o brocado. El procedimiento suele ser adecuado en lesiones de menos de 2 cm² de superficie (LaPrade, 1999; Minas, 1998), en este caso se puede intentar una vía artroscópica. Sin embargo, para lesiones de más de 2 cm² es necesario practicar una artrotomía a cielo abierto para asegurar que la aplicación de los injertos osteocondrales concuerden con el contorno del cartílago articular. Las áreas donantes y los espacios entre los injertos son ocupados con el tiempo por fibrocartílago de reparación.

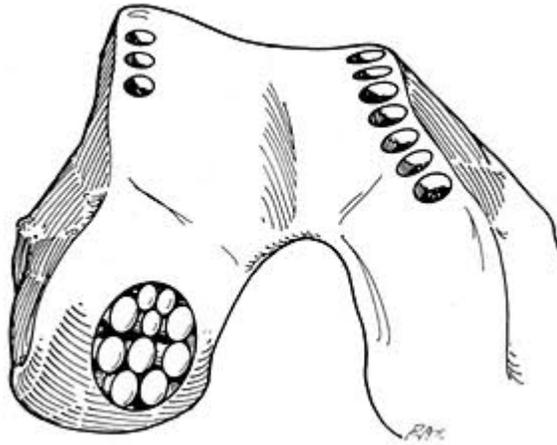


Figura 7: Aspecto de la superficie articular después de una Mosaicoplastia. Autoinjertos reparando el defecto y sitios donantes (Christel y col, 2002)

Implante de condrocitos autólogos cultivados

(transplante de condrocitos)

Es un procedimiento que utiliza los condrocitos del mismo paciente para estimular el crecimiento y formación de un nuevo cartílago que se aproxime mucho al fisiológico. La técnica quirúrgica se diseñó en Suecia en la década de los años ochenta y el resultado del primer ensayo clínico fue presentado por Brittberg y colaboradores (Brittberg y col, 1996). Las indicaciones generalmente aceptada son defectos de $1,5 \text{ cm}^2$ a 4 cm^2 en pacientes de 50 años de edad, o más jóvenes (Minas, 1998).

Gillogly y col (1998) describen el procedimiento de implante de condrocitos autólogos cultivados tal como sigue: el paciente es valorado inicialmente por vía artroscópica, tomando una biopsia de cartílago articular sano de los márgenes laterales o mediales de la tróclea femoral, que corresponden a áreas de baja carga. El cartílago es enviado en medios estandarizados a un laboratorio biotecnológico donde los condrocitos son aislados y cultivados. El

laboratorio devuelve al centro hospitalario los condrocitos replicados en un medio líquido. Para la implantación, se debe practicar una artrotomía a cielo abierto al paciente (segunda intervención). El defecto del cartílago que se desea reparar es desbridado circunferencialmente en sus bordes. En esta fase del proceso, se debe tener especial cuidado de no violar la placa de hueso subcondral para evitar el sangrado. Una vez desbridado, el defecto es medido para calcular el parche (flap) periostico. El parche de periostio se puede obtener de la Fibula o Tibia proximal, y es suturado a puntos separados con sutura reabsorbible. Se asegura la sutura con cola de fibrina obtenida de crioprecipitado del mismo paciente mezclado con trombina y cloruro de calcio. Se deja una pequeña abertura en la porción superior del defecto para inyectar los condrocitos. La abertura del parche es cerrada completamente y la incisión de la artrotomía son cerradas del modo rutinario. La inmovilización de la rodilla se realiza con una férula y se comienza un programa de rehabilitación estricto a partir de las dos semanas de la intervención.

Los resultados clínicos son muy prometedores. Las grandes series de pacientes presentadas a lo largo de los últimos años han demostrado que en un seguimiento de 2 a 10 años se alcanzan 90 % de buenos o excelentes resultados en la reparación de defectos de cartílago articular aislado, 84 % de éxito en la reparación de osteocondritis disecante del fémur y 74 % de éxito en la reparación de lesiones del cartílago de cóndilo femoral y simultáneamente reparación del ligamento cruzado anterior (Minas, 1998).

El alto costo y la larga rehabilitación del paciente son los principales factores que han impedido que este procedimiento haya beneficiado a un mayor número de individuos.

Matrices para la reparación del cartílago

El futuro de la reparación del cartílago, según Coutts y colaboradores (2001) está orientado a matrices celulares diseñadas por ingeniería de tejidos que sirven para sostener a células progenitoras de condrocitos y factores de crecimiento dentro del defecto tisular. Sin embargo, a esta tecnología le falta todavía desarrollo para alcanzar una reparación completamente normal del tejido.

El uso de materiales en las matrices regeneradoras de cartílago puede ser comparada con el uso de los aloinjertos óseos. En el caso del hueso, los aloinjertos promueven la regeneración del tejido por cinco fases (Stevenson, 1999). La primera fase es la invasión vascular, donde se introducen un número de células suplementarias al área dañada. Las células producen proteínas de adherencia que les permiten unirse a al sustrato proporcionado por el injerto. Seguidamente, las células pueblan el injerto por proliferación rápida y la síntesis de matriz extracelular queda a cargo de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos que bajo una normal distribución de cargas mecánicas, resultan en el remodelaje del aloinjerto para un uso funcional por el organismo.

En el caso de la regeneración del cartílago, no hay agente que brinde células primitivas por medio de una red vascular. Sin una fuente de células, el cartílago es incapaz de originar los mecanismos normales de regeneración como ocurren en el hueso. Por lo tanto, debe existir una alternativa para el posicionamiento de las células reparadoras. Como ya se estudió, si la médula ósea accesa la lesión articular puede ser una fuente de células condroprogenitoras, así como también lo es el implante de condrocitos autólogos.

La idea de una matriz como soporte de células condroprogenitoras surge con la intención de mantener a las células implantadas efectivamente en el sitio de la lesión. Además, debe poseer otras propiedades tales como: fuerza mecánica adecuada para proteger a las células contenidas en ella, facilitar la adhesión celular para evitar que las células emigren de ella, debe ser biodegradable para permitir el remodelaje del nuevo cartílago y no debe ser tóxica ni estimulante de procesos inflamatorios que actuarían en detrimento de la estructura neoformada.

Las células que se provean en la matriz deben lograr una reparación biológica del cartílago donde se produzca una sustancia extracelular con propiedades biomecánicas y bioquímicas similares a las del tejido original. Hoy en día se reconocen dos categorías de células que pueden ser empleadas en la ingeniería de tejidos como reparadoras de cartílago. Estas categorías son: 1.- Las células condroprogenitoras provenientes de la médula ósea, el periostio o el pericondrio. 2.- Condrocitos obtenidos del mismo cartílago del paciente. También es posible incorporar células a partir del sitio del defecto.

Han habido trabajos de investigación considerables en relación con el uso de las células condroprogenitoras (Diduch y col, 2000; Majumdar y col, 2001; Mackay y col, 1998). No queda duda que estas células pueden diferenciarse hacia una línea celular de condrocitos si se expone a los estímulos adecuados. Lo que no queda determinado todavía es la existencia de este tipo de células en individuos ancianos, ya que su número y respuesta a factores celulares decrecen con la edad (De Bari y col, 2001; Huibregtse, 2000).

La utilización de condrocitos como fuente de células resulta muy atractiva, ya que han demostrado ser capaces de sintetizar sustancia extracelular con contenido de colágeno tipo II y agreganos. Esta población de células es relativamente homogénea, pero existe una diferenciación zonal que se cree

que influye en las distintas características regionales de la matriz extracelular. Si se desea utilizar condrocitos con el propósito de reparar las lesiones del cartílago, deben ser multiplicados en cultivos para disponer de un número adecuado de células que permitan la regeneración. Las células pluripotenciales de la médula ósea son más fáciles de conseguir y de recolectar.

En el futuro, la combinación de nuevos materiales de soporte para matrices con nuevas arquitecturas y factores de crecimiento específicos se constituirán en la línea de frente en la reparación de defectos condrales.

Implantes de aloinjerto osteocondral

En caso de lesiones condrales con un área igual o mayor a 4 cm², la implantación de aloinjertos osteocondrales es una alternativa a la mosaicoplastia o al implante de condrocitos autólogos cultivados (Minas,1998).

La reparación de defectos del cartílago articular empleando segmentos osteocondrales frescos de donante, fue introducida por primera vez por Lexer en el año 1908 (Lexer, 1908). Mc Dermott y col. (1985), en sus estudios sobre el uso de aloinjertos para grandes defectos articulares traumáticos, publicaron una serie de 100 pacientes con buenos o excelentes resultados en el 75 % de los casos a los 5 años y 64 % a los 10 años. Convery y col. (1991), usando aloinjertos para reparar pequeños defectos, encontraron 76 % de mejoría general en sus pacientes y demostraron que en las lesiones bipolares, el 86 % de los defectos en cóndilos femorales mediales tenían buenos o excelentes resultados y sus homólogos laterales solo alcanzaban un 56 %.

Aubin y col. (2001), en una serie de 72 pacientes evidenciaron la supervivencia del injerto osteocondral en 85 % de los casos a 10 años y 74 % a 15 años, concluyendo que el uso de aloinjertos osteocodrales es un procedimiento valioso en la reparación de grandes lesiones del cartílago de la superficie femoral distal.

Gross y col. (2000), en los últimos veinte años han desarrollado y perfeccionado este procedimiento con el apoyo del Sistema de Salud de Canada, obteniendo grandes series de pacientes con un 95 % de éxito a los 5 años, 71 % de éxito a los 10 años y 66 % de éxito a los 20 años.

Al comparar la técnica de implante de aloinjertos osteocondrales con las técnicas de ingeniería de tejidos se observa que, además de que se obtienen buenos resultados clínicos, es un procedimiento competitivo desde el punto de vista económico en aquellos centros con programas de donación de tejidos.

Los implantes de aloinjertos osteocondrales podrían estar al alcance de un mayor número de pacientes con lesiones en sus superficies articulares, pero el temor a reacciones inmunológicas, transmisión de enfermedades infecciosas y el alto costo de coordinación administrativa del transplante, han limitado la extensión de este procedimiento en la práctica clínica.

Schachar (1986) describió que la conservación de los injertos osteocondrales a bajas temperaturas podía ser una solución a estos problemas, pues permite aplicar un sistema de esterilidad en el injerto, posibilita determinar la mejor pieza anatómica para el paciente en función de sus dimensiones, induce una probable disminución en la inmunogenicidad y facilita el transporte del injerto, fomentando así el intercambio de tejidos entre instituciones.

Cuando Schachar (1986) se refiere al almacenaje a bajas temperaturas, desde el punto de vista criobiológico, hace alusión al almacenaje en ambientes cuyas temperaturas se encuentran por debajo del punto de congelación en los seres vivos (generalmente se hallan por debajo de los cero grados centígrados). En referencia a la preservación a bajas temperaturas del cartílago articular, se han investigado extensamente dos metodologías: la congelación y la criopreservación.

La congelación fue el primer método que se intentó para la preservación a bajas temperaturas de injertos osteocondrales. Heyner (1960) publicó varios experimentos de congelación del cartílago usando embriones de pollo, rata y ratón. Encontró que el cartílago hialino expuesto directamente a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, por períodos variables, no era metabólicamente viable; pero no había diferencias clínicamente significativas con el cartílago fresco si previamente a la congelación el tejido se sumergía en soluciones de glicerol. El glicerol actuaba previniendo la formación de cristales de hielo dentro de la célula, evitando así los efectos letales de estos.

Smith A. (1965) aplicó sus conocimientos de criopreservación de gametos bovinos a la conservación a bajas temperaturas del cartílago hialino, publicando amplios experimentos donde mantenía activo el metabolismo de condrocitos humanos aislados que habían sido almacenados en Dimetil Sulfóxido (DMSO) a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una semana.

Desde entonces se han ensayado múltiples técnicas de criopreservación para el cartílago articular, demostrando que la viabilidad del condrocito es superior cuando se criopreserva aislado que en el tejido intacto, cuando se emplea DMSO en lugar de glicerol y que cuando se intenta criopreservar en DMSO el cartílago hialino intacto en forma de injerto osteocondral la supervivencia de

los condrocitos está limitada a la capa superficial del tejido (Schachar y col, 1999a).

A pesar de que las técnicas de preservación de aloinjertos osteocondrales no permiten mantener en un 100 % la viabilidad de los condrocitos, clínicamente se han obtenido resultados relevantes (Schachar y col, 1999a), posiblemente por las características biomecánicas del tejido como un todo.

Garret (1993) publicó tasas de éxito de 75 % en 5 años, 64 % a 10 años y 63 % a los 13 años empleando aloinjerto osteocondrales frescos y obtuvo resultados similares con aloinjertos osteocondrales congelados.

Schachar y colaboradores (1999a) evaluaron las dos técnicas de conservación de injertos osteocondrales, demostrando experimentalmente que los aloinjertos osteocondrales criopreservados dan mejores resultados en integración a 3, 6 y 12 meses que sus homólogos congelados. Además, concluyeron que la integridad de la membrana del condrocito era el indicador más válido para estimar los resultados del injerto en el individuo.

Almacenaje a bajas temperaturas del cartílago articular

Debido a que el agua líquida es esencial para la estructura y función de las células vivas, no sorprende que su solidificación por congelación pueda ser letal para un tejido. Paradójicamente, las bajas temperaturas pueden preservar a las células por largos períodos, en un estado viable (Mazur, 1984).

Según Schachar y colaboradores (1986) hay varios factores que influyen en un adecuado proceso de almacenaje a bajas temperaturas del cartílago, particularmente durante la congelación, el almacenaje y el descongelamiento.

Almacenaje a bajas temperaturas y criopreservación

Las células de los mamíferos contienen moléculas de bajo peso molecular disueltas a una concentración aproximada a 0,15 M NaCl, con un punto de congelación próximo a 267,15 °K (– 6 °C). Sin embargo, la matriz extracelular no se congela hasta los 263,15 °K (– 10 °C).

La congelación debe seguir una serie de principios generales para la preservación criogénica de los tejidos biológicos. La tasa de cambio de la temperatura ambiente a 1 ó 2 grados (°K ó °C) por debajo del punto de congelación, puede tener efectos importantes en la viabilidad si las células son sensibles al shock térmico. Entre 269,65 °K y 278,15 °K (– 3,5 °C y 5 °C) la muestra se puede congelar introduciéndola en hielo, al ponerla en contacto con la superficie de una sonda fría, por vibración mecánica o por descenso rápido de la temperatura del medio. Dado que la congelación es un proceso exotérmico, el calor que va perdiendo la muestra debe ser extraído de la solución congeladora. El hielo se forma inicialmente en el medio extracelular, por lo que en la fase de congelación se producen cantidades crecientes de agua libre. Las membranas celulares, hidrófobas, actúan como una barrera para la nucleación del hielo intracelular y por ello las células no congeladas son expuestas a una solución crecientemente hipertónica (resultado del secuestro de agua por el hielo y del aumento de la concentración de sales extracelulares). Las células no congeladas se encogen debido al transporte de agua fuera ellas en respuesta al balance osmótico entre los fluidos extra e intracelulares. Este punto exotérmico se conoce también como punto crítico de la congelación. Por lo tanto, las muestras deben ser enfriadas a una tasa que debe ser determinada para cada tipo de célula. Para la mayoría de las células nucleadas de los mamíferos mantenidas en dimetil sulfóxido o glicerol, la tasa óptima de congelación se encuentra entre 0,3 y 10 grados (°K ó °C) por minuto.

Para minimizar los daños producidos por la congelación, los tejidos son equilibrados con agentes crioprotectores. Los agentes crioprotectores permeantes (que entran a la célula) como el glicerol o el dimetil sulfóxido (DMSO) son efectivos en la disminución de las lesiones en los sistemas de congelación biológicos lentos. Aunque han sido descrito varios agentes crioprotectores, los mejores protocolos de congelación utilizan tanto DMSO como glicerol a concentraciones de 0,5 a 3 molar. El DMSO es altamente permeable a las membranas celulares y normalmente puede ser mezclado directamente con las muestras a concentraciones adecuadas. La mayoría de investigadores añaden los agentes crioprotectores tanto a temperatura ambiente como a 277,15 °K (4 °C). El tiempo requerido para el equilibrio osmótico a esa temperatura es sustancialmente más largo que a 310,15 °K (37 °C), pero esto puede dar como resultado un menor estrés para la célula y por ende una mayor viabilidad.

La permeabilidad del glicerol a través de la membrana celular es más lenta que la del DMSO. Por ello es preciso un tiempo más largo para conseguir el equilibrio osmótico antes de la congelación. Para minimizar los problemas osmóticos causados por la lenta tasa de equilibrio, se emplea la técnica de adición de glicerol en múltiples pasos.

Los agentes crioprotectores como la polivinilpirrolidona o el hidroxietilalmidón, son más efectivos en la protección de sistemas biológicos congelados a tasas rápidas. Tales agentes son grandes macromoléculas que afectan las propiedades de la solución en mayor medida que la que cabría esperar por su presión osmótica y aparentemente actúan directamente sobre la membrana celular. La protección es debida a las fuerzas oncóticas (presión osmótica coloidal) ejercidas por grandes moléculas, así como por alteraciones de la actividad del agua no congelada producida por el encadenamiento a esta de las macromoléculas de los agentes. Bajo determinadas condiciones, se

produce un efecto sinérgico entre los agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. Los agentes crioprotectores, especialmente el DMSO, son potencialmente citotóxicos, por lo que es importante reducir su contacto directo con las células. No obstante, en el caso de tejidos densos como el cartílago, es necesario dejar al agente crioprotector disuelto en el medio nutritivo durante la congelación.

Aunque se han descrito muchos protocolos de congelación, el uso más frecuente es la tasa continua de descenso de temperatura entre el medio de base y los 193,15 °K (-80 °C). Una vez que la muestra ha alcanzado esta temperatura, puede ser introducida directamente al nitrógeno líquido a 77,15 °K (-196 °C) o en la fase de vapor de nitrógeno líquido para almacenamiento. La tasa óptima de congelación para una célula concreta puede ser determinada por la permeabilidad de la membrana celular al agua. En general, la tasa óptima de enfriamiento depende de la capacidad de la célula para mantener el equilibrio osmótico con la solución extracelular parcialmente congelada. Dado que la permeabilidad de los agentes crioprotectores es más lenta que la del agua, la deshidratación de la célula depende predominantemente de la permeabilidad que tenga su membrana al agua y del coeficiente de temperatura de esta permeabilidad. Esta tasa es directamente proporcional al tamaño de la célula, ya que el área de superficie de un cuerpo esférico se incrementa en relación al cubo de su diámetro.

Los tejidos presentan más dificultades que las células aisladas a la hora de establecer una correcta técnica de congelación. Algunas de estas dificultades son la masa, la geometría y la densidad tisular, así como la presencia de diferentes tipos de células y la arquitectura general del tejido. Los tejidos finos, como la piel o las válvulas cardíacas, son por esos motivos, más fáciles de congelar que el cartílago articular o un órgano entero, pues en ellos se evita un gradiente de temperatura entre la superficie y el interior de su masa.

Del mismo modo, aquellos tejidos de arquitectura poco homogénea presentan riesgo importante de fractura durante la congelación.

Por otra parte, la duración del almacenamiento de una muestra por criopreservación es inversamente proporcional a la temperatura en la cual se conserve. A partir de determinadas temperaturas los cambios que se producen son mínimos. Sin embargo, no queda claro porque algunos tejidos donde existe una masa celular homogénea presentan menor criosupervivencia.

En temperaturas de conservación de hasta 193,15 °K (-80° C) ocurren una serie de procesos cinéticos. Las células que han sido congeladas rápidamente, pueden sufrir una recristalización migratoria del hielo a temperaturas muy bajas. Los cristales de hielo, pequeños e irregulares, tienden a crecer a expensas del agua no congelada o de cristales de hielo menores a fin de minimizar su energía de superficie. Este crecimiento puede lesionar mecánicamente la ultraestructura de la célula. Incluso las células congeladas lentamente pueden verse afectadas a temperaturas de 158,15 °K (-115 °C). A temperaturas mayores, las células sufren un lento proceso de envejecimiento como resultado de la actividad enzimática y de reacciones físicas. Es importante evitar calentamientos transitorios tales como los que se producen al abrir los depósitos para extraer o depositar otras muestras. Estos períodos de calentamiento intermitente conducen a un descenso de la viabilidad y a una pérdida del porcentaje de células supervivientes. Aunque el reenfriamiento detiene los procesos iniciados, no puede hacer remitir los cambios ya producidos. La minimización de los cambios ocurridos durante el almacenamiento, exige el uso de congeladores controlados por ordenador.

La tasa óptima de descongelación, depende de las condiciones de congelación utilizadas. En general, para células congeladas en suspensión y para tejidos como válvulas cardíacas, es deseable una tasa rápida de calentamiento. Para

muchos tejidos, esto puede conseguirse agitando simplemente las muestras en un baño María a 310,15 °K (37 °C). Este calentamiento rápido limita el crecimiento de cristales de hielo y es una condición indispensable para una alta supervivencia. Otros tejidos pueden ser sensibles a un calentamiento rápido, posiblemente debido a un estrés osmótico transitorio. Este estrés ocurre cuando el hielo se convierte en agua libre, exponiendo a la célula a una solución extracelular hipotónica. Además, las células que fueron forzadas a deshidratarse durante la congelación deben rehidratarse para conseguir su equilibrio osmótico. Dado que todo el mecanismo metabólico de las células ha disminuido importantemente durante la congelación, éstas son especialmente susceptibles a la tasa de calentamiento. Para la mayoría de los tipos celulares es importante la presencia de solución salina fisiológica o de polímeros de alto peso molecular en el medio de descongelación para amortiguar el impacto de la dilución.

Después de la descongelación, los agentes crioprotectores deben ser eliminados debido a su citotoxicidad. La eliminación se hace por pasos sucesivos de dilución. Una vez que el crioprotector sale del medio intracelular, la célula queda hipertónica presentando avidez por el agua, por lo que en cada paso de dilución ocurren importantes variaciones del volumen celular.

Las células incluidas en una matriz, como es el caso de los condrocitos, parecen sufrir menos estos cambios de volumen por los límites que les impone la matriz extracelular. Cuanto más lentamente se diluye el crioprotector, más lenta es la rehidratación celular. En el mismo sentido, una temperatura de 310,15 °K (37 °C) facilita el transporte rápido de solutos hacia el medio intracelular y permite alcanzar más rápidamente el equilibrio osmótico.

Características de los factores de la criopreservación

El agente refrigerante o criógeno

El agente refrigerante comúnmente utilizado es el Nitrógeno líquido, el cual permite alcanzar los 77,15 °K (-196 °C) de temperatura, en donde no existe energía térmica suficiente para reacciones metabólicas intracelulares (McGee y Martín, 1962), (Fig. 8).

Un agente criógeno ideal tiene que tener una alta conductividad térmica, elevada capacidad calórica, un bajo punto de fusión a presión atmosférica, un alto coeficiente de calor específico y un alto rango de temperaturas entre el punto de congelamiento y de ebullición. (Hayat, 1989)

Otros agentes refrigerantes que pueden ser utilizados son el Freón 22 o el Propano líquido. Si se desean alcanzar temperaturas muy bajas, es posible realizar un super-enfriamiento. Por ejemplo, el propano líquido se puede enfriar con nitrógeno líquido y así alcanzar temperaturas muy bajas. También es posible crear una mezcla refrigerante de dos agentes criógenos como propano e isopentano, que suele ser superior al propano solo.



Figura 8 : Tanques de Nitrógeno líquido controlados por ordenador en el laboratorio de criopreservación de la Corporació Sanitària Clínic.

Los agentes crioprotectores

Por definición, un agente crioprotector es una sustancia química que se utiliza con la finalidad de disminuir la el daño producido por la congelación en células y tejidos (Mazur, 1984).

Los agentes crioprotectores pueden cumplir con su función de varias formas. Algunas sustancias previenen la formación de hielo (vitrificación) entrando al medio intracelular (agentes permeantes). Este es el caso de los dos agentes crioprotectores más utilizados y por lo tanto más conocidos: el dimetil sulfóxido y el Glicerol. Existen otros tipos de agentes crioprotectores que no entran a la célula y que permanecen en el medio extracelular formando enlaces electromagnéticos con proteínas, impidiendo que se produzca una desnaturalización de ellas por las bajas temperaturas.

Uno de los objetivos que se persigue con el uso de agentes crioprotectores es evitar la formación de cristales de hielo, permitiendo la solidificación del medio extra e intracelular por vitrificación, en donde el hielo es amorfo y no tiene los efectos mecánicos letales que en su forma organizada (cristales) (Muldrew y col, 2001).

La L-Glutamina y la Albúmina humana

A pesar de que se conoce de los beneficios de la presencia de ambas moléculas en las soluciones criopreservantes, no se sabe con exactitud el papel que juegan la L-Glutamina y la Albúmina Humana en el proceso. Aparentemente, estas moléculas actúan por medio de sus propiedades de exclusión preferencial de las proteínas por cargas eléctricas, lo cual permite estabilizar proteínas y macromoléculas. Durante el congelamiento aumenta su concentración a medida de que se va formando hielo, produciendo estabilización sinérgica.

Adicionalmente, se cree que la albúmina humana interacciona con la superficie del hielo impidiendo su unión con las proteínas.

Los agentes antimicrobianos

Se han empleado antimicrobianos para evitar la proliferación bacteriana en los medios de cultivo destinados a la criopreservación de células y tejidos. Aunque no se ha investigado con exactitud, se sospecha que adicionalmente tienen un efecto osmótico dentro de las soluciones.

La viabilidad post-criopreservación

El término viabilidad puede ser definido como la habilidad de una célula o tejido de mantenerse a si misma e interactuar de manera normal con su ambiente. Para cada tejido hay una viabilidad celular umbral por debajo de la cual queda comprometida el funcionalismo y la vitalidad del tejido (Brockbank y col, 1987).

El proceso de criopreservación comprende varias fases, cada una con sus riesgos para la viabilidad celular. El primer riesgo que enfrenta el tejido es la isquemia durante el período comprendido entre el cese del latido cardíaco del donante hasta su extracción. Igualmente, el método de recolección debe ser controlado, ya que el traumatismo durante la manipulación puede resultar en pérdida de viabilidad. Una vez extraídos, los tejidos se deben ser transportados a un laboratorio de criopreservación en el menor tiempo posible. Las variables que deben ser consideradas para el almacenamiento son la temperatura, el tiempo y la composición de las soluciones. Durante el proceso de criopreservación y descongelación, la tasa de enfriamiento, la tasa de calentamiento, el daño por cristales de hielo y los efectos osmóticos pueden afectar potencialmente la viabilidad.

Brockbank y col (1987) evaluaron los procedimientos frecuentemente utilizados para estimar la viabilidad de tejidos que hubieran sido sometidos a criopreservación. Ellos contemplan cuatro grandes grupos:

- 1.- Procedimientos morfológicos: incluyen estudios histológicos rutinarios, localización de antígenos de superficie, microscopia electrónica de transmisión y de barrido. Estos dos últimos se utilizan para una rápida valoración de ensayos de viabilidad en desarrollo.

2.- Estudios de proliferación: por cultivo celular

3.- Ensayos metabólicos: por captación de sustancias marcadas radiactivamente

4.- Ensayos mecánicos

Los procedimientos morfológicos se emplean para evaluar la estructura y determinar si las células o los tejidos muestran signos de anomalías patológicas.

Los ensayos tincionales tradicionales de exclusión que miden la integridad de membrana celular pueden correlacionarse poco con la viabilidad de células congeladas y descongeladas, ya que puede ocurrir una sobreestimación de la fracción de viabilidad celular en presencia de agentes crioprotectores extracelulares de alto peso molecular tales como la polivinilpirrolidona o el hidroxil-etil almidón (Brockbank y col, 1987).

El uso de técnicas de tinción inmunológicas también tienen problemas potenciales. La presencia de antígenos celulares específicos no implica necesariamente que la célula esté viva, porque los antígenos pueden ser todavía detectables en células muertas. Del mismo modo, la ausencia de un antígeno no implica la muerte de un tipo celular, ya que la célula puede perder antígenos y sintetizarlos nuevamente.

Los estudios con microscopía electrónica, a pesar de que no logran determinar directamente la viabilidad, si permiten intuir la inicialmente según la estructura externa o la ultraestructura de la célula o tejido. Por ejemplo, en caso de existir lesiones a nivel de la membrana celular de los condrocitos de las capas más externas del cartílago después de su preservación, se podría estimar que no

tendrán mejores resultados que aquellos tejidos donde la morfología del condrocito es similar a la que presenta en estado fresco (Schachar y col, 1999a).

A pesar de todas estas limitaciones, las técnicas morfológicas son excelentes para una primera valoración de procedimientos experimentales, en especial cuando los ensayos más específicos son más costosos y consumen más tiempo.

Los ensayos metabólicos y de proliferación pueden ser utilizados para medir los efectos de la obtención de tejidos y de las técnicas de preservación tanto a nivel tisular como celular. La mayoría de los ensayos bioquímicos y enzimáticos son realizados en poblaciones celulares. Asimismo, otro tipo de procedimiento como es el cultivo celular permite determinar el potencial reproductivo de la población. Para que estos ensayos sean cuantitativos, la capacidad funcional de las muestras congeladas y descongeladas deben relacionarse con la población celular inicial (estado fresco), y los resultados expresados en relación a la proporción de tejido original que podrían dar una actividad comparable. Un problema con este tipo de ensayo es la dificultad de diferenciar entre la mitad de la población celular que pierde el 100 % de capacidad funcional, o la pérdida en un 50 % de la capacidad funcional de toda la población celular.

En los ensayos celulares, células individuales son observadas o examinadas en relación a su habilidad de mantener funciones específicas tales como división celular quimiotaxis y fagocitosis.

Con el advenimiento de las técnicas de anticuerpos monoclonales, se pueden reconocer agentes bioquímicos y enzimas en células individuales. Estos ensayos pueden detectar solo el porcentaje de células morfológicamente

intactas que están presentes después del ciclo de congelación y descongelación. Por lo tanto, es de gran importancia determinar la población celular antes y después de un procedimiento experimental.

La elección de los ensayos de viabilidad varían según el tipo de célula y tejido y debe, en lo posible, reflejar el funcionalismo biológico normal de la célula.

Basado en su capacidad regenerativa, Brockman y colaboradores (1987) clasifican a las células del organismo en lábiles, estables y permanentes. Las células lábiles se reproducen constantemente, las células estables mantienen su capacidad pero usualmente no se multiplican y las células permanentes no pueden dividirse.

Bajo condiciones fisiológicas, las células lábiles (linfocitos, por ejemplo) proliferan a lo largo de la vida, reemplazando a las células que continuamente están siendo destruidas. Los ensayos de proliferación son los mejores para medir la viabilidad de este tipo de células y estudiar si su funcionalismo biológico es normal. Estos ensayos determinan la capacidad de la célula en entrar en su ciclo de división o con precursores de DNA marcados radiactivamente o con cultivos in vitro.

La viabilidad de las células estables también puede ser determinada por los ensayos de proliferación. Este tipo celular habitualmente muestran un bajo nivel de replicación, pero mantienen su capacidad de multiplicarse ante un agente lesionante. En aquellos tejidos como el cartílago, que se adaptan más a esta descripción, conviene combinar ensayos de proliferación con ensayos de funcionalismo como la captación de aminoácidos marcados, con la finalidad de demostrar la actividad biosintética.

En el caso de las células permanentes como las neuronas o las células de los islotes de Langerhans, los ensayos de división celular usualmente no son relevantes. En general, la viabilidad de estas células se determina en función de la capacidad que tienen de desarrollar adecuadamente sus tareas. Por ejemplo, la mejor indicación de la viabilidad de las células aisladas de los islotes de Langerhans es la liberación de insulina frente a un estímulo como la glucosa. La insulina secretada puede ser detectada por radio-inmuno-ensayo o ensayos de ligación enzimática.

En conclusión, los ensayos de viabilidad post-criopreservación dependen del tipo de células y de las funciones que ellas cumplen en el organismo.

Importancia de la superficie del aloinjerto osteocondral

Schachar y colaboradores (1999) demostraron que el cartílago criopreservado implantado en animales de experimentación, podía presentar cambios degenerativos, a pesar de mantenerse adecuadamente el funcionalismo de la articulación. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que la congelación o la crioprervación del cartílago por las técnicas actuales no perjudican significativamente las propiedades biomecánicas del tejido.

Se cree que los cambios degenerativos en los aloinjertos osteocondrales inician por la disrupción de la capa más externa del cartílago, la cual es abordable con técnicas de estudio morfológico como la microscopía electrónica de barrido. El estudio del cartílago articular a este nivel, también ha sido objeto de múltiples publicaciones por el hecho de su posible relación con la artrosis.

Por otra parte, la disrupción de la capa superficial de un aloinjerto osteocondral puede facilitar una respuesta inmunológica del receptor hacia los componentes del tejido cartilaginoso. Friedlaender y col. (1999) han estudiado este tipo de respuesta inmunológica y han llegado a la conclusión que, aparentemente, no afecta los resultados del implante en el paciente, aunque se requieren estudios más profundos sobre el tema.

Escalas para el estudio de la morfología de la superficie

Juverlin y colaboradores (1983) desarrollaron una escala para el estudio de la morfología de la superficie articular con microscopía electrónica de barrido. Para ello, emplearon patelas de conejo New Zealand pertenecientes a tres grupos: un grupo de conejos de rodillas escayoladas, otro de conejos sometidos a ejercicios diarios y otro de conejos control. A partir de sus registros fotográficos plantearon una escala de tres categorías (irregularidad, rugosidad y hendiduras de superficie), cada una con múltiples subcategorías, entre las que se encuentra la de "superficie no clasificable". Este grupo propone su escala para el estudio experimental de los cambios que puedan presentarse en la superficie articular. Sin embargo, ellos no validaron la escala pues no cuantificaron la variabilidad inter e intraobservador. Por otra parte, esta escala no fue diseñada para valorar cambios en la superficie como producto de distintos métodos de preservación de la muestra. Tampoco se incluye en la escala alguna diferencia o salvedad en relación a los artefactos que potencialmente se podían generar por la metodología de fijación de muestra que requiere el microscopio electrónico de barrido.

En 1986, Hong y Henderson se basaron en la escala propuesta por Juverlin y colaboradores y la modificaron con la finalidad de estudiar los cambios en la superficie del cartílago patelar después de la inmovilización en rodillas de

ratas. A pesar de que los autores hicieron críticas importantes a la escala, particularmente en lo referente a la posibilidad de que ocasionalmente se estuvieran clasificando artefactos en lugar de accidentes topográficos, los investigadores se basaron en la metodología original de Juverlin empleando microscopía electrónica de barrido, pero tampoco validaron su escala por variabilidad intra o interobservador.

La importancia de conocer si una nueva escala es válida, no es sinónimo de decir si la misma es útil. En muchas ocasiones es prácticamente imposible conocer todas las alteraciones probables que podemos encontrar en una situación experimental, pero si conocemos los límites de la escala o sistema de clasificación empleado, el investigador conoce hasta que punto pueden ser confiables sus observaciones.

O'Connor y colaboradores (1985) realizaron descripciones de cóndilos femorales de perros posterior a la sección del ligamento cruzado anterior, empleando técnicas de microscopía electrónica de barrido convencional y de baja temperatura. En estos trabajos se describen cambios probablemente de tipo degenerativo precoz, pero no se utiliza un sistema de clasificación validado, por lo que las descripciones podrían ser juzgadas dentro del campo de la subjetividad. En esta oportunidad, tampoco se menciona el probable efecto de las técnicas de fijación a bajas temperaturas o convencionales dentro de la obtención de imágenes por microscopía electrónica.

El microscopio electrónico de barrido (MEB)

Debido a principios de teoría atómica, para que un espécimen pueda ser estudiado con microscopía electrónica de barrido es necesario que la muestra previamente pase por un proceso de fijación por mecanismos físicos y

químicos, ya que las condiciones extremas en las que se le somete, podrían alterar significativamente su morfología (Weakley, 1981).

Aun en las condiciones de mayor cuidado, es posible que se introduzcan artefactos durante los procesos de fijación (Fig. 9), particularmente a nivel de la superficie de la muestra. Esto trae como consecuencia que se modifica la morfología del objeto en estudio (Weakley, 1981; Crang y Klomparens, 1988).

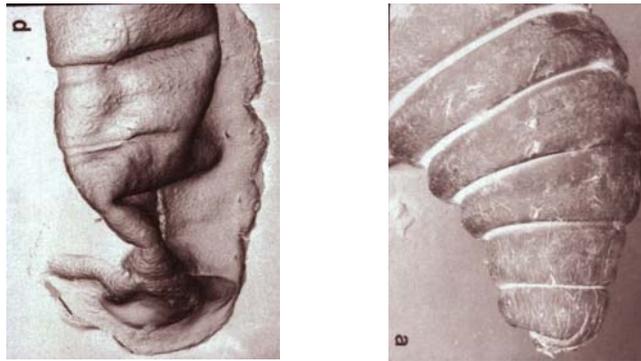


Figura 9: Una mala técnica de fijación o errores desafortunados pueden producir serias alteraciones en la morfología del espécimen que se desea estudiar, tal y como ocurrió con estos huevos de lombriz de tierra. En el caso del estudio de la superficie de injertos osteocondrales para implante en humanos vale la pena reducir cualquier posibilidad de error (Crang y Klomparens, 1988)

Las muestras biológicas que tienen alta proporción de humedad (por ejemplo el cartílago que puede tener hasta un 80 % de agua) deben ser sometidas a un proceso de deshidratación programada con alcoholes y en equipos electrónicos para tratar de no modificar su estructura (Weakley, 1981)

Una vez pasado por todos estos procesos, la exposición prolongada a un rayo de electrones que incide directamente sobre la muestra (especialmente si es de alto voltaje) y la ubicación de la muestra en una cámara a gran vacío, también son fuentes potenciales de artefactos.

El cartílago articular es un tejido muy delicado para ser examinado con el MEB. Es muy fácil alterar la muestra con lo cual en un estudio de superficie podría persistir la duda si algunas modificaciones han sido producidas por las condiciones experimentales o por la cámara de vacío del microscopio.

El microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA)

Este equipo representa la adaptación de mejoras tecnológicas al equipo de microscopia de barrido (MEB) (Padros y col, 1999). Mientras que el MEBC requiere de una cámara de alto vacío para prevenir las interferencias atmosféricas con los electrones primarios o secundarios generados en el equipo, el MEBA utiliza un detector de electrones secundarios capaz de trabajar en ambientes de bajo vacío (por ejemplo en atmósferas saturadas de vapor de agua de hasta 10 Torr). El generador del rayo de electrones presenta un dispositivo térmico que le permite trabajar en campos de emisiones de mayor temperatura al convencional, generando un haz de electrones, estable y finamente colimado. El generador del rayo produce imágenes más brillantes que sus homólogos de Tungsteno o de Hexaborida de Lantano (LaB_6), por lo que el voltaje de aceleración de los electrones puede ser disminuido significativamente, resultando en un efecto menos dañino sobre las muestras que el que produce el microscopio electrónico de barrido convencional. Los beneficios combinados del detector de electrones secundarios y el bajo voltaje de aceleración, permiten obtener imágenes de especímenes no conductivos como el cartílago, sin necesidad de que sea recubierto de oro o de una aleación de oro-paladio, disminuyendo así el riesgo de artefactos.

Objetivos e Hipótesis

El objetivo principal de esta investigación es:

“Elaborar un sistema de clasificación de los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales, que permita establecer comparaciones entre injertos conservados a bajas temperaturas por distintas técnicas”

Por consiguiente, la hipótesis de trabajo de este proyecto de investigación es:

“El diseño de un sistema de clasificación de los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, permite comparar los cambios en las superficies articulares de injertos conservados a bajas temperaturas por congelación o criopreservación.”

Para alcanzar el objetivo general y evaluar la hipótesis, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- 1º.- Fotografiar con un microscopio electrónico de barrido ambiental la superficie articular de injertos osteocondrales en estado fresco, conservados por congelación y por criopreservación, sin emplear métodos físico-químicos de fijación de la muestra.
- 2º.- Diseñar un sistema de clasificación de los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, empleando fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental y validando dicho sistema por variabilidad intra e interobservador.

3º.- Emplear un sistema de clasificación validado para comparar los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, con los de injertos que han sido almacenados por congelación y por criopreservación, a partir de fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental.

Materiales y Métodos

El modelo animal

Para realizar este estudio se escogió como modelo animal al conejo albino New Zealand, hembra, adulta (10 a 12 meses de edad), con peso promedio de 3 a 3,5 Kilogramos (Fig. 10). El número de animales fue determinado por cálculo estadístico como se precisará más adelante.



Figura 10: Conejos albinos New Zealand hembras de aproximadamente 10 a 12 meses de edad y de peso promedio 3 Kilogramos como los que serán empleados en este estudio.

Con la finalidad de manejar éticamente a los animales de experimentación de este estudio y siguiendo las Directivas 86/698/EEC, 89/609/EEC de la Unión Europea, el Real Decreto 223/1988 y las leyes autonómicas 3/1988 y 5/1995 de Cataluña, los animales fueron compartidos con otros proyectos de investigación de la Universidad de Barcelona (UB), del Hospital Clínic de Barcelona y de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

Los restos de animales y otros residuos producidos por este trabajo de investigación no se consideraron peligrosos para la salud pública o el medio ambiente y su eliminación quedó a cargo del servicio de recogida de animales del Ayuntamiento de la ciudad de Barcelona por mediación del estabulario de la Facultad de Medicina de la UB.

Diseño del experimento

El presente es un trabajo de investigación de tipo experimental, longitudinal y prospectivo, en cuyo diseño se tomaron en consideración los tres principios básicos que Hinkelmann y Kempthorne (1994), establecieron para mejorar la validez del análisis estadístico e incrementar la sensibilidad de cualquier experimento. Estos principios son: 1º.- Principio de la replicación, 2º.- Principio de la aleatorización y 3º.- Principio del control local o bloqueo. Dichos principios serán tratados con profundidad en la discusión del estudio.

El cálculo del tamaño de la muestra

Basándonos en los planteamientos de Bailey (1981), Weakley (1981), Williams (1977), con respecto a animales de estudio para microscopía electrónica, se crearon tres grupos de estudio compuestos por cinco animales cada uno. Un grupo para el estudio de injertos en estado fresco, otro para los injertos en congelación y otro para los injertos en criopreservación.

Protocolo de Eutanasia

Debido a que se contemplaba amputar las extremidades inferiores a cada conejo, alterando de este modo su capacidad de deambulación, se optó por practicar la eutanasia de los mismos antes de iniciar los procedimientos experimentales.

Previa a la eutanasia se le realizó un exámen físico articular a cada animal para asegurar la ausencia de patologías que pudieran interferir con los objetivos del estudio.

Los animales fueron eutanizados mediante administración intravenosa de Pentobarbital sódico, a dosis de 100 mg por Kilo de peso en bolus. Para reducir al máximo las molestias de la inyección en la vena auricular marginal se aplicó crema de lidocaína al 25 % tópicamente al área de la venoclisis.

Para reconocer y confirmar la muerte del animal se comprobó el cese de la respiración y del latido cardíaco por palpación y auscultación con fonendoscopio, así como la ausencia de reflejos.

Técnica de disección

Los medios de instrumentación utilizados incluyeron equipo de cirugía menor y materiales estériles desechables (Fig. 11).



Figura 11: Instrumental quirúrgico empleado en los procedimientos experimentales.

Se dispuso el cuerpo del animal en posición de decúbito supino sobre un campo estéril. Se le practicó un abordaje longitudinal parapatelar con disección progresiva de planos cutáneos, fascia y músculos, hasta llegar a la exposición de elementos óseos. Seguidamente se extrajeron ambas rodillas por osteotomía del Fémur proximal y de Tibia distal, y se realizó la apertura lateral de la cápsula articular de la rodilla.

Con la finalidad de evitar confusiones entre las rodillas criopreservadas o congeladas con sus homólogas en estado fresco, se procedió a marcar con una o más muescas en el segmento diafisario femoral.

Preservación de los injertos osteocondrales

Injerto osteocondral en estado fresco

Una vez aisladas las rodillas de los conejos que conformaron el primer grupo, fueron sumergidas en solución estéril de NaCl al 0,9 % a temperatura ambiente y mantenidas en ese estado durante su traslado al Centre de

Recerca en Enginyeria Biomédica (CREB) de la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), donde se encontraba el microscopio electrónico utilizado por nuestro equipo.

Injerto osteocondral congelado

La pieza anatómica fué introducida en una bolsa plástica, sellada previa extracción manual del aire, identificada e introducida en un arcón a 233,15 °K (– 40 °C) hasta haber cumplido el tiempo de conservación estipulado en este estudio que fue de 15 días, mismo período de almacenamiento que el grupo de piezas conservadas por criopreservación.

Descongelación del injerto preservado por congelación

Para la descongelación de los injertos osteocondrales se siguieron los siguientes pasos:

- 1º.- Inmersión de la bolsa con el injerto congelado en solución NaCl 0,9 % a 313,15 °K (40 °C) durante 3 ó 4 minutos.
- 2º.- Apertura de la bolsa y colocación del injerto en solución NaCl 0,9 % a 313,15 °K (40 °C) durante 3 ó 4 minutos.
- 3º.- Colocación del injerto en solución NaCl 0,9 % a temperatura ambiente para su conservación y transporte.

Injerto osteocondral criopreservado

El injerto osteocondral destinado a criopreservación se sumergió en solución RPMI sin L-Glutamina a 277,15 °K (4 °C), el menor tiempo posible hasta tener disponibilidad de procesamiento, no llegando a pasar más de 2 horas desde la eutanasia del animal.

Por cada grupo de injertos a criopreservar el personal de laboratorio se equipó de gorro y mascarilla, practicó lavado minucioso de manos, y empleó guantes estériles y campos quirúrgicos desechables en una cámara de flujo laminar desinfectada. Seguidamente se extrajeron las piezas anatómicas, se introdujeron en bolsas plásticas estériles de criopreservación (Baxter-Cryocite ® 750 mL) a 2 piezas por bolsa con solución crioprotectora y finalmente se sacaron con una jeringa las burbujas de aire que habían quedado en la bolsa.

Las bolsas se guardaron en una nevera a 277,15 °K (4 °C) durante 30 minutos (fase de pre-congelación) y de ahí pasaron a una cámara de congelación programable (Cryoson ®) (Fig. 12), consiguiendo un descenso de la temperatura de 1 grado (°K ó °C) por minuto hasta los 213,15 °K (– 60 °C), luego de 3 a 4 grados (°K ó °C) por minuto hasta los 173,15 °K (–100 °C). Este proceso duró aproximadamente unos 80 minutos y permitió regular el paso progresivo del agente crioprotector a las células más superficiales y al tejido intercelular, a la vez que disminuyó la probabilidad de generar grandes cristales de hielo en el tejido (Hayat, 1989).

Seguidamente las bolsas pasaron a las cubas de Nitrógeno líquido donde se mantuvieron a 77,15 °K (–196 °C) durante 15 días, mismo tiempo de preservación que el grupo de piezas conservadas en congelación.



Figura 12: Cámara de congelación programable Cryoson ® empleada en el estudio. Laboratorio de criopreservación (Corporació Sanitària Clínic)

El suministro de Nitrógeno líquido y el control de la temperatura se garantizaron por medio de una unidad informatizada de abastecimiento automático con registro de incidencias (Fig. 13).



Figura 13: Bolsa con injertos osteocondrales al momento de ser introducida en una cuba de Nitrógeno líquido. Un sistema informatizado de abastecimiento y registro controló las incidencias, garantizando así la calidad del proceso. (Corporació Sanitària Clínic).

Solución crioprotectora

La solución crioprotectora estaba compuesta por:

90 % Solución RPMI sin L-Glutamina

10 % Solución de Albúmina Humana al 20 %

10 % Solución de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 %

La solución RPMI fue formulada originalmente para cultivos celulares en el Instituto Memorial Parque Roswell (Roswell Park Memorial Institute, RPMI). En nuestro protocolo se empleó la solución RPMI sin L-Glutamina, cuya composición se encuentra en la tabla 1.

La solución RPMI sin L-Glutamina se utilizó también como medio de transporte a una concentración de 100 % desde el momento de la extracción de las piezas anatómicas hasta el procesamiento de estas con la solución crioprotectora.

Descongelación del injerto preservado por criopreservación

Para la descongelación de los injertos criopreservados se siguieron los pasos:

- 1º.- Inmersión de la bolsa con el injerto congelado en solución NaCl 0,9 % a 313,15 °K (40 °C) durante 3 ó 4 minutos en baño María (Fig. 14).
- 2º.- Apertura de la bolsa y colocación del injerto en solución NaCl 0,9 % a 313,15 °K (40 °C) durante 3 ó 4 minutos.
- 3º.- Colocación del injerto en solución RPMI a 277,15 °K (4 °C) de temperatura ambiente hasta su conservación y transporte.

Componente	Concentración (mg/litro)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1000.0
KCl	4000.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1000.0
NaCl	60000.0
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	15120.0
Glucosa	20000.0
Rojo Fenol	50.0
L-Arginina	2000.0
L-Asparagina	500.0
L-Acido Aspártico	200.0
L-Cisteina	500.0
L-Acido Glutámico	200.0
Glutation (Reducido)	10.0
Glicina	100.0
L-Histidina	150.0
L-Hidroxiprolina	200.0
L-Isoleucina	500.0
L-Leucina	500.0
L-Lisina HCl	400.0
L-Metionina	150.0
L_Fenilalanina	150.0
L-Prolina	200.0
L-Serina	300.0
L-Treonina	200.0
L-Triptófano	50.0
L-Tirosina	200.0
L-Valina	200.0
Biotina	2.0
Vitamina B12	0.05
Pantotenato cálcico	2.5
CaCl ₂	--
NaHCO ₃	--
NaH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O	--

Tabla 1: Composición de la solución RPMI sin L-Glutamina (Roswell Park Memorial Institute)
Biological industries – Beth Haemek, Israel



Figura 14: Inicio de la descongelación de los injertos osteocondrales criopreservados en Baño María a 313,15 °K (40 °C). Laboratorio de criopreservación (Corporació Sanitària Clínic)

Microscopía electrónica ambiental de barrido de la superficie del cartílago

Se tomó una muestra del cartílago hialino de áreas de carga del cóndilo femoral interno con una trefina de 5 m.m. de diámetro, aplicando movimientos rotatorios.

Cada disco de cartílago fue posicionado en un pedestal (stub) para su estudio con un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM™ ElectroScan 2020 ESEM – FEG) a 276,65 ° K (3,5 °C), una aceleración de voltaje de 10 KV y 20 KV, a una presión de cámara de 10 Torr (Fig. 15).



Figura 15: Disco osteocondral posicionado en el pedestal del Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental antes de ser introducida a la cámara de muestra.

Estudio fotográfico

Bailey (1981), Weakley (1981), Williams (1977) mencionan que el muestreo de las fotografías en microscopía electrónica se considera válido desde el punto de vista estadístico si son hechas a varios aumentos (preferiblemente al menor aumento posible), cubriendo campos seleccionados aleatoriamente o siguiendo un criterio que pueda ser reproducible fácilmente en todas las muestras. Por ejemplo, tomar una foto cada 3 campos o por cada esquina del campo, etc.

Antes de iniciar el estudio fotográfico en este trabajo, se llevó a cabo un ensayo piloto que sirvió para adaptarnos al tipo de muestra y a su manipulación con el microscopio electrónico.

Con la finalidad de construir una progresión lógica y comprensible de información, las fotografías de la superficie del cartílago fueron hechas en distintas áreas de la muestra siguiendo un trayecto sinusoidal.

Se utilizó la fórmula de Jakstys (1988) para el cálculo del número mínimo de fotografías para resultados estadísticamente válidos:

$$(5 \text{ animales por grupo}) \times (1 \text{ bloque de tejido por animal}) \times (20 \text{ fotografías por bloque}) = 100 \text{ fotografías por grupo}$$

De esta fórmula se deduce que aún una muestra limitada a 1 bloque de tejido puede convertirse en fuente de un gran número de microfotografías, cuyo total aumenta en relación al número de grupos que participen en el estudio y a la magnitud de aumentos utilizados.

Con la finalidad de construir una progresión de imágenes, se tomaron cien fotografías a 250 aumentos de las superficies articulares de cada uno de los grupos de experimentación. Otros aumentos, en un rango comprendido entre los 250 x y 1500 x fueron empleados en fotografías adicionales para precisar detalles.

Clasificación de la superficie cartilaginosa

Se empleó un sistema de clasificación de morfología de superficie articular diseñado por nuestro grupo, para cuya elaboración nos basamos en las fotografías de la superficie osteocondral de muestras en estado fresco siguiendo la metodología de Jurverlin y col. (1983) con las modificaciones introducidas por Hong y Henderson (1996).

La creación de modificaciones de las escalas de Juverlin (1983) y Hong (1996) para este trabajo de investigación se justifica por:

1º.- Estudio de estructuras anatómicas distintas. Nuestro grupo estudió la superficie cartilaginosa de las zonas de carga de cóndilos femorales internos

de conejos New Zealand. En el estudio de Juverlin (1983) se estudió superficie cartilaginosa de rótulas de conejos New Zealand y en el estudio de Hong y Henderson (1996) se investigó superficie cartilaginosa de rótulas de ratas albinas adultas.

2º.- El microscopio electrónico empleado en nuestro estudio es distinto al utilizado en los trabajos de los autores anteriores, porque no requiere de métodos físico-químicos de fijación de muestras ni la exposición de la misma al vacío.

Las escalas diseñadas por Juverlin (1983), modificada por Hong y Henderson (1986) se crearon a partir de muestras de cartílago de rótula procesadas por microscopía electrónica de barrido, por lo que tuvieron que ser sometidas a procesos físico-químicos que no aplicamos en este trabajo.

Confiabilidad, validez y variabilidad del sistema de clasificación

Según Pynsent y colaboradores (1994) al desarrollar un sistema de clasificación o instrumento de categorización es necesario considerar tres propiedades básicas que abarcan los tres puntos de vista del investigador: la confiabilidad, la validez y la variabilidad.

Medición de la confiabilidad (variabilidad intra-observador)

Un instrumento o test es confiable cuando al administrarse en juicios repetidos (dos oportunidades) por un mismo observador en un mismo objeto de medición no ocurren cambios significativos en los resultados. (Pynsent y col, 1994).

Para medir la confiabilidad en cada una de las categorías se aplicó en dos oportunidades el sistema de clasificación por un mismo observador en las fotografías de los injertos en estado fresco. Estas mediciones estuvieron separadas por un periodo de 15 días para disminuir la incidencia de otros factores ajenos al sistema tales como la memoria del observador (sesgo del observador).

Para valorar esta propiedad se calculó el índice kappa (Cohen, 1960), con sus correspondientes intervalos de confianza a 95 %, desviación estándar y valoración (llamada también grado de acuerdo o fuerza de concordancia). Otros índices calculados fueron el índice de concordancia observado (Po) con sus intervalos de confianza a 95 %, y el índice de concordancia esperado (Pe). La fuerza de concordancia fue estimada según la escala de Landis y Koch (1977).

Medición de la validez

Un instrumento de medición o test es válido cuando su estructura abarca todas las propiedades posibles (Pynsent y col, 1994). Por su definición podemos concluir que es difícil encontrar siempre el test o sistema de clasificación perfectamente válido y que la validez es la propiedad más difícil de medir en un instrumento de clasificación.

Para darle a nuestro sistema de clasificación la mayor validez posible, cada una de las fotografías fué sometida a un cuidadoso exámen para tratar de abarcar todos los tópicos o variantes en cada categoría. En este sentido, se consultó con un experto en anatomía patológica del sistema músculoesquelético del Hospital Clínic de Barcelona y con un profesor del

Departamento de Cirugía de la Universidad de Barcelona con experiencia en docencia en anatomía y cirugía del aparato locomotor.

Medición de la variabilidad (variabilidad Inter-observador)

Existen distintas formas medir el grado de acuerdo entre dos observadores que clasifican una muestra o espécimen. El caso más simple se presenta cuando la variable cualitativa es dicotómica (dos posibilidades). Esta situación se puede representar en una tabla de frecuencias (Tabla 2).

		OBSERVADOR A		
		positivo	Negativo	totales
OBSERVADOR B	POSITIVO	a	C	F ₁
	NEGATIVO	b	D	F ₂
TOTALES		C ₁	C ₂	n

Tabla 2: Tabla de frecuencias donde queda representada la distribución de observaciones ante una variable cualitativa dicotómica.

La medida más simple de concordancia es la proporción de coincidencias (Pc) frente al total de sujetos:

$$Pc = (a + d) / n$$

Aunque no existiera ninguna relación entre las observaciones de los dos participantes, siempre existe la posibilidad de que se presente concordancia por puro azar.

Con el fin de determinar hasta que punto la concordancia observada es superior a la esperable por puro azar, Cohen (1960) describió un índice llamado "**índice de concordancia kappa (K)**" que está definido de la siguiente manera:

$$K = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$

Donde P_o es la proporción de concordancia observada (en tanto por 1) y P_e es la proporción de concordancia esperada por puro azar. En caso de acuerdo perfecto la proporción de concordancia será 1, por lo que $(1 - P_e)$ representa el margen de acuerdo posible no atribuible al azar. De este margen nosotros observamos probablemente sólo una parte $(P_o - P_e)$, a menos de que exista acuerdo perfecto ($P_o = 1$).

Es así como en caso de concordancia perfecta entre dos observadores el valor del índice de concordancia kappa es uno. Si la concordancia observada es igual a la esperada, entonces kappa vale cero y en el caso de que el acuerdo observado sea inferior al esperado el índice de kappa es menor que cero.

Para calcular P_e , la concordancia esperada, el razonamiento es el siguiente: de acuerdo a la tabla 2 la probabilidad de que el observador "A" clasifique una determinada superficie del cartílago en una categoría (evento que llamaremos "positivo") podemos estimarla como f_1/n ; mientras que la correspondiente probabilidad del observador "B" la estimaremos como c_1/n . Si consideramos que existe independencia entre ambos observadores, la probabilidad de que coincidan en clasificar un determinado espécimen en una categoría de la escala es igual al producto de ambas probabilidades (sucesos independientes). Aplicando el mismo razonamiento calculamos la probabilidad de que se produzca acuerdo entre los observadores al clasificar un espécimen en otra

categoría distinta a la que se estudia (evento que llamaremos "negativo"). Entonces, la probabilidad de acuerdo en cualquiera de las dos clasificaciones será la suma de ambos valores, esto es:

$$Pe = (f_1 \cdot c_1 + f_2 \cdot c_2) / n^2$$

Landis y Koch (1977) publicaron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo de dos observadores en función del índice Kappa (K) (Tabla 3).

Indice Kappa (K)	Grado de acuerdo o Fuerza de concordancia
0.00	Sin acuerdo
0.01-0.2	Insignificante
0.21-0.4	Poca
0.41-0.6	Moderada
0.61-0.8	Buena
0.81-1.0	Muy Buena

Tabla 3: Categorías para estimar el grado de acuerdo o fuerza de concordancia del índice kappa (K) según Landis y Koch (1977)

En el caso de nuestra escala de clasificación del cartílago, como no existe un índice global, se determinó el **índice de concordancia kappa específico entre las categorías que conforman la escala**, lo que equivale a convertir el resultado posible en dos únicas respuestas: se clasifica el aspecto morfológico en la categoría de interés (positivo) o se clasifica en alguna de las restantes (negativo).

De esta manera para cada una de las categorías se elaboró una tabla de 2 X 2 calculando el valor correspondiente índice kappa como si se tratara de una variable dicotómica. Posteriormente se valoró el índice de concordancia kappa de cada una de las categorías empleando la escala de Landis y Koch anteriormente descrita (Tabla 3).

Comparación entre los grupos de estudio

Para realizar la comparación entre los grupos de estudio (fresco, congelado y criopreservado) a partir de las variables cualitativas del sistema de clasificación de la superficie de cartílago se empleó el test de Chi-cuadrado de Pearson, con un nivel de significancia $p < 0.05$, ajustada para comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni. En todos los casos, por tratarse de tablas de 2 x 2 existió un (1) grado de libertad.

Para los cálculos estadísticos se empleó el software estadístico SPSS en su versión 10.0.6 del 27 de noviembre de 1999, bajo asesoría del Departamento de Bioestadística y Epidemiología del Hospital Clínic de Barcelona y del Departamento de Salud Pública y Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

Resultados

1º.- Fotografiar con un microscopio electrónico de barrido ambiental la superficie articular de injertos osteocondrales en estado fresco, conservados por congelación y por criopreservación, sin emplear métodos físico-químicos de fijación de la muestra.

Empleando el microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA) se logró reunir por cada grupo experimental, veinte fotografías de cada una de las muestras de cartílago (área de superficie de $19,635 \text{ mm}^2$) siguiendo un trayecto sinusoidal, evitando la superficie directamente ubicada sobre los bordes del disco para no coincidir con las regiones alteradas por el efecto mecánico del corte de la trefina. Cada una de las imágenes obtenidas a 250 aumentos cubría $0,1172 \text{ mm}^2$, por lo que se fotografió un área de $2,344 \text{ mm}^2$, equivalente a $11,94 \%$ de la superficie total del espécimen. Adicionalmente se tomaron fotografías a otros aumentos con la finalidad de obtener mayores detalles de algunas regiones de interés.

Las imágenes se almacenaron informáticamente en un disco compacto (CD) para su posterior lectura en ordenador personal e impresión en papel de calidad fotográfica, constituyendo de este modo un banco informatizado de imágenes de la superficie articular de injertos osteocondrales en estado fresco, congelado y criopreservado, que será de utilidad para esta y otras investigaciones en esta línea de investigación.

En las próximas páginas se encuentran algunas figuras que forman parte de nuestra serie de fotografías de la superficie articular de injertos osteocondrales de cóndilo femoral interno de conejo albino New Zealand hembra en estado fresco, congelado y criopreservado, según las técnicas ya descritas.

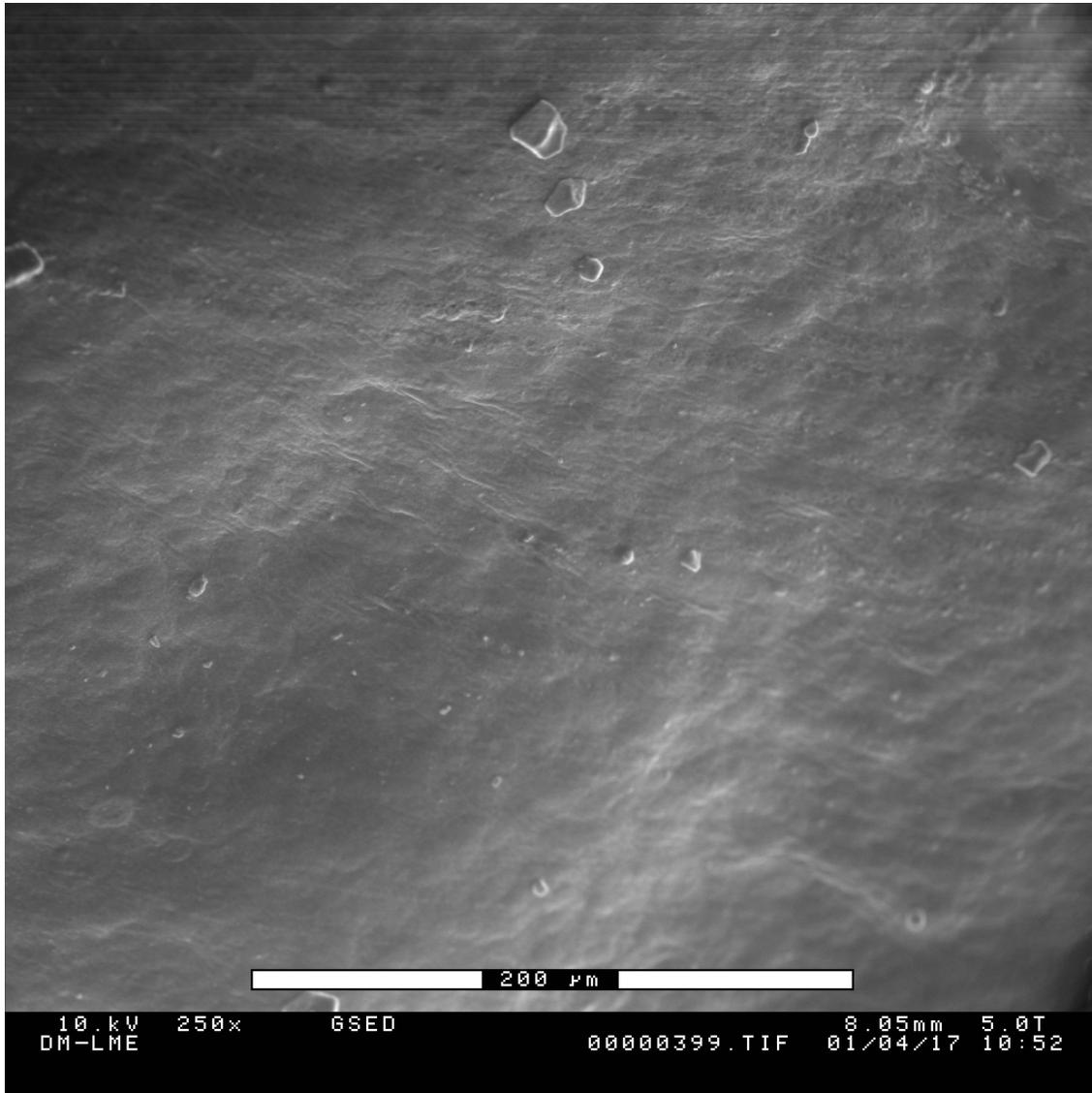


Figura 16: Superficie de cartílago en estado fresco. Se observa una extensión uniforme sin fracturas ni lagunas con algunos residuos que probablemente se traten de fragmentos óseos o cristales de líquido sinovial.

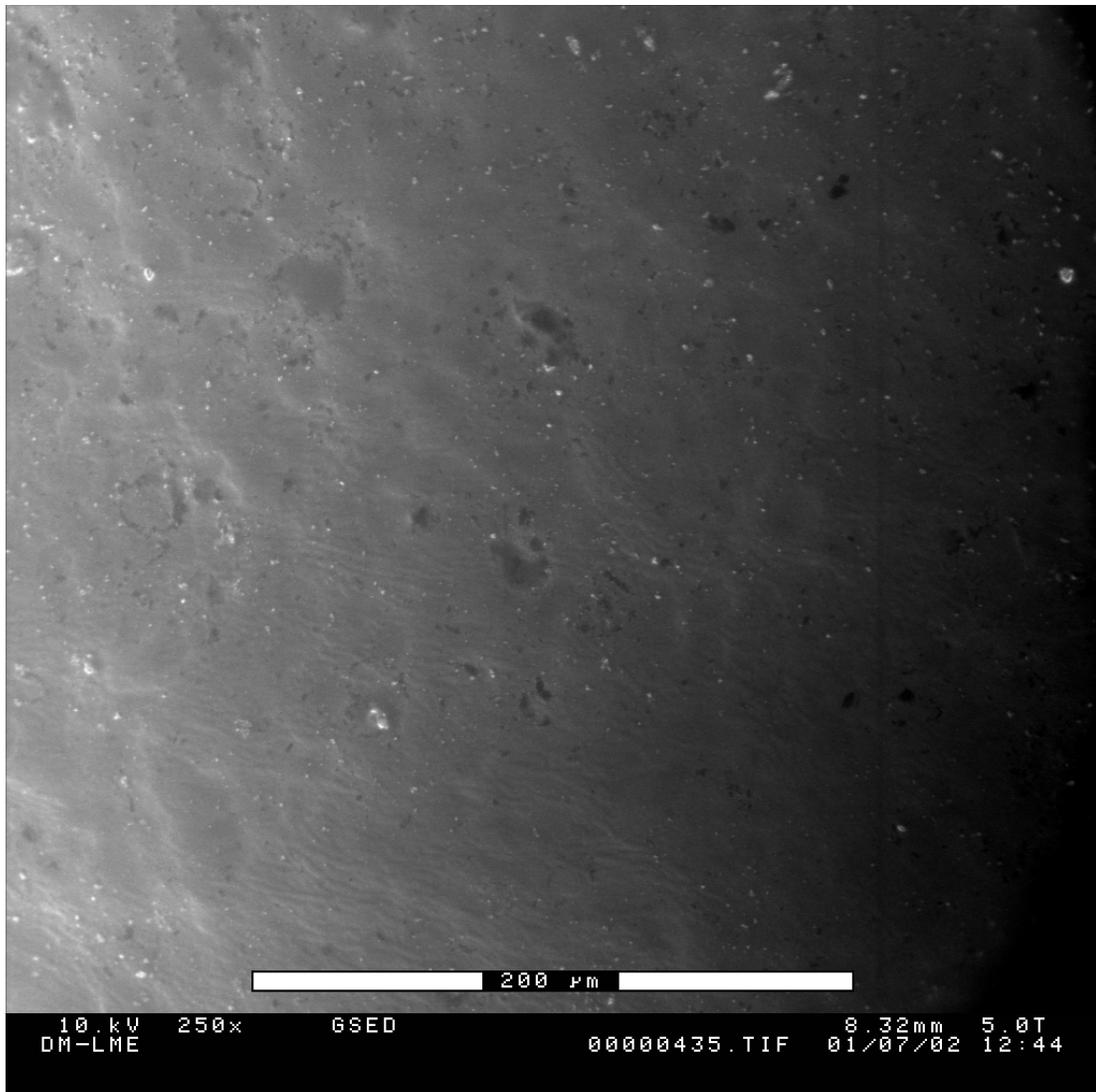


Figura 17. Superficie de cartílago en estado fresco. Se observa una extensión uniforme sin fracturas ni lagunas. Algunas imágenes pueden corresponder a residuos o ser discretas depresiones de la superficie.

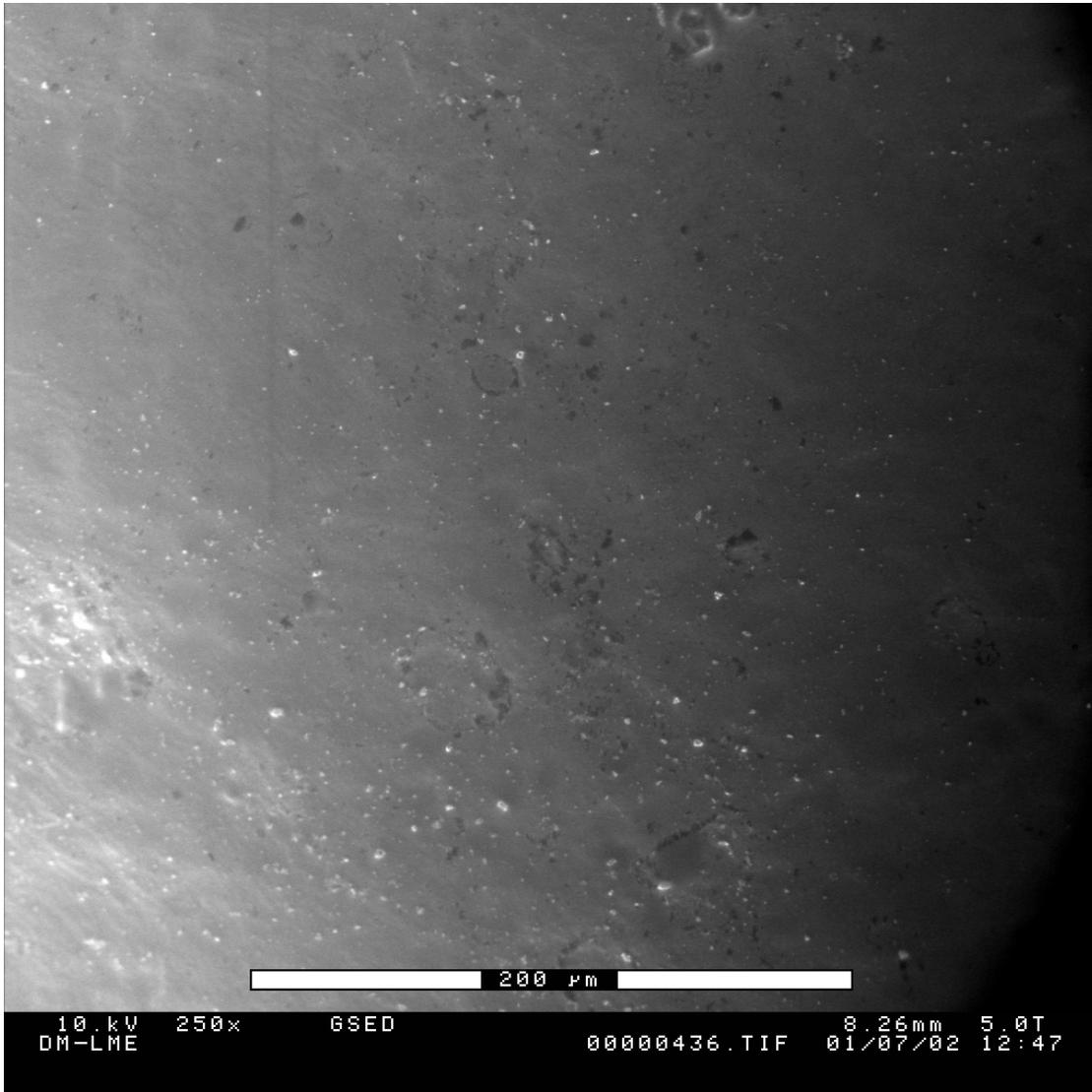


Figura 18: Superficie de cartílago en estado fresco. Se observa una extensión uniforme sin fracturas ni lagunas. Algunas irregularidades pueden corresponder con residuos o ser discretas depresiones de la superficie.

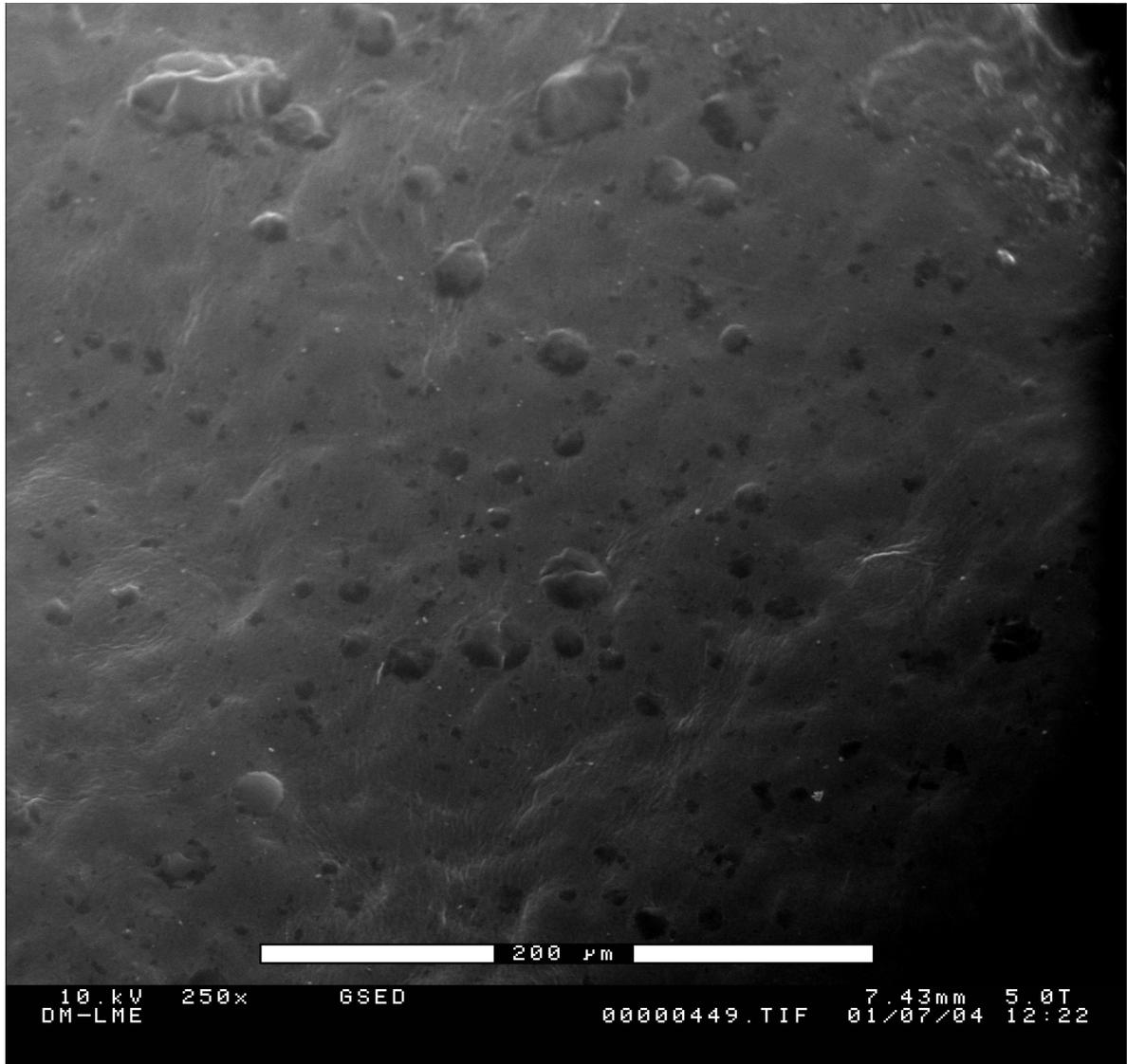


Figura 19: Superficie de cartílago en estado fresco. Se observa una extensión sin fracturas ni lagunas, con prominencias de distintos tamaños, superficie regular y bordes redondeados. Algunas de estas protuberancias parecen confluir.

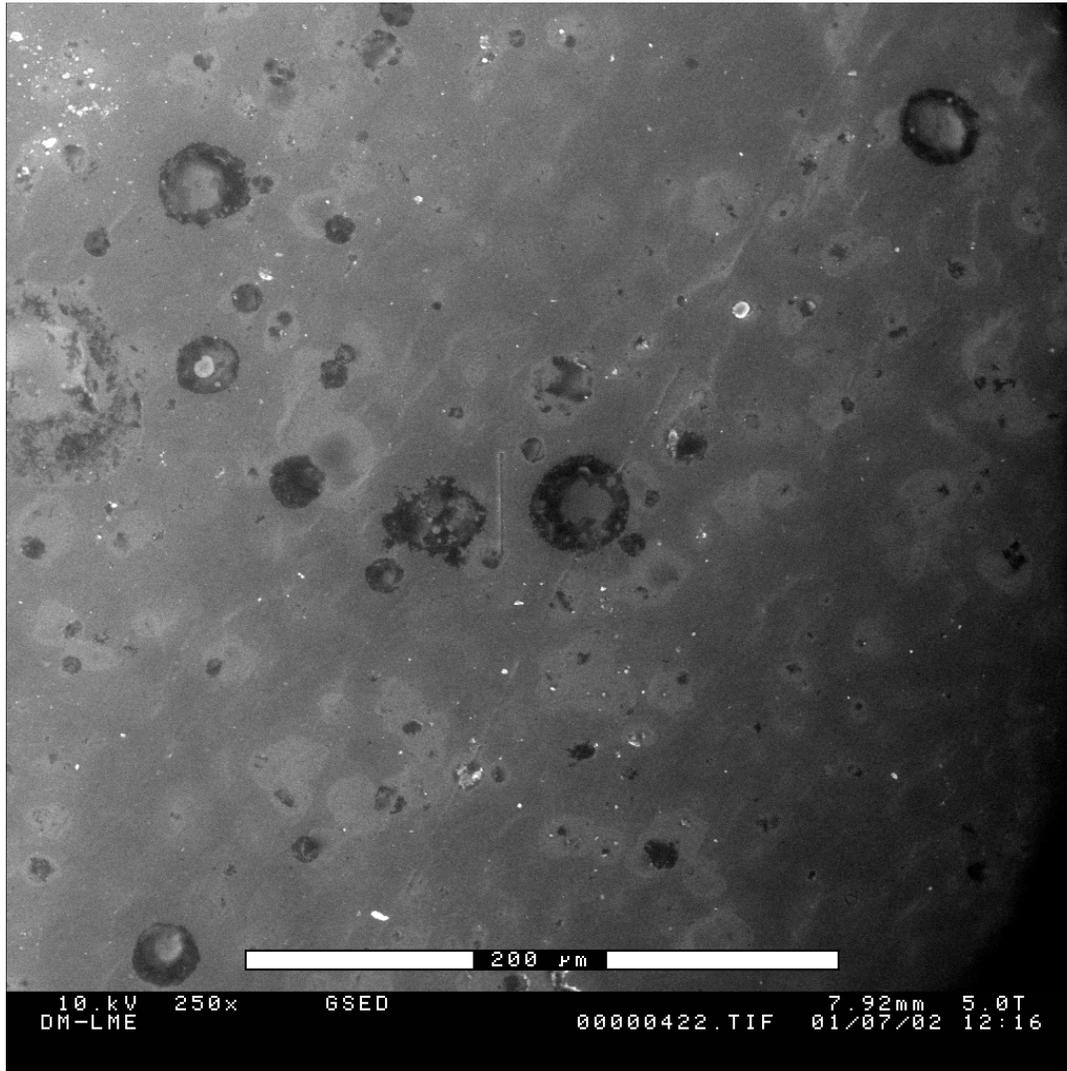


Figura 20: Superficie de cartílago en estado fresco. Se observa una extensión uniforme sin fracturas donde es posible apreciar lagunas redondeadas ocupadas por cuerpos de aspecto esférico que corresponderían a condrocitos de la capa más superficial del tejido.

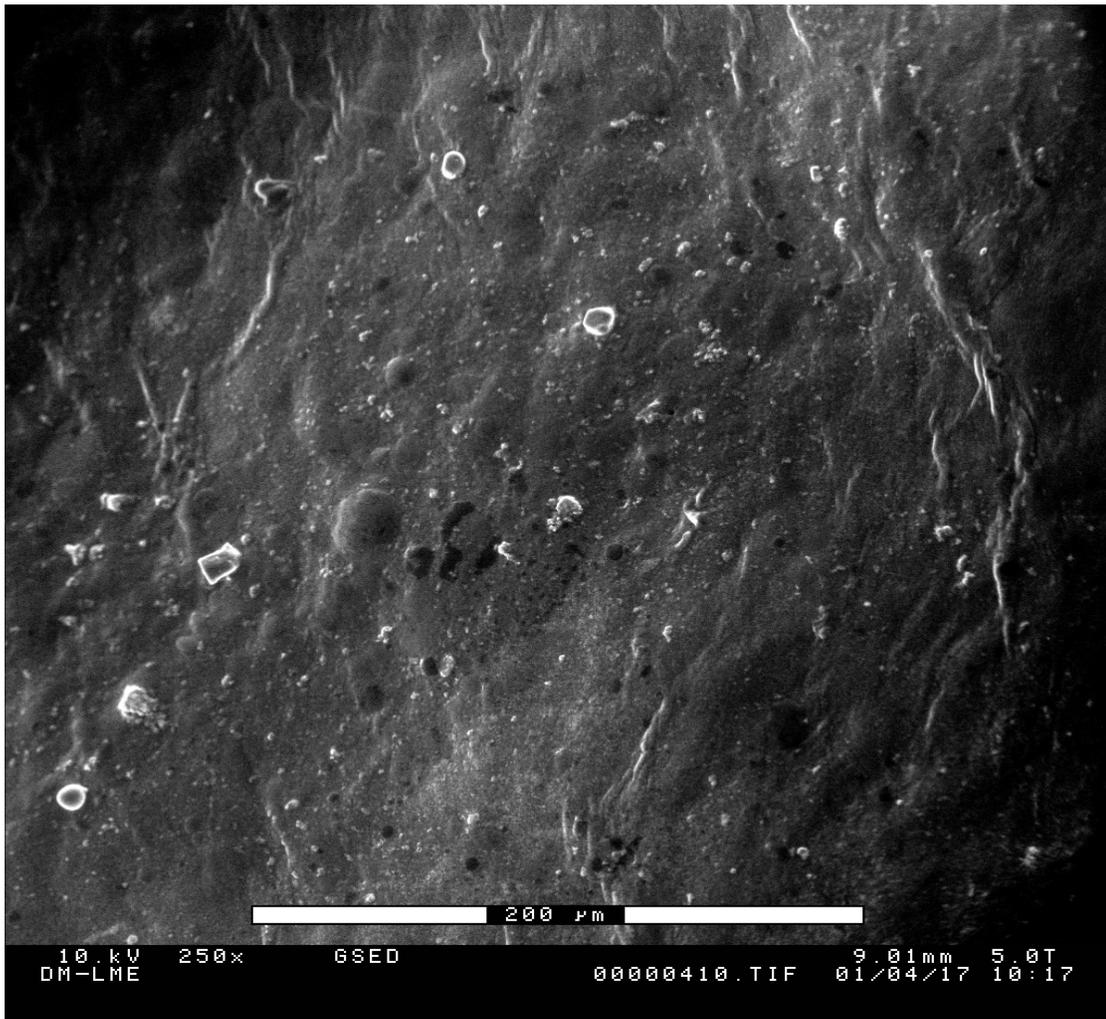


Figura 21: Superficie de cartílago congelado. Se observa una extensión irregular, con colinas, protuberancias y residuos. Estos últimos presentan, en algunos casos, bordes rectos y bien definidos, por lo que podría tratarse de cristales de líquido sinovial.

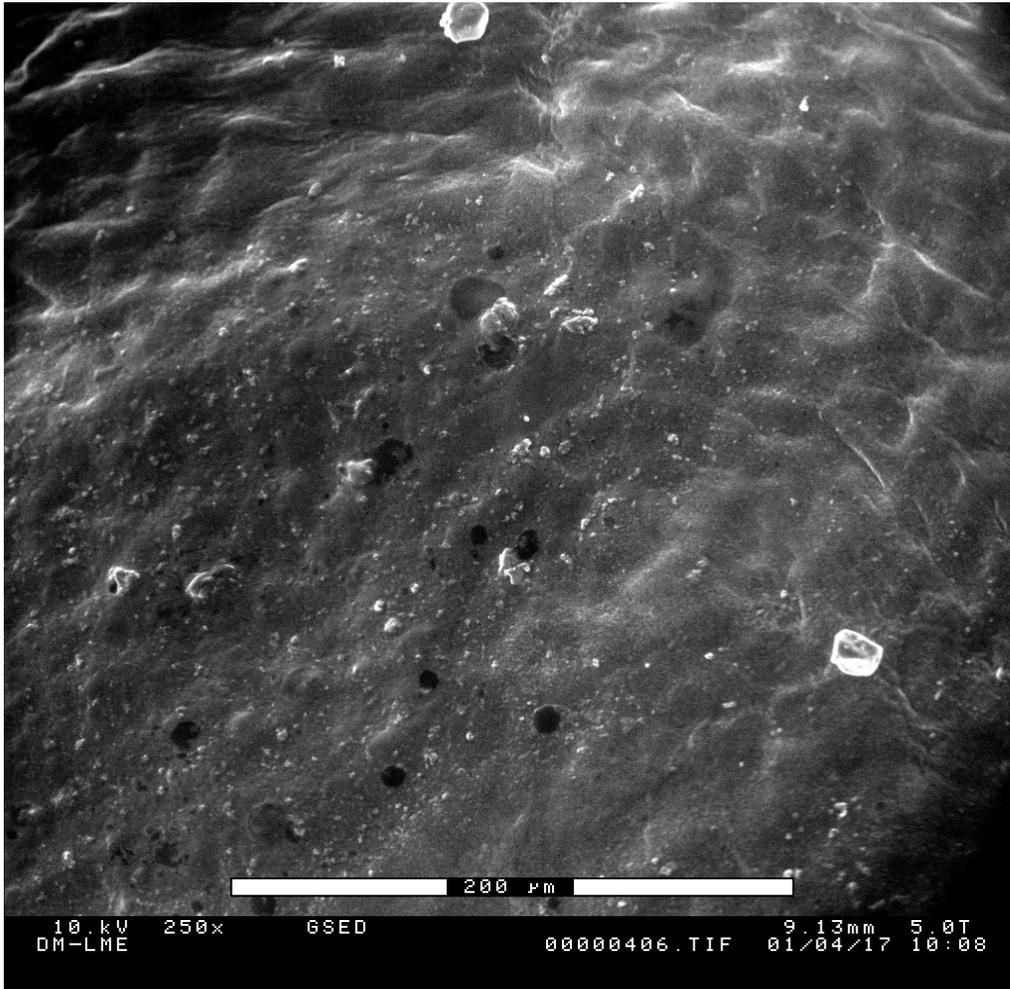


Figura 22: Superficie de cartílago congelado. Se observa una extensión irregular, con colinas, protuberancias y residuos. Como en la fotografía anterior los residuos podrían ser cristales de líquido sinovial o fragmentos óseos al momento del corte de la muestra.

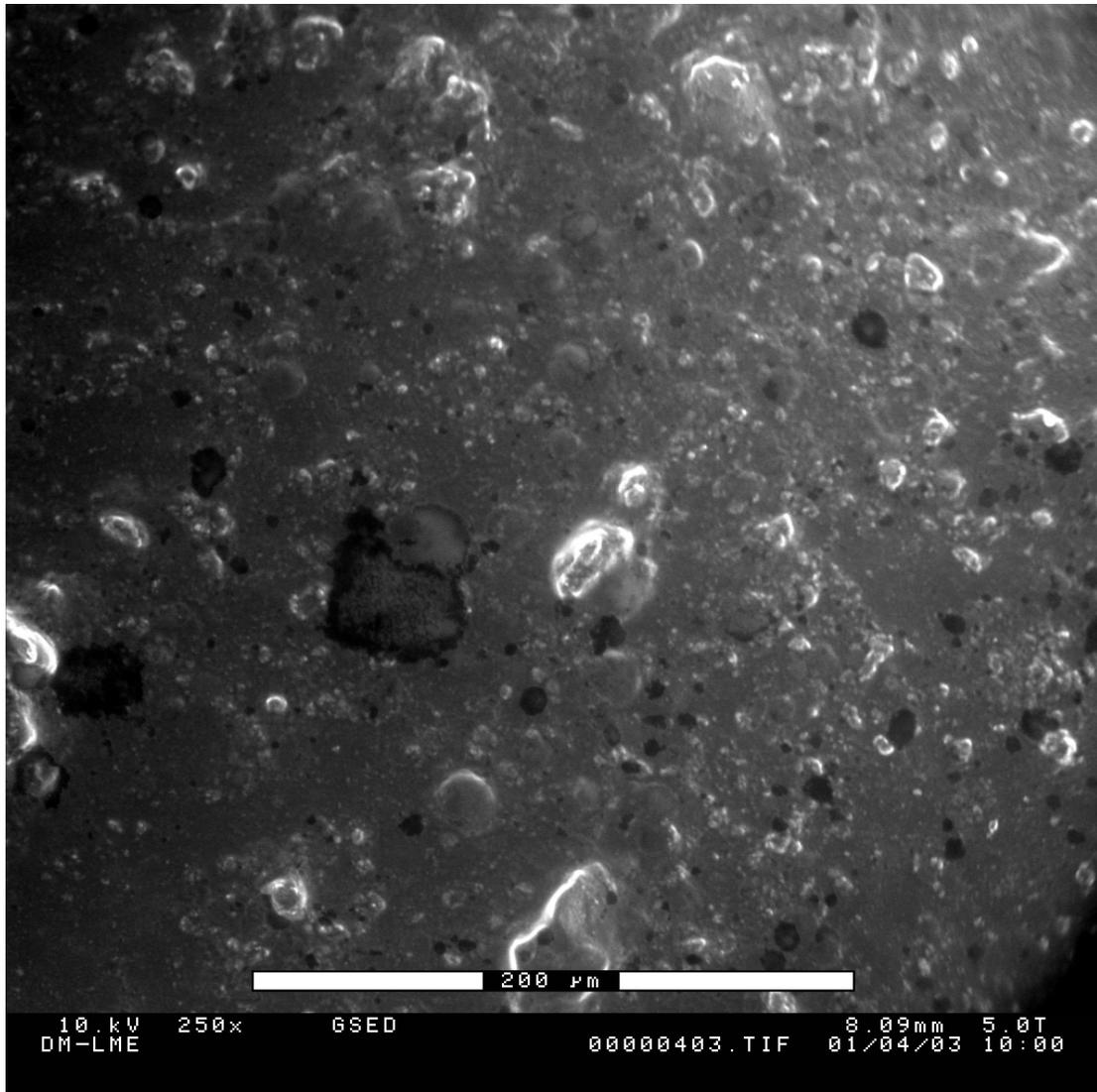


Figura 23. Superficie de cartílago congelado. Se observa una extensión irregular, cubierta ampliamente con protuberancias y cuerpos amorfos de distintos tamaños que en algunos casos aparentan ser residuos.

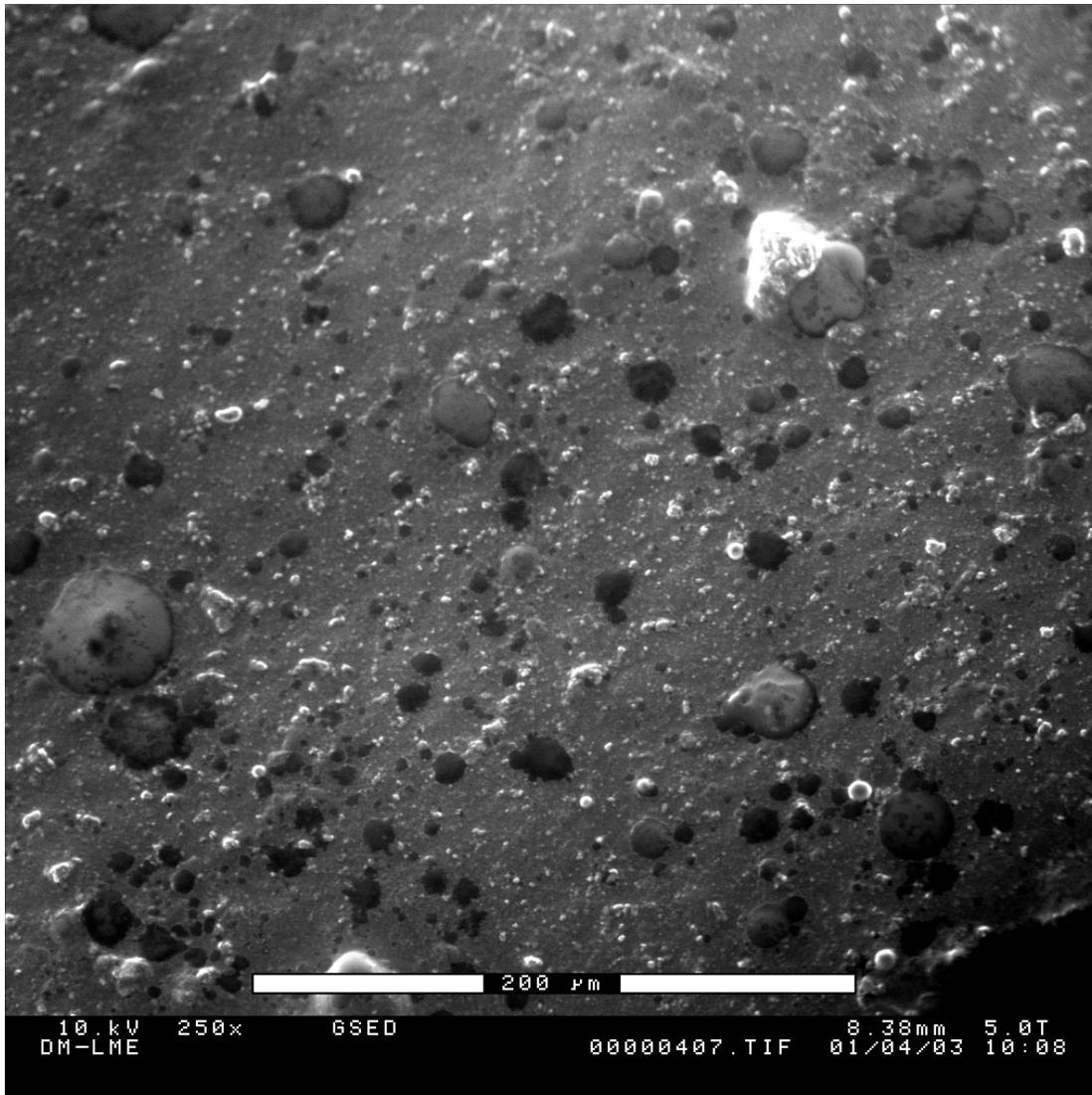


Figura 24: Superficie de cartílago congelado. Como en la fotografía anterior es posible observar una extensión irregular con protuberancias y cuerpos amorfos de pequeño tamaño (probables residuo óseos).

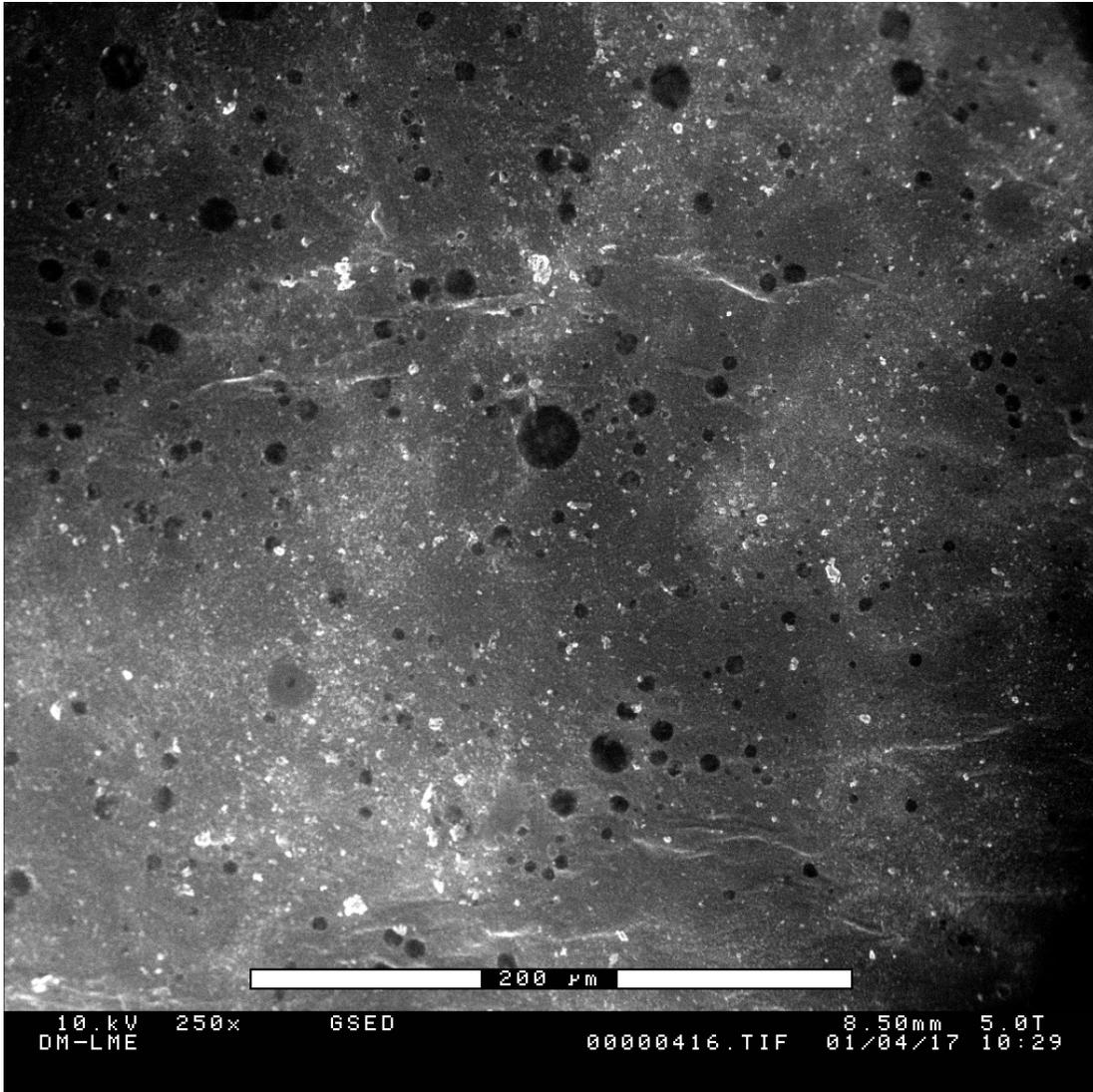


Figura 25: Superficie de cartílago congelado. Se observa una extensión irregular, con colinas, protuberancias y residuos. Las lagunas son de aspecto uniforme en su interior por lo que impresionan estar vacías en la mayoría de los casos.

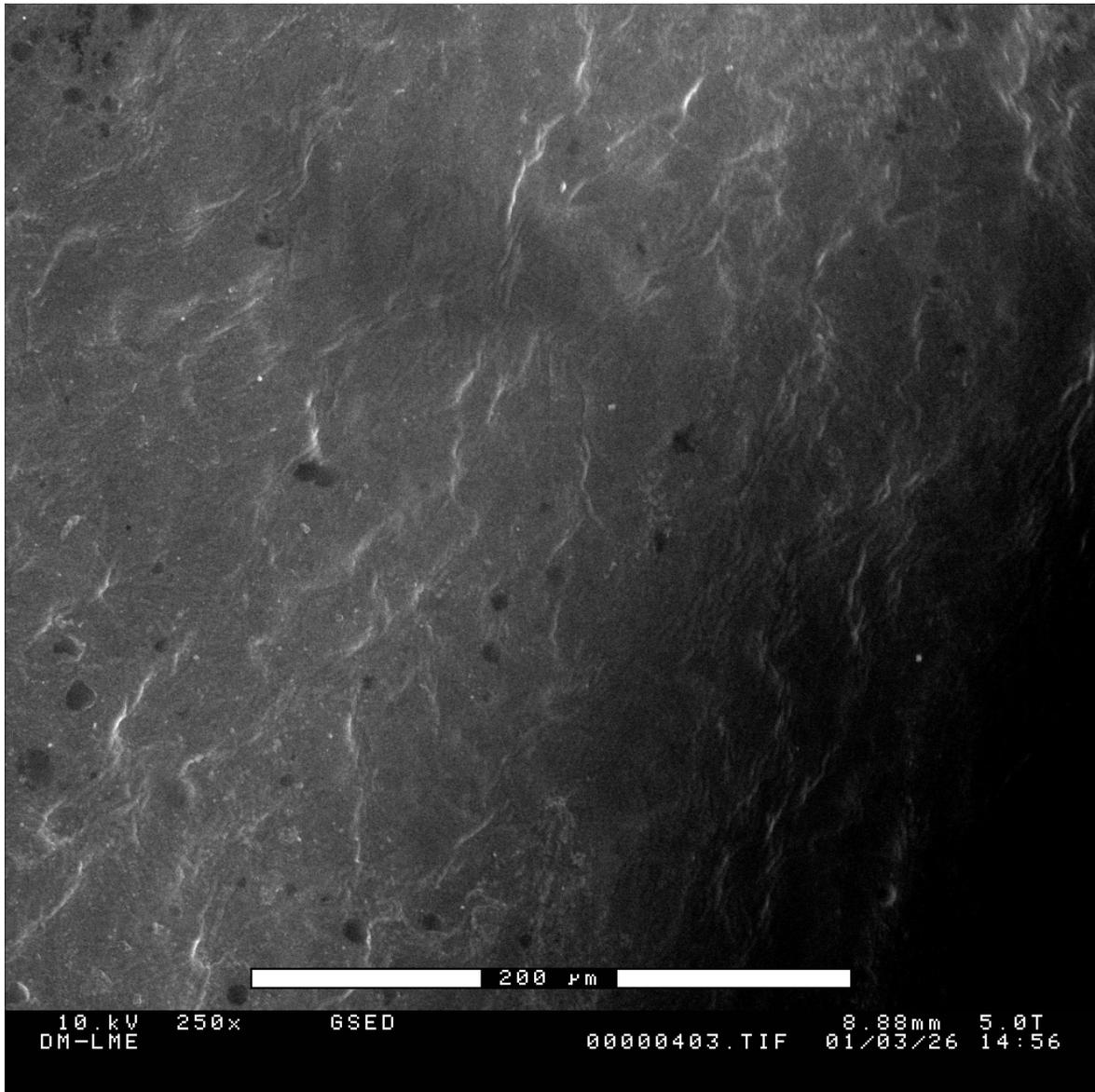


Figura 26: Superficie de cartílago criopreservado. Es posible observar una extensión más o menos uniforme, con colinas no muy pronunciadas y algunas pequeñas protuberancias.

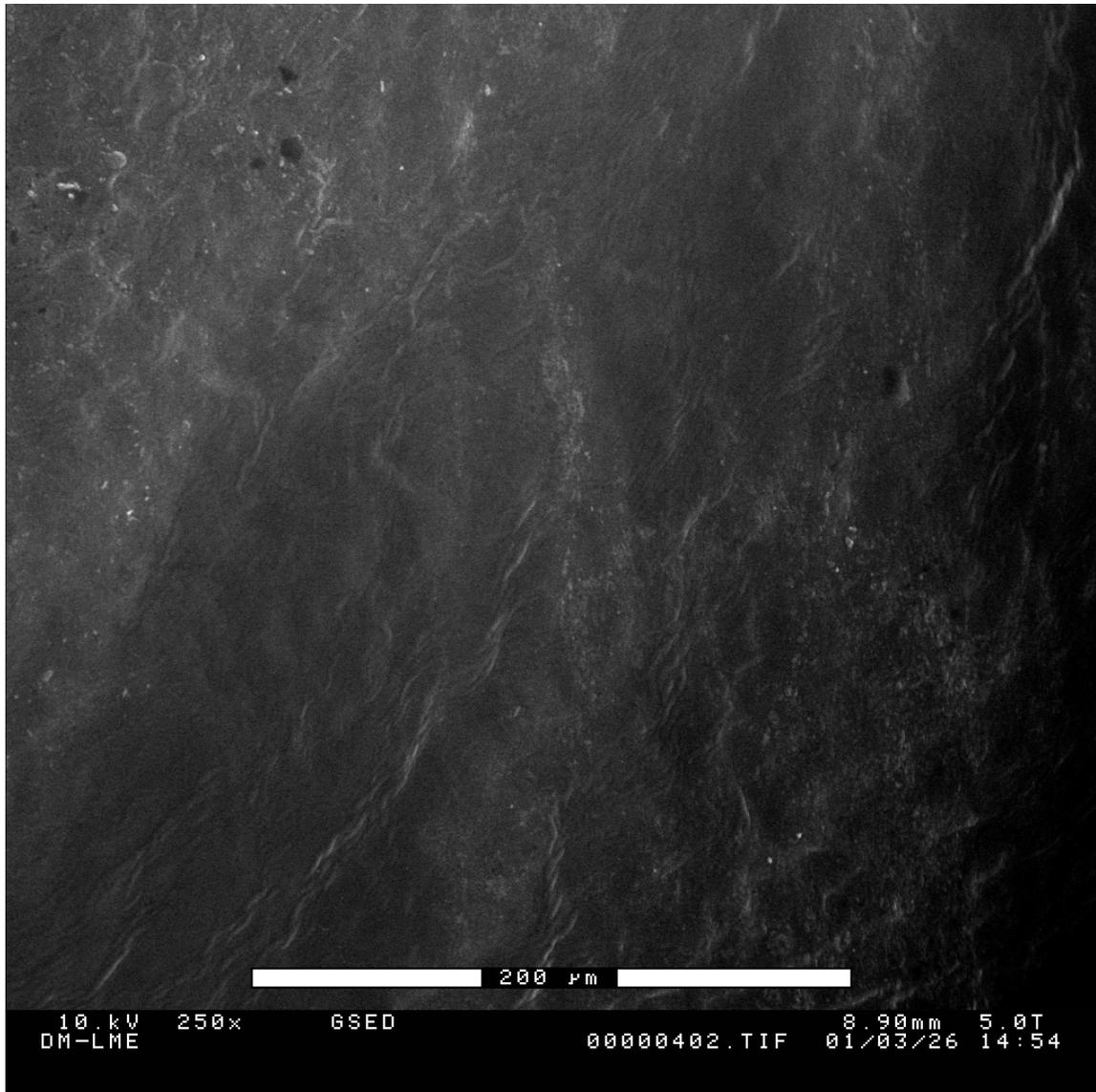


Figura 27: Superficie de cartílago criopreservado. Se observa una extensión bastante uniforme con pequeñas colinas y muy escasas protuberancias.

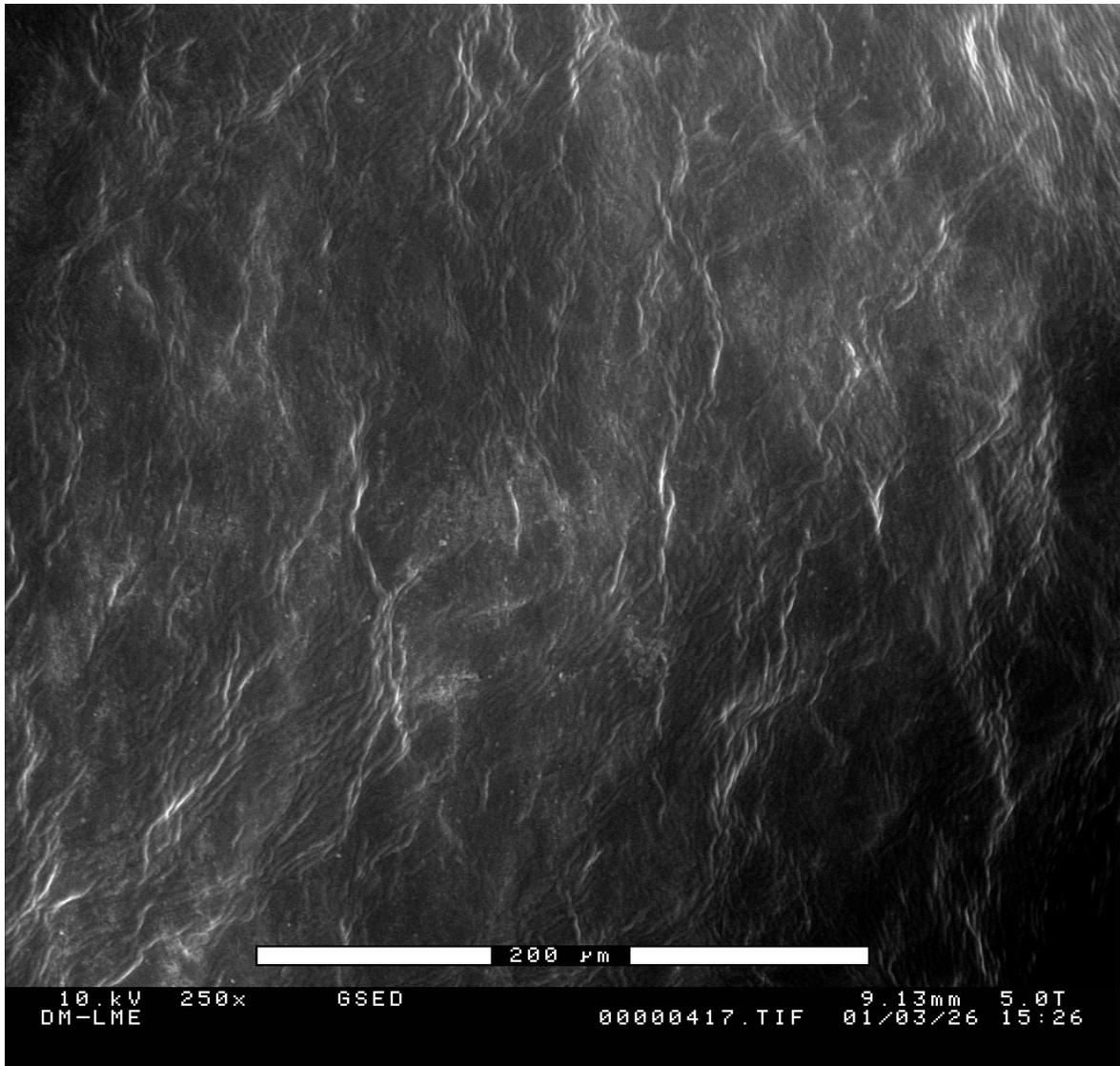


Figura 28: Superficie de cartílago criopreservado. Se aprecia una extensión irregular con colinas. No hay grietas ni lagunas condrocíticas.

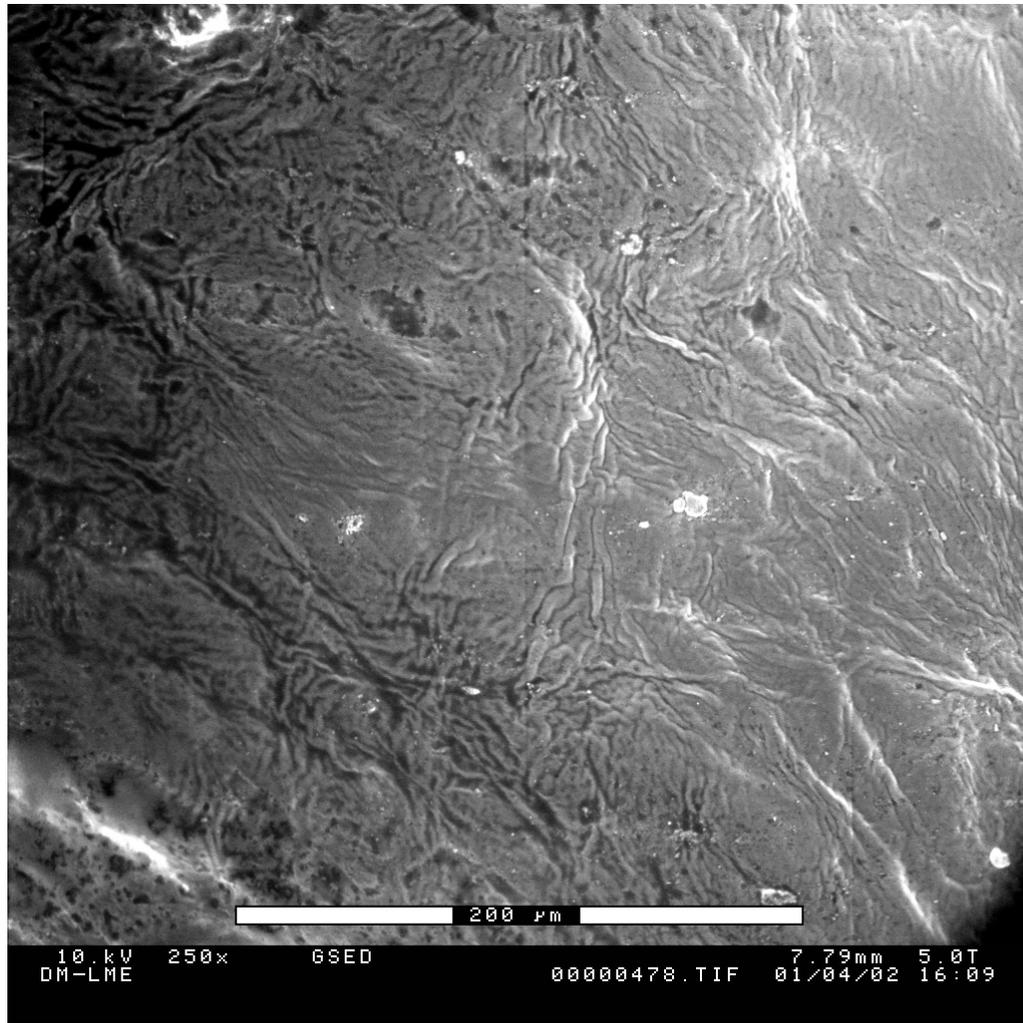


Figura 29: Superficie de cartílago criopreservado. Se aprecia una extensión irregular con colinas. Algunos residuos escasos y protuberancias también son identificables.

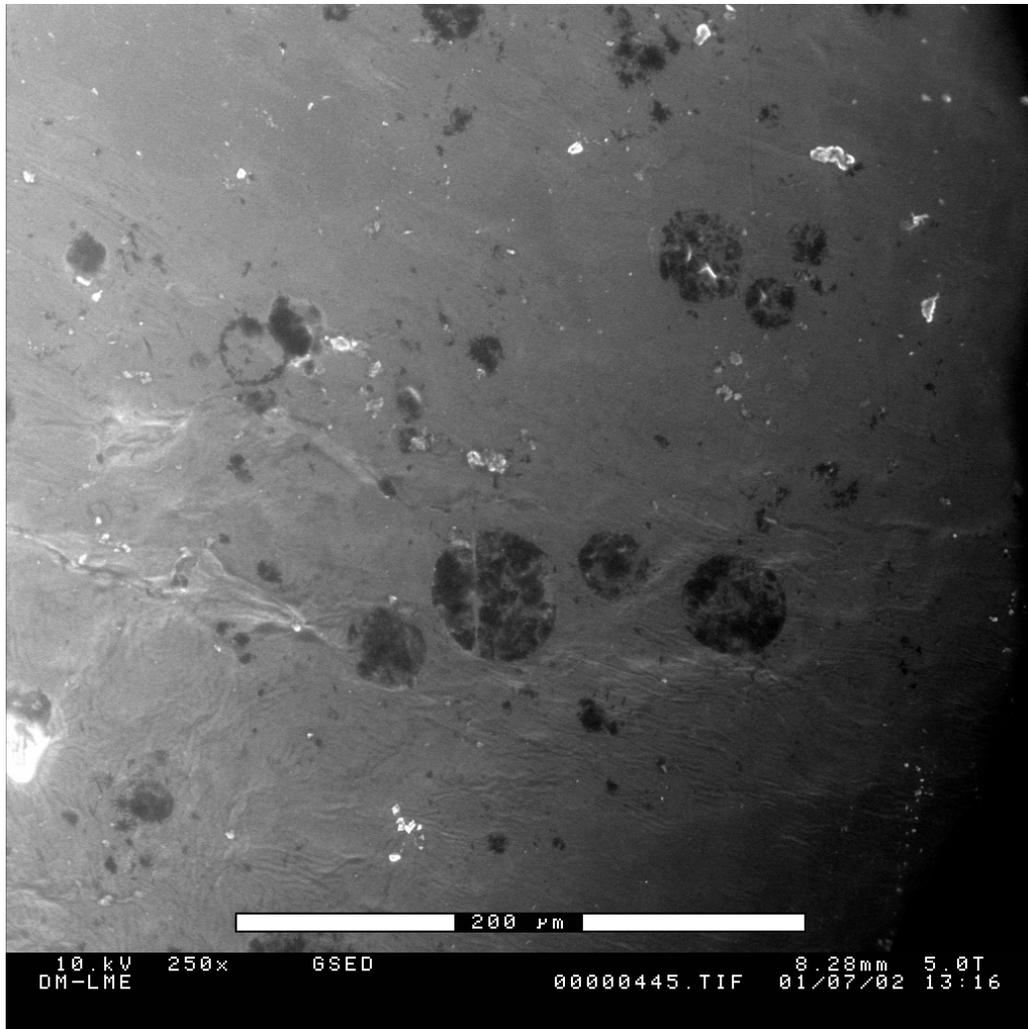


Figura 30: Superficie de cartílago criopreservado. Es posible observar una superficie más o menos uniforme en extensión, con algunas colinas y residuos.

Igualmente se observan imágenes redondeadas de bordes netos presuntamente ocupadas por cuerpos amorfos que podrían tratarse de lagunas con condrocitos apoptóticos.

2º.- Diseñar un sistema de clasificación de los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, empleando fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental y validando dicho sistema por variabilidad intra e interobservador.

El sistema de clasificación creada por nuestro equipo, está compuesta por tres grandes categorías que a su vez agrupan a un total de diez subcategorías. Cada categoría es independiente, por lo que este sistema de clasificación engloba en realidad a tres subsistemas de clasificación de accidentes topográficos. En una misma imagen pueden estar presentes más de una subcategoría, en cuyo caso el observador las debe registrar por separado.

A.- Relieve de superficie (Evenness of surface)

A.1.- superficie lisa (Even surface)

A.2.- superficie irregular (Uneven surface) :

A.2.1.- superficie con colinas (Hillocky surface)

A.2.2.- superficie con protuberancias (Knobby surface)

B.- Hendiduras (Splits)

B.1.- superficie sin hendiduras (No-splits)

B.2.- superficie con hendiduras superficiales (Superficial split)

B.3.- superficie con hendiduras profundas (Deep split)

C.- Lagunas (Lacunae)

C.1.- sin lagunas (No-lacunae)

C.2.- lagunas llenas (Filled lacunae)

C.3.- lagunas vacías (Empty lacunae)

A.- Relieve de superficie (Evenness of surface)

Se denominará "relieve de superficie" a la forma que presenta el fragmento de cartílago en su superficie (accidentes topográficos de relieve). Estas formas se clasifica en:

A.1.- Superficie lisa (Even surface)

Cuando la superficie que se aprecia en la fotografía es uniformemente plana en su extensión (Fig. 31).

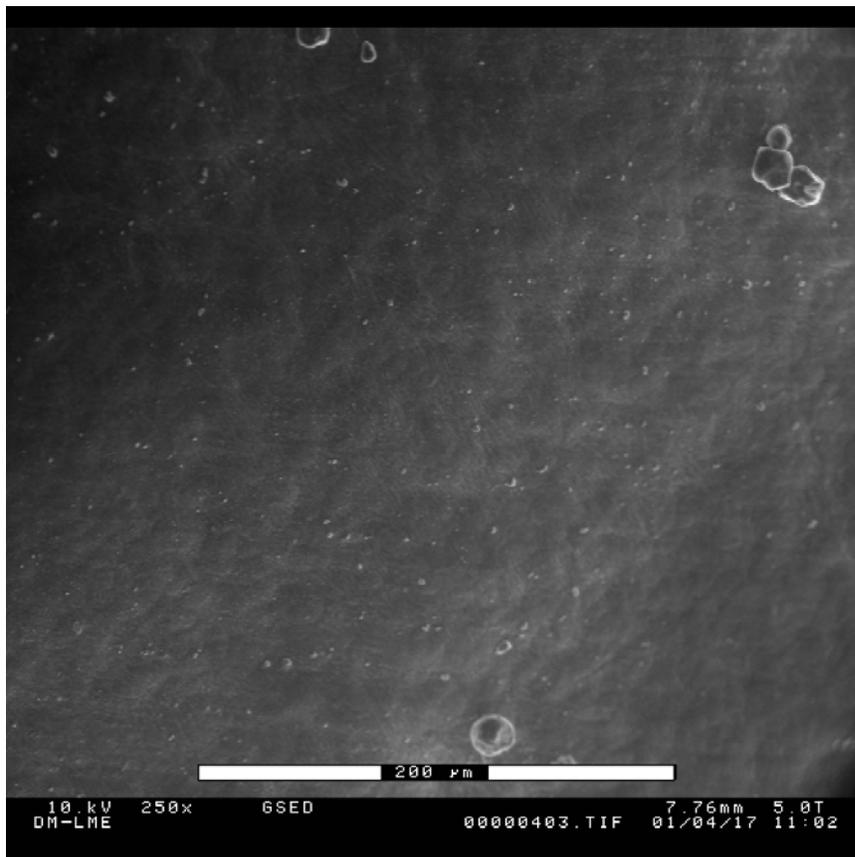


Figura 31

A.2.- Superficie irregular (Uneven surface)

Cuando la extensión de la superficie posee algunos relieves que pueden seguir o no un patrón definido. Con fines prácticos se distinguirán genéricamente dos grandes tipos de irregularidades: las colinas y las protuberancias, y que pueden estar presentes simultáneamente en una misma superficie.

A.2.1.- Superficie con colinas (Hillocky surface)

La superficie que se aprecia en la fotografía da la impresión de poseer colinas u ondulaciones, que a este efecto son imágenes que recuerdan a una cordillera montañosa (Fig. 32).

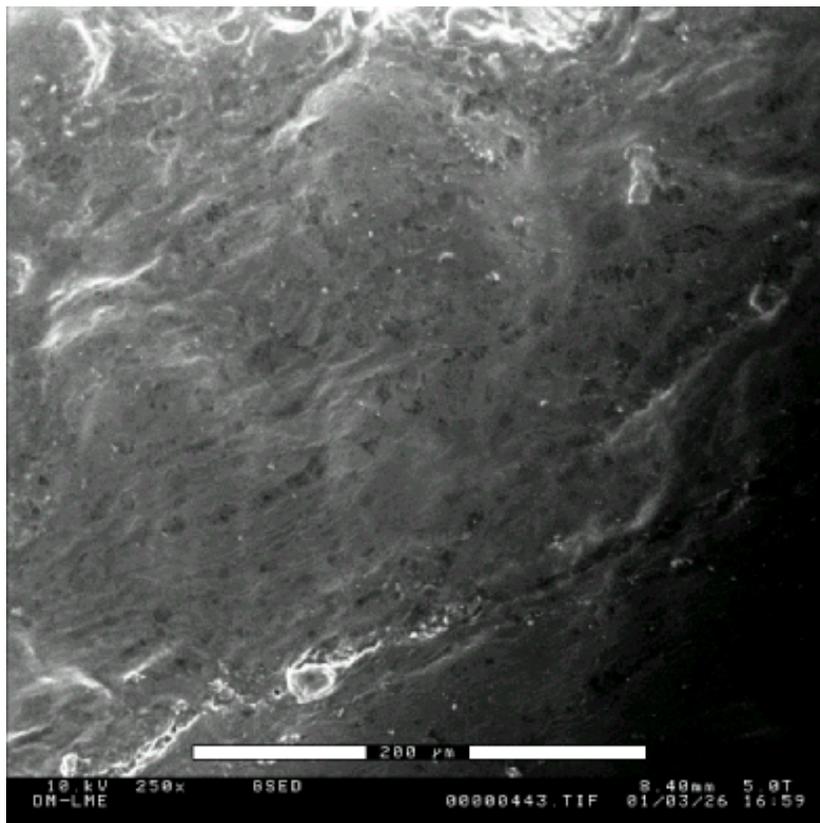


Figura 32

A.2.2.- Superficie con protuberancias (Knobby surface)

Cuando en la superficie están presentes uno o más abultamientos redondeados, de bordes bien definidos (Fig. 33).

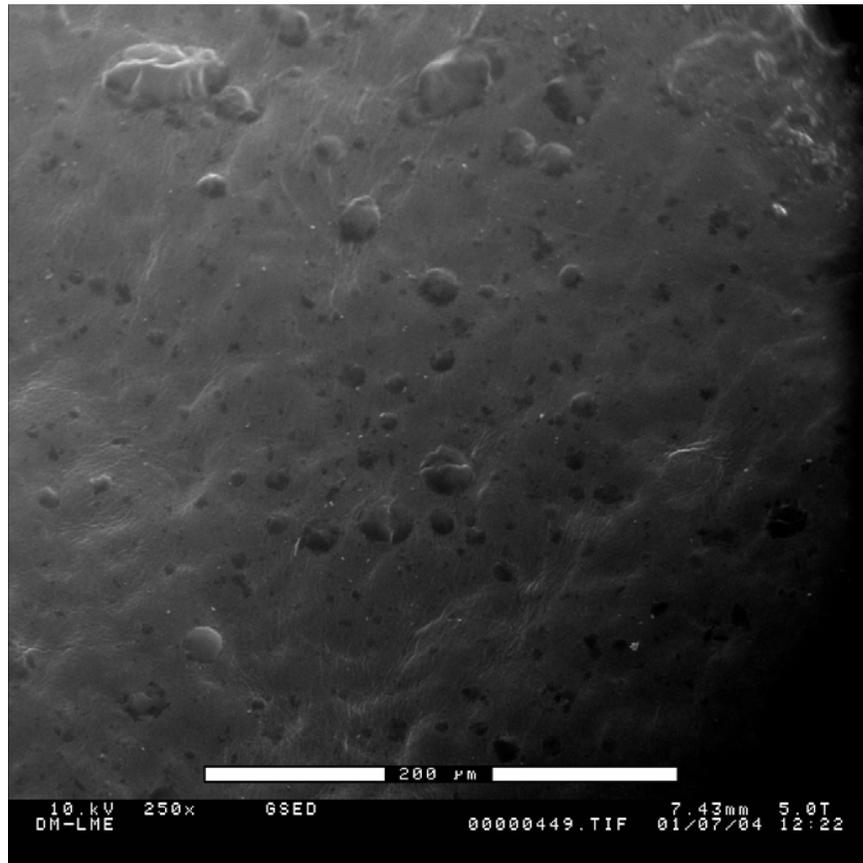


Figura 33

En ocasiones, es posible observar cuerpos redondeados de bordes bien definidos de color claro que pueden no pertenecer a la superficie. En este caso es probable de que se trate de pequeños fragmentos de hueso y cartílago remanentes del proceso de corte con trefina al tomar la muestra (correspondientes al término de "debris" en la literatura anglosajona) y que no son clasificados como protuberancias.

B.- Hendiduras de superficie (Surface splits)

Son imágenes en la superficie del cartílago compatibles con una grieta o fractura. Su presencia no define irregularidad de superficie.

B.1.- Superficie sin hendiduras (No-splits)

Es aquella superficie donde no se observan fracturas o grietas, dando la impresión de indemnidad (Fig. 34).

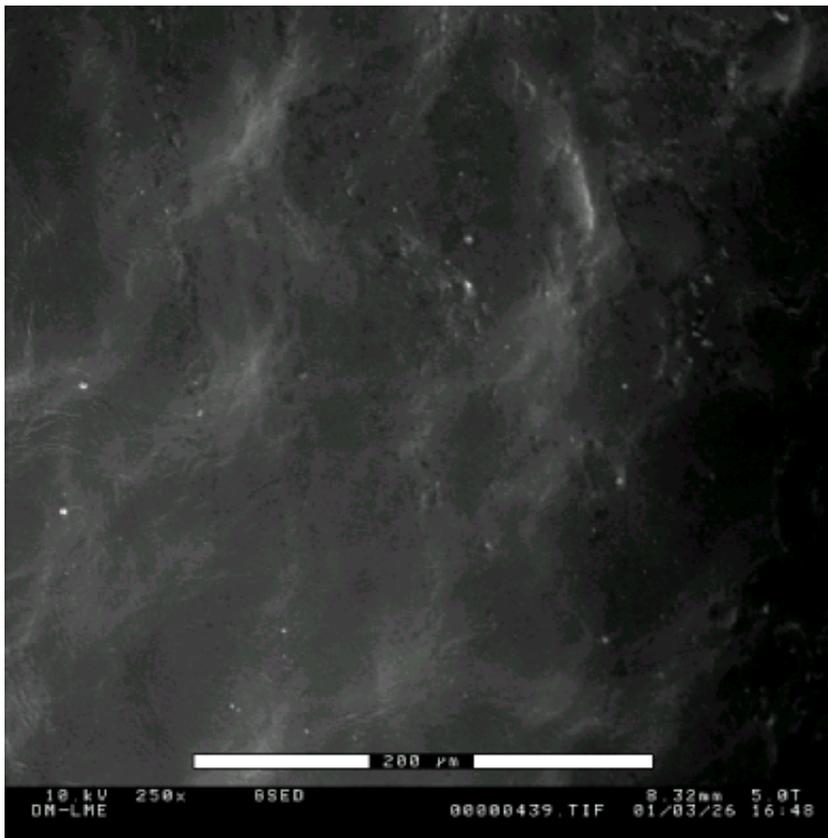


Figura 34

B.2.- Hendidura superficial (Superficial split)

Cuando se observa algún agrietamiento en la superficie y hay la sensación de ver el fondo del mismo, como si se tratara de una fractura poco profunda (Fig. 35).

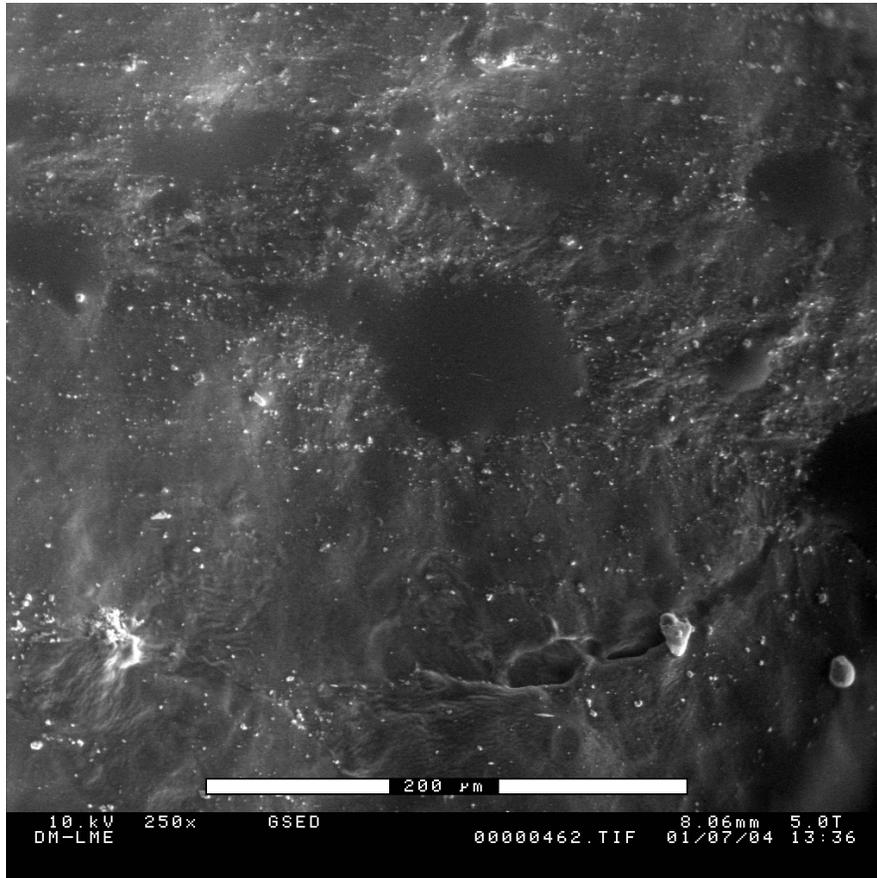


Figura 35

B.3.- Hendidura profunda (Deep split)

En la fotografía se observa una superficie con algún agrietamiento sin tener la impresión de poder observar el fondo del mismo (Fig. 36).

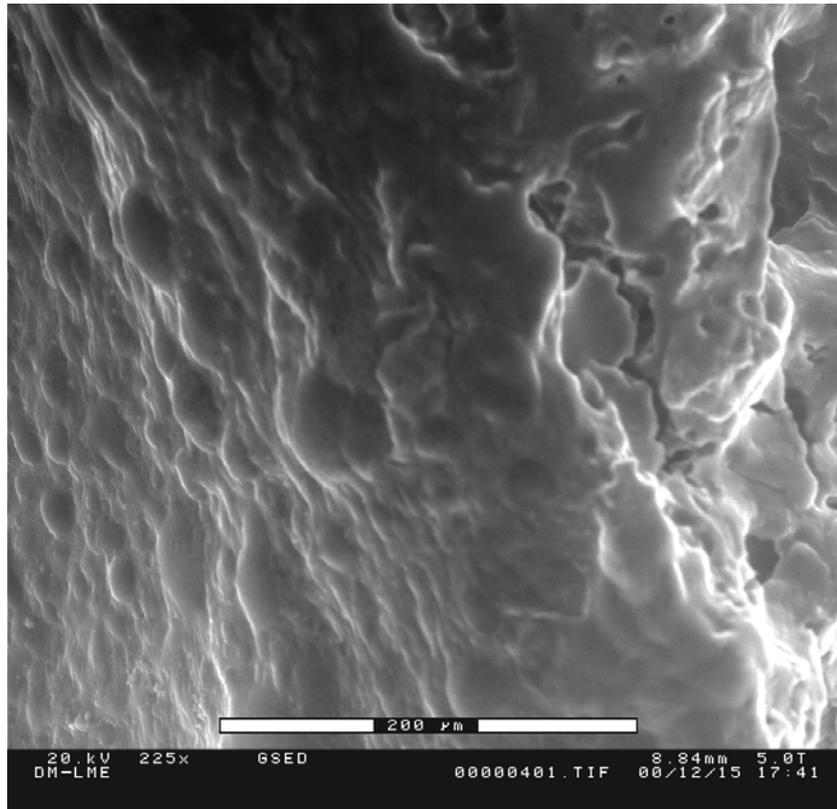


Figura 36

C.- Lagunas (Lacunae)

Cuando en la fotografía se aprecian unos defectos redondos u ovalados de bordes muy bien definidos, que pueden o no estar ocupados. Al igual que las hendiduras, su presencia no define irregularidad de superficie.

C.1.- Superficie sin lagunas (No-lacunae)

Es aquella superficie donde no se observan defectos redondo u ovalados, de bordes muy bien definidos (Fig. 37).



Figura 37

C.2.- Lagunas llenas (Filled lacunae)

Una o más estructuras redondeadas, de tamaño variable, de bordes bien definidos, ubicadas en la superficie fotografiada ocupados por algún cuerpo (Fig. 38).

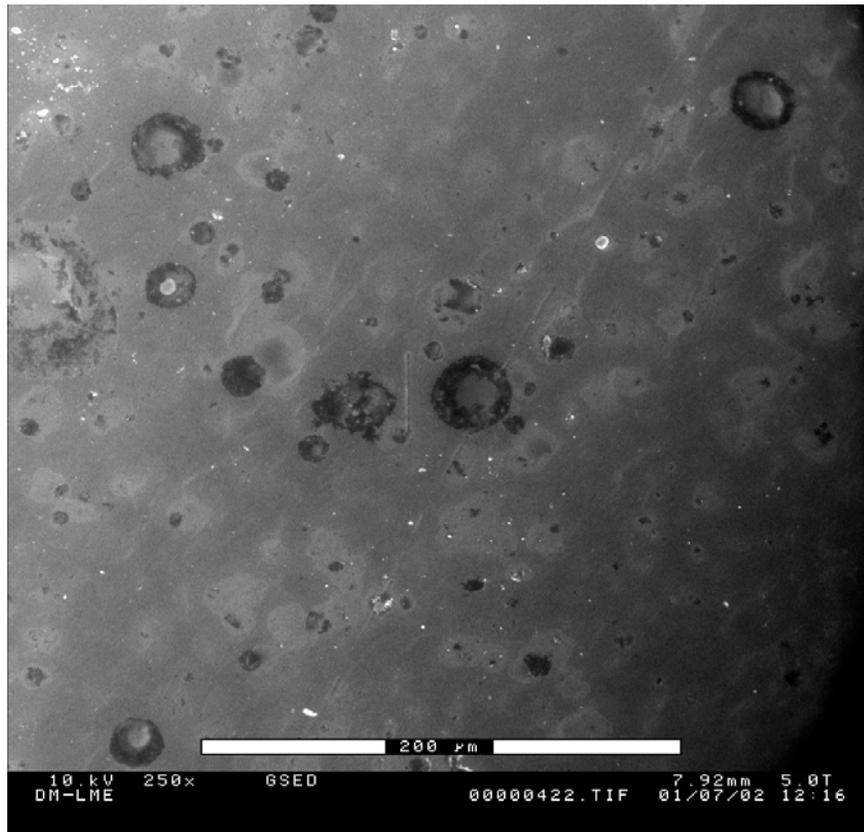


Figura 38

C.3.- Lagunas vacías (Empty lacunae)

Una o más estructuras redondeadas, de bordes bien definidos, ubicadas en la superficie fotografiada y que da al observador la sensación de que se tratara de un agujero no ocupado, o al menos donde no es posible discernir si está ocupada o no por algún cuerpo. Sus tamaños son muy variables (Fig. 39).

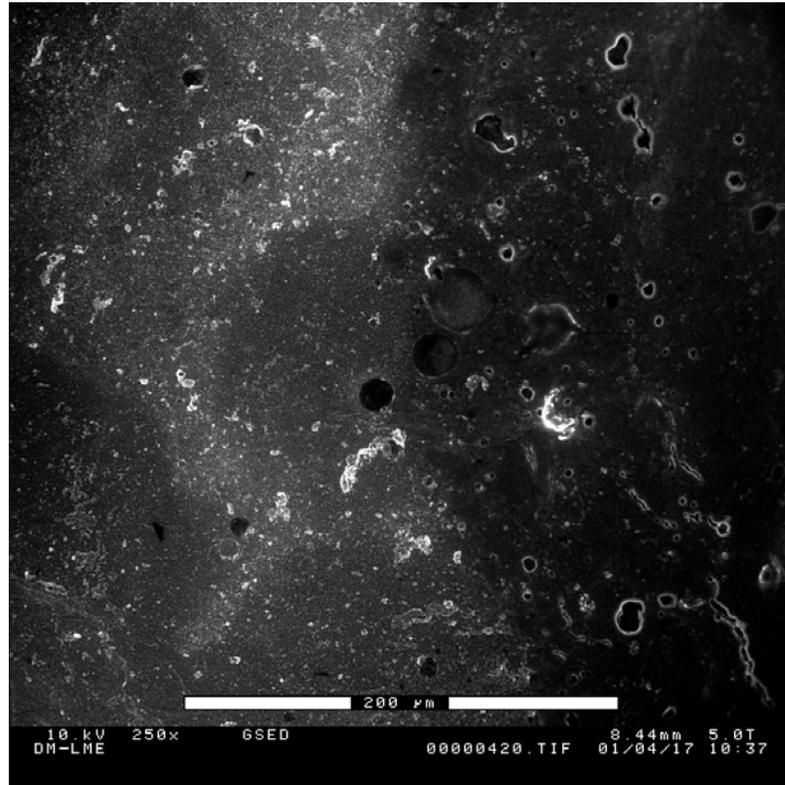


Figura 39

2.- Medición de la validez de la escala

2.1.- Medición de la confiabilidad de la escala (variabilidad Intra-observador)

A.-Relieve de superficie (Evenness of surface)

A.1.- Superficie lisa (Even surface)

Tabla 4

		VALORACION N° 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACION N° 2	POSITIVO	67	0	67
	NEGATIVO	4	29	33
TOTALES		71	29	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9600$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8949

Límite superior: 0,9871

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,5714$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,9067$

Desviación estándar: $\pm 0,0457$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8171

Límite superior: 0,9963

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia muy buena

A.2.- Superficie irregular (Uneven surface)

a.2.1.- Superficie con colinas (Hillocky surface)

Tabla 5

		VALORACIÓN Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACION Nº 2	POSITIVO	17	2	19
	NEGATIVO	0	81	81
TOTALES		17	83	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9800$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n=100$)

Límite inferior: 0,9226

Límite superior: 0,9965

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,7046$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,9323$

Desviación estándar: $\pm 0,0474$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n= 100$)

Límite inferior: 0,9226

Límite superior: 0,9965

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia muy buena

A.2.2.- Superficie con protuberancias (Knobby surface)

Tabla 6

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACIÓN Nº 2	POSITIVO	12	2	14
	NEGATIVO	0	86	86
TOTALES		12	88	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9800$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,9226

Límite superior: 0,9965

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,7736$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,9117$

Desviación estándar: $\pm 0,0618$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,7905

Límite superior: 1

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia muy buena

B.- Hendiduras (splits)

B.1.- Superficie sin hendiduras (No-splits)

Tabla 7

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACIÓN Nº 2	POSITIVO	89	2	91
	NEGATIVO	3	6	9
TOTALES		92	8	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9500$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8817

Límite superior: 0,9814

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,8444$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,6787$

Desviación estándar: $\pm 0,1401$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,4041

Límite superior: 0,9532

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia buena

B.2.- superficie con hendiduras superficiales (superficial split)

Tabla 8

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACION Nº 2	POSITIVO	6	2	8
	NEGATIVO	1	91	92
TOTALES		7	93	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9700$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,9085

Límite superior: 0,9922

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,8612$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,7839$

Desviación estándar: $\pm 0,1229$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,5430

Límite superior: 1

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia buena

B.3.- Superficie con hendiduras profundas (Deep split)

Tabla 9

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACION Nº 2	POSITIVO	1	0	1
	NEGATIVO	0	99	99
TOTALES		1	99	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 1$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,9539

Límite superior: 1

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,9802$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 1$

Desviación estándar: $\pm 0,0000$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 1

Límite superior: 1

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia muy buena

C.- Lagunas (Lacunae)

C.1- superficie sin lagunas (No-lacunae)

Tabla 10

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACIÓN Nº 2	POSITIVO	78	2	80
	NEGATIVO	0	20	20
TOTALES		78	22	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9800$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,9226

Límite superior: 0,9965

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,6680$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,9398$

Desviación estándar: $\pm 0,0422$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8571

Límite superior: 1

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia muy buena

C.2.- Lagunas llenas (Filled lacunae)

Tabla 11

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACIÓN Nº 2	POSITIVO	18	0	18
	NEGATIVO	2	80	82
TOTALES		20	80	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9800$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,9226

Límite superior: 0,9965

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,6920$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,9351$

Desviación estándar: $\pm 0,0455$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8460

Límite superior: 1

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia muy buena

C.3.- Lagunas vacías (Empty lacunae)

Tabla 12

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACIÓN Nº 2	POSITIVO	2	0	2
	NEGATIVO	0	98	98
TOTALES		2	98	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 1$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,9539

Límite superior: 1

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,9608$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 1$

Desviación estándar: $\pm 0,0000$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 1

Límite superior: 1

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia muy buena

2.2.- Medición de la variabilidad Inter-observador de la escala

A.-Relieve de superficie (Evenness of surface)

A.1.- Superficie lisa (Even surface)

Tabla 13

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACION Nº 2	POSITIVO	62	0	62
	NEGATIVO	9	29	38
TOTALES		71	29	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9100$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8317

Límite superior: 0,9554

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,5504$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,7998$

Desviación estándar: $\pm 0,0637$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,6751

Límite superior: 0,9246

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia buena

A.2.- Superficie irregular (Uneven surface)

A.2.1.- Superficie con colinas (Hillocky surface)

Tabla 14

		VALORACIÓN Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACION Nº 2	POSITIVO	15	7	22
	NEGATIVO	2	76	78
TOTALES		17	83	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9100$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8317

Límite superior: 0,9554

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,6848$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,7145$

Desviación estándar: $\pm 0,0908$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,5365

Límite superior: 0,8924

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia buena

A.2.2.- Superficie con protuberancias (Knobby surface)

Tabla 15

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACIÓN Nº 2	POSITIVO	11	5	16
	NEGATIVO	1	83	84
TOTALES		12	88	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9400$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8688

Límite superior: 0,9754

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,7584$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,7517$

Desviación estándar: $\pm 0,0983$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,5590

Límite superior: 0,9443

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia buena

B.- Hendiduras (Splits)

b.1.- Superficie sin hendiduras (No-splits)

Tabla 16

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACIÓN Nº 2	POSITIVO	90	5	95
	NEGATIVO	2	3	5
TOTALES		92	8	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9300$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8562

Límite superior: 0,9690

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,8780$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,4262$

Desviación estándar: $\pm 0,2091$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,0163

Límite superior: 0,8361

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia moderada

B.2.- superficie con hendiduras superficiales (Superficial split)

Tabla 17

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACION Nº 2	POSITIVO	4	0	4
	NEGATIVO	3	93	96
TOTALES		7	93	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9700$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,9085

Límite superior: 0,9922

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,8956$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,7126$

Desviación estándar: $\pm 0,1634$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,3924

Límite superior: 1

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia muy buena

B.3 - Superficie con hendiduras profundas (Deep split)

Tabla 18

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACION Nº 2	POSITIVO	1	0	1
	NEGATIVO	0	99	99
TOTALES		1	99	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 1$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,9539

Límite superior: 1

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,9802$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 1$

Desviación estándar: $\pm 0,0000$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 1

Límite superior: 1

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia muy buena

C.- Lagunas (Lacunae)

C.1- superficie sin lagunas (No-lacunae)

Tabla 19

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACIÓN Nº 2	POSITIVO	76	6	82
	NEGATIVO	2	16	18
TOTALES		78	22	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9200$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8439

Límite superior: 0,9623

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,6792$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,7506$

Desviación estándar: $\pm 0,0846$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,5849

Límite superior: 0,9164

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia buena

C.2.- Lagunas llenas (Filled lacunae)

Tabla 20

		VALORACION N° 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACIÓN N° 2	POSITIVO	14	3	17
	NEGATIVO	6	77	83
TOTALES		20	80	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9100$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,8317

Límite superior: 0,9554

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,6980$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,7020$

Desviación estándar: $\pm 0,0948$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,5163

Límite superior: 0,8877

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia buena

C.3.- Lagunas vacías (Empty lacunae)

Tabla 21

		VALORACION Nº 1		
		positivo	negativo	totales
VALORACIÓN Nº 2	POSITIVO	1	0	1
	NEGATIVO	1	98	99
TOTALES		2	98	100

Indice de Concordancia Observado: $P_o = 0,9900$

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,9376

Límite superior: 0,9995

Indice de Concordancia Esperado: $P_e = 0,9704$

Indice de Concordancia Kappa:

$k = 0,6622$

Desviación estándar: $\pm 0,3361$

Intervalo de Confianza del Indice de Concordancia Kappa

(Intervalo de Confianza del 95 %, $n = 100$)

Límite inferior: 0,0033

Límite superior: 1

Valoración del Indice de Concordancia Kappa: (Landis y Koch, 1977)

Grado de acuerdo o fuerza de concordancia buena

3º.- Emplear un sistema de clasificación validado para comparar los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, con los de injertos que han sido almacenados por congelación y por criopreservación, a partir de fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental.

A.-Relieve de superficie (Evenness of surface)

A.1.- Superficie lisa (Even surface)

Tabla 22

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Congelado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	71	12	83
	NEGATIVO	29	88	117
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 71,6919

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

Tabla 23

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	71	42	113
	NEGATIVO	29	58	87
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 17,1091

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

Tabla 24

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Congelado	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	12	42	54
	NEGATIVO	88	58	146
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 22,8310

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

A.2.- Superficie irregular (Uneven surface)

A.2.1- Superficie irregular con colinas (Hillocky surface)

Tabla 25

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Congelado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	17	56	73
	NEGATIVO	83	44	127
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 32,8119

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

Tabla 26

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	17	29	46
	NEGATIVO	83	71	154
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 4,0654

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Tabla 27

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Congelado	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	56	29	85
	NEGATIVO	44	71	115
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 14,9156

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

A.2.- Superficie irregular (Uneven surface)

A.2.2- Superficie irregular con protuberancias (Knobby surface)

Tabla 28

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Congelado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	12	32	44
	NEGATIVO	88	68	156
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 11,6550

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

Tabla 29

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	12	39	51
	NEGATIVO	88	61	149
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 19,1867

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

Tabla 30

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Congelado	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	32	39	71
	NEGATIVO	68	61	129
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 1,0699

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

B.- Hendiduras de superficie (Surface splits)

B.1.- Superficie sin hendiduras (No-splits)

Tabla 31

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Congelado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	92	88	180
	NEGATIVO	8	12	20
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 0,8888

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Tabla 32

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	92	92	184
	NEGATIVO	8	8	16
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 0

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Tabla 33

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Congelado	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	88	92	180
	NEGATIVO	12	8	20
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 0,8888

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

B.- Hendiduras de superficie (Surface splits)

B.2.- Hendidura superficial (Superficial splits)

Tabla 34

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Congelado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	7	10	17
	NEGATIVO	93	90	183
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 0,5785

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Tabla 35

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	7	8	15
	NEGATIVO	93	92	185
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 0,0720

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Tabla 36

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Congelado	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	10	8	18
	NEGATIVO	90	92	182
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 0,2442

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

B.- Hendiduras de superficie (Surface splits)

B.3.- Hendidura profunda (Deep split)

Tabla 37

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Congelado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	1	2	3
	NEGATIVO	99	98	197
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 0,3384

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Tabla 38

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	1	0	1
	NEGATIVO	99	100	199
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 1,0050

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Tabla 39

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Congelado	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	2	0	2
	NEGATIVO	98	100	198
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 2,0202

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

C.- Lagunas (Lacunae)

C.1.- Superficie sin lagunas (No-lacunae)

Tabla 40

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Congelado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	78	84	162
	NEGATIVO	22	16	38
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 1,1695

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Tabla 41

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	78	68	146
	NEGATIVO	22	32	154
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 2,5367

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Tabla 42

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Congelado	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	84	68	152
	NEGATIVO	16	32	48
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 7,0175

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

C.- Lagunas (Lacunae)

C.2.- Lagunas llenas (Filled lacunae)

Tabla 43

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Congelado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	20	0	20
	NEGATIVO	80	100	180
TOTALES		100	100	200

Grados de libertad: 1

Chi-cuadrado de Pearson: 22,2222

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

Tabla 44

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	20	21	41
	NEGATIVO	80	79	159
TOTALES		100	100	200

Grados de libertad: 1

Chi-cuadrado de Pearson: 0,0306

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Tabla 45

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Congelado	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	0	21	21
	NEGATIVO	100	79	179
TOTALES		100	100	200

Grados de libertad: 1

Chi-cuadrado de Pearson: 23,4636

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

C.- Lagunas (Lacunae)

C.3.- Llagunas vacías (Empty lacunae)

Tabla 46

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Congelado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	2	16	18
	NEGATIVO	98	84	182
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 11,9658

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

Tabla 47

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Fresco	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	2	11	13
	NEGATIVO	98	89	187
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 6,6639

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p < 0,05$

Conclusión: Distribución significativa

Tabla 48

		TIPO DE PRESERVACIÓN		
		Congelado	Criopreservado	totales
VALORACIÓN	POSITIVO	16	11	27
	NEGATIVO	84	89	173
TOTALES		100	100	200

Chi-cuadrado de Pearson: 1,0704

Valor de « p » (Corrección de Bonferroni) : $p > 0,05$

Conclusión: Distribución no significativa

Discusión de materiales y métodos

El modelo animal

Se escogió al conejo albino New Zealand por ser un animal de uso frecuente en los estudios sobre el cartílago (Fu y col, 2001; Harding y col, 1999; Goodman y col, 1990; Wu y col, 1990) por su docilidad, tamaño y facilidad en el manejo. Hubo cuidado en la selección de la edad del animal (10 a 12 meses) para que el proceso de crecimiento no interfiriera con las variables que se deseaban estudiar.

Diseño del experimento y cálculo del tamaño de la muestra

El Diseño del experimento

Cuando se desea comparar estadísticamente dos procedimientos para saber cual de ellos es el mejor, es importante reconocer que el tamaño de la muestra y la potencia de la prueba estadística dependen de cuan variable es la población que se va a estudiar. Si la población no es muy variable se puede aplicar un menor tamaño muestral o aumentar la potencia de la prueba, estando estos factores estrechamente ligados a la reducción del sufrimiento de los animales de experimentación.

El principio consiste en realizar un experimento con el menor número posible de animales, manteniendo la probabilidad de detectar diferencias significativas dentro de unos límites admisibles, de forma que no haya necesidad de repetir experimentos por haberse obtenido resultado inútiles.

Por estos motivos se deben utilizar diseños que permitan reducir el error experimental. Esta reducción puede lograrse uniformizando los animales

utilizados y las condiciones en las cuales se va a desarrollar el experimento y este debe ser el objetivo primario que debe buscar todo investigador.

El trabajo tiene un diseño experimental, longitudinal y prospectivo, en cuya elaboración se tomó en consideración los tres principios básicos que Hinkelmann y Kempthorne (1994), establecieron para mejorar la validez del análisis estadístico e incrementar la sensibilidad de cualquier experimento. Estos principios son: 1.- Principio de la replicación, 2.- Principio de la aleatorización y 3.- Principio del control local o bloqueo.

Principio de la replicación

“Cada tratamiento debe aplicarse a varias unidades experimentales”
(Hinkelmann y Kempthorne, 1994).

En esta investigación los tratamientos en estudio son la congelación y la criopreservación en comparación con el control que es el injerto osteocondral en estado fresco.

La unidad experimental es el objeto al que se le aplica el tratamiento y en el que se mide y analiza la variable que se investiga. En este estudio se escogió como unidad experimental, el cóndilo interno de Fémur de conejo New Zealand.

Hinkelmann y Kempthorne (1994) plantean que el principio de la replicación está fundamentado en que si las unidades experimentales son lo más parecidas entre si, se puede detectar errores que en otro caso podrían ser considerados como una diferencia entre los tratamientos que se investigan.

Principio de la aleatorización

“Asignación al azar de las unidades experimentales a cada uno de los tratamientos” (Hinkelmann y Kempthorne, 1994).

Esto nos conduce a realizar estimaciones no sesgadas, tanto de la varianza como de las diferencias entre tratamientos. De este modo la diferencias están libres de las discrepancias sistemáticas debidas a fuentes de variación no controladas o desconocidas.

En este trabajo se contó con un total de 16 conejos (tres grupos de cinco conejos y uno para ensayo piloto). Previa a la eutanasia del animal y por motivos técnicos se realizó la asignación al azar de cada conejo a un grupo experimental.

Principio del control local o bloqueo

La idea básica consiste en controlar adecuadamente el error reduciéndolo a la mínima expresión posible creando subgrupos de unidades experimentales lo más homogéneos dentro de cada grupo principal. De esta manera se redujeron algunos factores que podían producir una variación sistemática a las diferencias entre unidades experimentales, lo cual conduciría a un análisis más sensible, pues equivaldría a hacer una evaluación del error experimental dentro de cada bloque generado.

En nuestro estudio los bloques o subgrupos de animales quedaron determinados por la forma en que los conejos fueron provistos por el estabulario para la realización de los experimentos, debido a que los animales llegaron semanalmente en pequeños grupos.

El cálculo del tamaño de la muestra

Bailey (1981), Weakley (1981), Williams (1977), plantean que en los estudios donde se emplea como herramienta un microscopio electrónico, son adecuados grupos de comparación compuestos por 4 a 6 animales, ya que la validez estadística de las observaciones viene dada más por el número de fotografías obtenidas que por el número de individuos estudiados por grupo. El estudio fotográfico realizado se tratará posteriormente en la sección respectiva.

Protocolo de Eutanasia

La elección del Pentobarbital para practicar la eutanasia de los conejos de experimentación, se vio motivada a que la Comisión Europea considera que es un método recomendable, por ser rápido, efectivo y de poco peligro para el operador aunque se requiera de un entrenamiento previo para aplicarlo. Estas consideraciones fueron presentadas en la Directiva 86/609/EEC del 24 de noviembre de 1986, sobre "la aproximación de las leyes, regulaciones y provisiones administrativas de los Estados miembros en lo concerniente a la protección de animales usados para propósitos experimentales y otros propósitos".

El pentobarbital se utilizó a una concentración del 5 % ya que concentraciones mayores producen la precipitación del soluto y requerirían un solvente más alcalino, con lo que la solución se hace más irritativa y dolorosa para el animal.

Técnica de disección

Se trató de mantener a lo largo de todo el proceso experimental las máximas condiciones de esterilidad para evitar que agentes infecciosos pudieran hacerse presentes (Susó y Segur, 2002) (Segur y col, 2000).

Se escogió la técnica de disección para-patelar para tratar de preservar una buena parte del tejido muscular con la finalidad de ser utilizado en otros proyectos de investigación.

Se practicó la apertura lateral de la cápsula articular de la rodilla para lograr una temperatura más homogénea en las capas más superficiales del cartílago en relación con el exterior de la articulación y a la vez permitir el mejor flujo de soluciones criopreservantes en los casos correspondientes.

Preservación de los injertos osteocondrales

Injerto osteocondral en estado fresco

Una vez aisladas las rodillas de los conejos pertenecientes al primer grupo, fueron sumergidas en solución estéril de NaCl al 0,9 % a temperatura ambiente hasta su traslado al centro donde se encontraba el microscopio electrónico empleado para el estudio. La solución fisiológica evita que se deshidrate el cartílago articular del injerto por su contacto con el aire hasta que se logre examinar e impide los cambios osmóticos bruscos que pueden producir lesión celular al terminar de descongelarse las regiones más profundas de la sustancia intercelular.

Injerto osteocondral congelado

Las condiciones de congelación a 233,15 °K (– 40 °C) en un arcón que empleamos en este estudio con los injertos provenientes de conejo, son las mismas en las que se mantienen en el Banco de Huesos del Hospital Clínico de Barcelona los injertos osteocondrales para su utilización en humanos (Susó y Segur, 2002) (Susó y col, 1997) Con ello se deseaba evaluar esos parámetros para la preservación de tejido condral en futuras investigaciones.

Injerto osteocondral criopreservado

Las condiciones de criopreservación escogidas son las mismas que nuestro grupo de investigación ha utilizado en otras oportunidades para el mantenimiento de tendones y aloinjertos óseos (Segur y col, 1998), hueso homólogo cortical (Fernández de Retana, 1993) y ligamentos cruzados anteriores (Prat, 1992). Al igual que en congelación, se deseaba evaluar esos parámetros como elementos para la preservación de tejido condral en próximas investigaciones.

La solución crioprotectora *

La solución crioprotectora estaba compuesta por:

90 % Solución RPMI sin L-Glutamina

10 % Solución de Albúmina Humana al 20 %

10 % Solución de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 %

* Por su asociación al tema, una ampliación de la discusión sobre la solución crioprotectora se encontrará en la sección correspondiente a las curvas de temperatura (congelación y recalentamiento)

Solución RPMI sin L-Glutamina

Originalmente formulada en el Roswell Park Memorial Institute (de ahí el acrónimo RPMI) con la finalidad de ser utilizada para crear cultivos celulares, se emplea en la criopreservación para suministrar los nutrientes y metabolitos necesarios a los tejidos (Tabla 1). La preferencia por una solución sin L-Glutamina radica en el efecto sobre la presión oncótica que se obtiene con el aminoácido puede obtenerse igualmente con la Albúmina Humana (Arakawa y col, 1990).

Solución de Albúmina Humana al 20 %

La albúmina humana se agrega a la solución crioprotectora para mantener la presión oncótica y reducir la fuga de solutos de la célula a la matriz extracelular y de ahí a la solución criopreservante durante el proceso de descenso de temperatura. Además ejerce, por mecanismos no bien conocidos, una influencia protectora contra la desnaturalización de las proteínas a bajas temperaturas. Aparentemente comparten dichas propiedades otros agentes de la solución criopreservante (Arakawa y col, 1990).

Solución de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 %

El Dimetilsulfóxido (DMSO) (Me_2SO) es un agente crioprotector que tiene la propiedad de penetrar en la célula y sustancia intercelular, produciendo un ambiente propicio para la reducción del contenido de agua a temperaturas lo suficientemente bajas como para disminuir el efecto deletéreo de los solutos concentrados en las células y previniendo *per se* la formación de cristales de

hielo proporcionalmente grandes, que puedan dañar a los organelos intracelulares (Hayat, 1989).

Curvas de congelación y recalentamiento de los injertos mantenidos en congelación o criopreservación

Curva de congelación

A medida que baja la temperatura en el entorno de la célula comienza la formación de hielo. La congelación del agua (solvente biológico por excelencia) genera un aumento paulatino de la concentración de solutos en el medio extracelular, que produce un desequilibrio osmótico. El agua sale por ósmosis y ocurre la deshidratación celular, la cual es adversa a la viabilidad del tejido al momento de su recalentamiento.

La importancia de mantener un proceso cuidadoso en el descenso de la temperatura y del recalentamiento del injerto, tanto en la congelación como en la criopreservación, está en disminuir los efectos deletéreos de la formación del hielo y la deshidratación intracelular.

La primera fase del proceso de criopreservación recibe el nombre de fase de pre-congelamiento o de pre-vitrificación, en la cual el agente crioprotector va penetrando el espécimen. Invariablemente esta fase implica un descenso de la temperatura para ir desacelerando el metabolismo y la probabilidad de cambios hipóxicos e isquémicos, a la vez que disminuye la toxicidad química del agente crioprotector.

Los injertos osteocondrales pueden ser sumergidos directamente en una solución crioprotectora pre-enfriada (273,15 °K a 277,15 °K) y de ahí ser

pasados a una cámara de criopreservación. Otra opción es emplear un equipo de criopreservación donde se pueda regular la tasa de enfriamiento desde las condiciones fisiológicas hasta los 273,15 °K ó 277, 15 °K.

Durante la criopreservación, la solución RPMI permite mantener en las mejores condiciones posibles el entorno celular, suministrando múltiples aminoácidos en un ambiente tampón (buffer). Aunque los medios de cultivo celular convencionales son utilizados comúnmente en criopreservación, se cree que no son las soluciones ideales para exponer células a bajas temperaturas (Taylor, Elrifai y Bailes, 1996). Al respecto tampoco existen evidencias que indiquen que las soluciones para cultivo celulares conformen un entorno negativo para los especímenes que se conservarán a temperaturas inferiores a los 273,15 °K.

En la preservación de tejidos y órganos, los balances hídrico e iónico pueden ser controlados usando soluciones diseñadas físicamente para los desequilibrios de temperatura (Taylor, Elrifai y Bailes, 1996). Estas soluciones se basan en la premisa que reduciendo la temperatura a un punto próximo a la congelación (273,15 °K) se impide la necesidad de mantener un metabolismo en sus condiciones fisiológicas. En este ambiente ideal, la distribución de iones y agua entre los compartimientos intra e intercelular pueden ser mantenidos por medios físicos en lugar de medios metabólicos. Esto es posible porque las bombas de membrana se inactivan a tales temperaturas, y en ausencia de metabolismo las fuerzas de flujo transmembrana de agua e iones pueden ser prevenidos o limitados manipulando el medio extracelular.

Las siguientes fases del proceso de enfriamiento en la criopreservación consisten en llevar la muestra por lo menos hasta los 233,15 °K. Durante esta fase de enfriamiento, hacer que el ambiente del espécimen tenga una

temperatura igual o inferior a la del punto de congelación de la solución crioprotectora, no implica necesariamente la congelación de la pieza, ya que la congelación del tejido dependerá principalmente de tres factores: la tasa de enfriamiento, el tamaño de la pieza, y la presencia de agentes nucleantes, que son partículas ajenas al tejido que catalizan la formación de núcleos de hielo iniciando así la congelación del tejido en si.

La nucleación representa el punto de partida del cambio de estado de líquido a sólido, e implica la separación progresiva del hielo de la solución no congelada, por lo que se produce un aumento de la concentración de ésta a medida que se forme más hielo. Del mismo modo, el inicio de la congelación también está asociado con un cambio de energía (pérdida de calor). El control de la nucleación y la compensación de temperatura durante el proceso de preservación son los factores de relevancia en la viabilidad celular post-preservación.

Las curvas de congelación que se adoptaron en este estudio fueron las programadas en el congelador biológico de tasa controlada (Cryoson ®) del laboratorio de criopreservación de Barnaclínic (Corporació Sanitària Clínic), que se utilizan actualmente dentro del protocolo de la preservación de válvulas cardíacas y otros tejidos vasculares. Las curva de recalentamiento empleadas también se encuentran dentro del mismo protocolo.

Curva de recalentamiento

Del mismo modo que la tasa de enfriamiento, la tasa de recalentamiento puede afectar la viabilidad celular, pero en general desde un punto de vista menos crítico que la tasa de pérdida de calor. Sin embargo, los resultados se

ven determinados por la interacción de algunas variables criobiológicas, así como las condiciones previas de enfriamiento.

En muchos procedimientos de criopreservación la tasa de enfriamiento han sido optimizadas para un rápido recalentamiento, por lo que en esas circunstancias un calentamiento lento disminuye la viabilidad, aunque depende del tipo de tejido. Se cree que esto es debido a que en descongelación lenta, la célula puede verse cargada de solutos (incluyendo el agente crioprotector), lo cual combinado con la baja permeabilidad al agua causa la lisis osmótica. La descongelación lenta da suficiente tiempo a la célula para rehidratarse y perder gradualmente los solutos acumulados.

Toma de la muestra del cartílago

Se tomó una muestra del cartílago hialino con una trefina de 5 m.m. de diámetro, de áreas de carga del cóndilo femoral interno, aplicando movimientos rotatorios. Se prefirió esta técnica para la obtención de tejidos ya que consideramos que la fragmentación empleando hoja de bisturí o algún instrumento similar podría alterar la morfología del espécimen en mayor grado que lo que podría alterarse con la trefina.

Microscopía electrónica

La fijación de muestras de cartílago para microscopía electrónica de barrido empleando técnicas estándares con formaldehído o glutaraldehído causan distorsión importante y encogimiento de los especímenes (Kobayashi y col, 1995). Aunque el agua del tejido es remplazada por otros elementos en la fijación para microscopía de luz y en la microscopía electrónica de transmisión, en la microscopía electrónica de barrido convencional el proceso de fijación

empleando "deshidratación sin sustitución" produce artefactos (Kobayashi y col, 1995). En el presente estudio la superficie articular de varios injertos osteocondrales fueron examinadas sin métodos de fijación físico-químicos empleando un microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA) (ESEM™ ElectroScan 2020 ESEM – FEG).

Gardner y colaboradores (1983) examinaron la superficie articular de cartílago fresco y congelado empleando un microscopio electrónico criogénico de barrido. La ventaja de este método es que permite estudiar tejidos altamente hidratados con menos probabilidad de introducir artefactos que con los métodos convencionales de microscopia electrónica de barrido. Hayat (1989), Bald y Robards (1978), Dempsey y Bullivan (1976) describieron que, a pesar de la alta velocidad a la cual se da el proceso de congelación en un bloque de tejido, en las capas más superficiales ocurre tempranamente la formación de hielo que dificulta la difusión de calor desde las capas más profundas, con lo cual existe la posibilidad de generar distorsiones por cristales. En referencia a esta técnica, se plantean ciertas preguntas como si es posible mantener la hidratación en un tejido en las condiciones de alto vacío en la cámara del microscopio y bajo el rayo de electrones.

Las muestras de nuestro trabajo fueron estudiadas a 276,65 ° K, una aceleración de voltaje de 10 KV ó 20 KV y una presión de cámara de 10 Torr con la finalidad de que fuera mínimo el efecto de deshidratación. Las muestras que fueron congeladas y criopreservadas fueron llevadas a temperatura ambiente en su totalidad antes de ser examinadas con el microscopio, ya que de no esperar el tiempo adecuado, la sección del tejido congelado con la trefina podía producir alteraciones en la superficie.

La fijación de la muestra para examinarla con un microscopio electrónico de barrido convencional radica en la exposición que tendrá el espécimen al vacío de la cámara y al bombardeo de los electrones del haz.

Un microscopio electrónico de barrido convencional (Fig. 40) está constituido principalmente por una columna que contiene los siguientes elementos:

- 1.- Un cañón de electrones con un filamento que actúa como emisor o fuente de iluminación por analogía con un sistema óptico.
- 2.- Un sistema de lentes electromagnéticas encargado de focalizar el haz de electrones producido por el filamento.
- 3.- Un sistema de barrido que hace recorrer el haz de electrones por la superficie de la muestra.
- 4.- Uno o más dispositivos de detección que captan el resultado de la interacción del haz de electrones con la muestra y transformarlo en una señal eléctrica.
- 5.- Una salida conectada a una o varias bombas que producen el vacío necesario para que no exista interferencia de moléculas con los electrones primarios y secundarios.

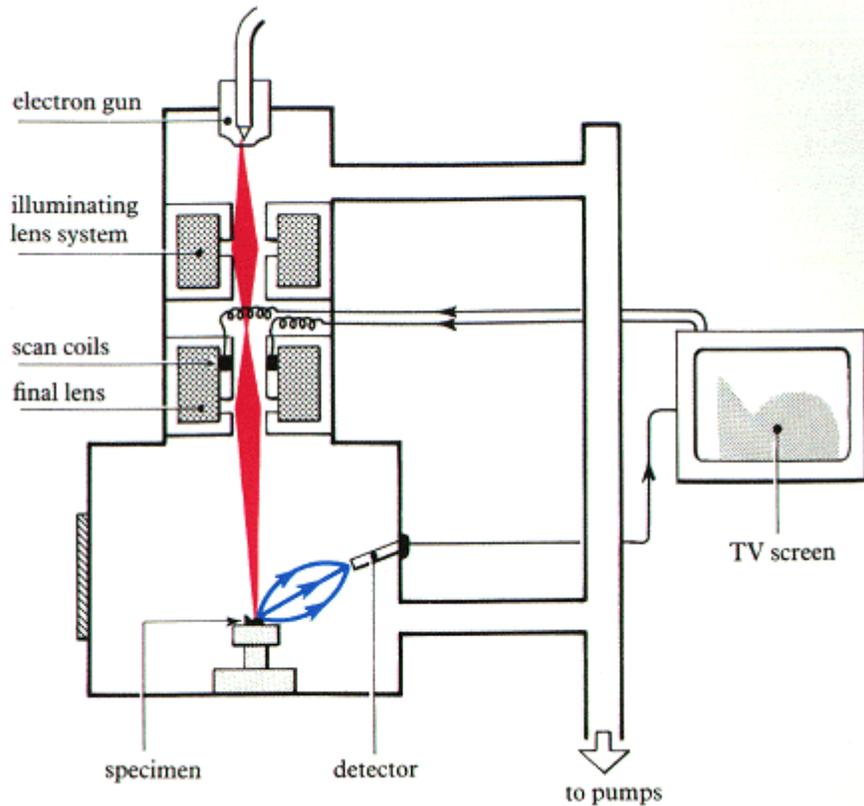


Figura 40: Esquema de un microscopio electrónico de barrido convencional. Disparador de electrones (electron gun), lentes electromagnéticas (illuminating lens system), bobinas de barrido (scan coils), Monitor (TV screen), Espécimen (specimen), Bombas (Pumps). Imagen obtenida de la hoja web del Grupo de Tecnología de la Imagen de la Universidad de Illinois, EEUU).

Además de todos estos elementos, el microscopio posee diversos sistemas que permiten observar las señales eléctricas procedentes de los detectores en forma de imágenes, en un monitor, fotografía, espectro de elementos, etc.

El sistema de barrido, alojado en la lente objetivo, hace mover al haz un número determinado de líneas a lo largo de la superficie barrida, repitiéndose el proceso indefinidamente.

Al incidir el haz de electrones sobre la muestra, se liberan rayos X que pueden permitir un espectro de elementos y lograr así un análisis químico elemental de la muestra.

Cuando chocan los electrones del haz contra la muestra que se desea examinar se liberan electrones del espécimen. Esos electrones se denominan secundarios para diferenciarlos de los electrones provenientes del haz (primarios), y son los que el microscopio emplea para generar la imagen (Fig. 41)

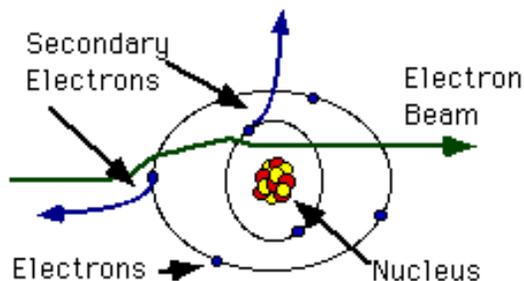


Figura 41: Representación atómica de los electrones que intervienen en la observación al microscopio electrónico de barrido. Electrones secundarios (secondary electrons) que se liberan de la muestra al chocar los electrones del haz (electron beam).

En realidad, cuando el equipo capta electrones no puede distinguir si provienen del mismo espécimen o proceden del haz de electrones primario y han sido retrodispersados por la muestra. Ante esta imposibilidad de distinguirlos, en la práctica se considera un electrón secundario aquel que emerge de la superficie de la muestra con una energía inferior a 50 eV (electronvoltios) y un electrón retrodispersado el que lo hace con una energía mayor.

En la figura 42, se demuestra el espectro de emisión de electrones de una muestra al ser excitada por el bombardeo de un haz primario de energía E_0 . El eje de las ordenadas representa la cantidad de electrones emitidos, y el de

las abscisas la energía de estos electrones detectados que puede llegar hasta la energía del haz incidente en los electrones retrodispersados elásticamente, es decir, que no han perdido energía en su interacción con la muestra.

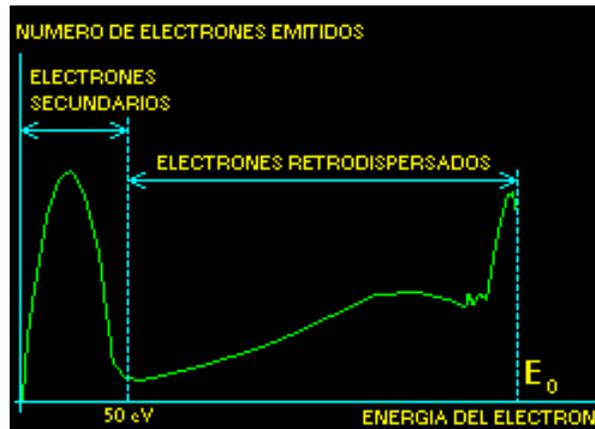


Figura 42: Espectro de emisión de electrones de una muestra al ser excitada por el bombardeo de un haz primario de electrones

Los electrones secundarios van perdiendo energía por diferentes interacciones (por ejemplo con las moléculas de vapor de agua que puede haber en la cámara de muestras del microscopio), de forma que solo los electrones próximos a la superficie tienen probabilidad de escapar del material y llegar al detector. Por lo tanto, la señal de electrones secundarios procede de la misma superficie y de una pequeñísima zona por debajo de ella, de unos pocos nanómetros de grosor.

La ventaja que tiene el MEBA de examinar las muestras directamente sin necesidad de técnicas de fijación, radica en que permite ahorrar un tiempo considerable en la preparación de las muestras sin emplear procesos físico-químicos que pueden inducir artefactos, por lo que teóricamente se aprecia una anatomía más cercana a la realidad. Además, su cámara no requiere de un vacío absoluto con lo cual no hay interferencia a la observación de muestras húmedas.

El MEBA no requiere de preparación previa de las muestras porque aplica un gas entre el detector de electrones y la muestra (vapor de agua, argón o nitrógeno). Este gas se ioniza al colisionar con los electrones secundarios, produciendo un doble efecto. Por una parte amplifica la señal de los electrones secundarios emitidos por la muestra (que son los responsables de producir la imagen) y por otro lado evita que la muestra se cargue electrostáticamente. Mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre el detector y el portamuestras, los iones del gas son atraídos hacia la superficie de la muestra actuando de igual forma que los recubrimientos de oro o carbono utilizados en la microscopía electrónica convencional.

Para prevenir la interferencia atmosférica por la falta de vacío, el MEBA utiliza un detector de electrones secundarios que puede trabajar en atmósferas de vapor de agua de hasta 10 Torr. Además, el diseño del microscopio contempla unos dispositivos llamados Aperturas Limitantes de Presión (PLA por su acrónimo en inglés) que separan zonas diferenciadas de bombeo de vacío creando así un gradiente entre el espécimen y la óptica del microscopio (Fig. 43). Estas aperturas son lo suficientemente amplias como para permitir el paso de los electrones, pero a la vez lo suficientemente estrechas como para no permitir el paso de moléculas de gas de un compartimiento a otro. En cada compartimiento existe un sistema de bombeo para generar el vacío necesario.

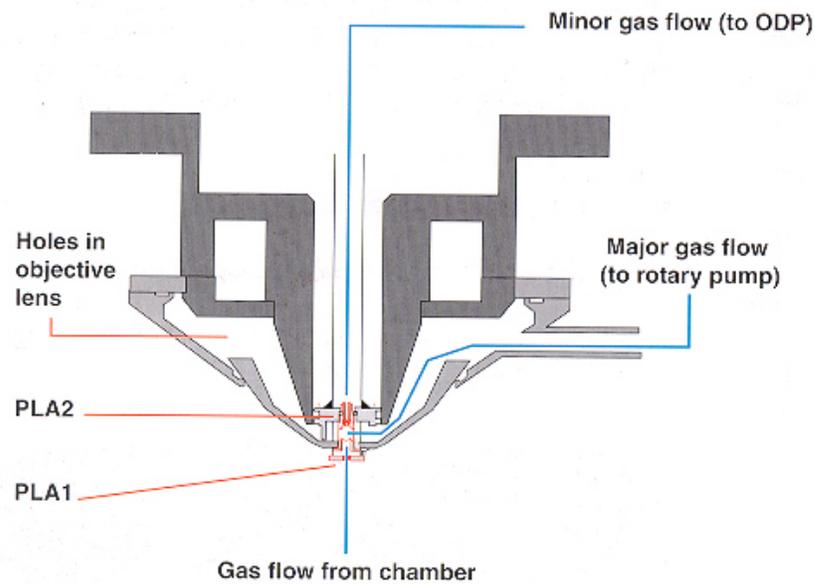


Figura 43: Diagrama esquemático del ensamblaje final de MEBA mostrando dos Aperturas Limitantes de Presión (PLA1, PLA2) y los compartimientos que limitan. (Imagen obtenida del catálogo del ESEM™ ElectroScan 2020 ESEM – FEG)

Si el vapor de agua es utilizado como gas en la cámara de especimen, las muestras húmedas pueden permanecer hidratadas. De hecho, el agua líquida puede mantenerse en equilibrio termodinámico con la fase de vapor. El diagrama de fase del agua (Fig. 44) indica la presión parcial de vapor de agua para estabilizar en agua líquida a una temperatura determinada en la cámara del microscopio.

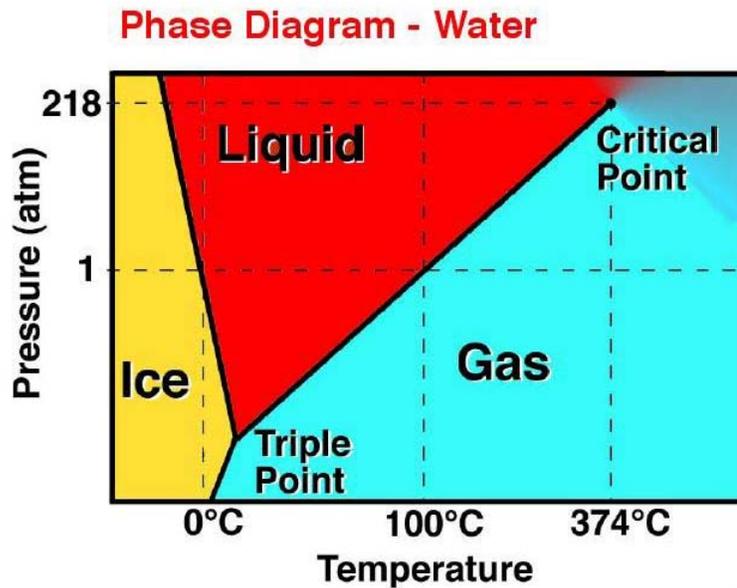


Figura 44: Diagrama de fase del agua (Phase Diagram – Water). Presión atmosférica (Pressure). Temperatura. Hielo (Ice). Líquido (Liquid). Punto Triple (Triple Point). Punto Crítico (Critical Point).

La técnica del MEBA resuelve varias de las limitaciones del microscopio electrónico convencional de barrido donde las muestras deben ser eléctricamente conductoras, compatibles con el vacío y secas. Hay una menor manipulación de la muestra y se disminuye el riesgo de producción de artefactos.

Las imágenes de la superficie articular de injertos osteocondrales en estado fresco sirvieron de control en nuestro estudio, además de constituir una interesante fuente de información, como banco de imágenes, para futuros estudios sobre la superficie articular normal donde se emplee la microscopía electrónica de barrido ambiental y el mismo modelo animal.

Análisis de la variabilidad intra e inter observador

Debido a que existe poco consenso sobre cual es el mejor método matemático para analizar el acuerdo entre observaciones, particularmente cuando se manejan variables categóricas nominales, este tópico suele ser fuente de dudas para el investigador no especializado en estadística.

La finalidad que se persigue con la elaboración de la escala es contar con una herramienta sencilla para poder estimar variaciones en la morfología de la superficie del cartílago articular de injertos osteocondrales de conejos New Zealand, con la posibilidad de elaborar una clasificación similar para seres humanos. Al validar nuestra escala determinamos cuales son sus limitaciones y por lo tanto se puede considerar para que situaciones podría ser aplicada. En ausencia de un patrón oro (gold standard) para la morfología de la superficie articular, se desea estimar la precisión con que los observadores clasificarían una superficie dentro de las categorías que proponemos. De ese modo se puede inferir acerca de la probabilidad de dar una estimación correcta de la imagen basándose en nuestros conceptos.

Los métodos de clasificación de Juverlin (Juverlin y col, 1983) y de Hong y Henderson (1996), no se adaptan a la especie animal con la que deseábamos trabajar, ni a la región anatómica de donde obtuvimos los injertos. Por otra parte, el tipo de microscopio electrónico que utilizaron los creadores de esas escalas no contaba con los avances tecnológicos del equipo que empleamos en nuestra investigación.

Hong y Henderson (1996) critican la presencia de fracturas en la superficie del cartílago articular dentro de la escala de Juverlin y colaboradores (1983), por considerarlas artefactos del proceso de fijación físico-químico para su

observación al microscopio. En nuestras investigaciones, tratamos de profundizar sobre esta posibilidad.

Consideramos que las categorías planteadas en nuestra escala, abarcan los accidentes topográficos más importantes que observamos en la superficie articular del cartílago fresco de los injertos estudiados, y que no plantean discrepancias relevantes entre dos observadores al momento de clasificar la imágenes, por lo que la consideramos una herramienta útil para el estudio de la morfología del cartílago articular bajo condiciones experimentales.

El coeficiente kappa fue propuesto originalmente por Cohen (1960) para evaluar la concordancia que pueden tener dos observadores o dos métodos ante un mismo evento. Como nuestra escala es multicategoría, se debe estimar el grado de concordancia por cada una de las categorías que la integran. Con este propósito, y para simplificar los cálculos matemáticos, fue necesario transformar los resultados en valores dicotómicos donde se concluyera si la imagen en estudio se podía clasificar o no en una determinada la categoría. Por este motivo para cada una de las categorías se crearon tablas de 2 x 2, y se calculó el valor correspondiente del índice kappa (K) como si se tratara de una variable dicotómica.

El amplio uso del índice de concordancia kappa en la literatura médica se debe, en parte, a la facilidad de su cálculo y su clara interpretación; no obstante, como todo estadístico, tiene sus limitaciones. El principal problema de esta medida de concordancia radica en que está pensada para clasificaciones nominales (tal es el caso que nos interesa). En dichas clasificaciones no existe un orden de graduación entre las diferentes categorías, del tipo muy grave – grave – leve – sin importancia, donde no es lo mismo el desacuerdo que se produzca clasificando una variable como “leve” por un observador y “levísimo” por otro, a que uno de ellos la clasifique como

“leve” y otro como “muy grave”. El índice kappa de Cohen que empleamos en nuestros estudios únicamente tiene consideración si hay o no acuerdo, si se clasifica o no la imagen en la misma categoría. Es por ello que no consideramos asignar una ponderación a las diferentes posibilidades de desacuerdo.

Para prevenir o reducir el desacuerdo de los dos observadores seguimos las recomendaciones propuestas por el departamento de epidemiología clínica y bioestadística de la Universidad de Mc Master (Sackett D, 1980; Brian, 1980). Las estrategias seguidas fueron:

1.- Seleccionar un ambiente adecuado para el ejercicio a realizar: Se seleccionó un lugar apropiado en luz, temperatura silencio y privacidad para que los observadores pudieran clasificar las fotografías.

2.- Se les explicó simultáneamente a los dos observadores la escala a ser aplicada y cada una de las categorías. Se respondieron en público cada una de las dudas que pudieron generarse, de modo que cada observador contó exactamente con la misma información que el otro. No se permitió la comunicación entre los observadores.

3.- Los observadores eran “ciegos” al propósito del estudio. Sabían que se trataba de imágenes provenientes de la superficie de cartílago articular con un microscopio electrónico (no se especificó que tipo de microscopio).

4.- Se hizo hincapié en clasificar una imagen basándose en las evidencias y no en inferencias, sin la aplicación de mayores ayudas técnicas más que la observación de las fotografías a simple vista.

Comparación entre los grupos de estudio

Para realizar la comparación entre los grupos de estudio (fresco, congelado y criopreservado) a partir de las variables cualitativas del sistema de clasificación de la superficie de cartílago se empleó el test de Chi-cuadrado de Pearson, con un nivel de significancia $p < 0.05$, ajustada para comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni.

La corrección de Bonferroni se utiliza cuando se deben realizar varias pruebas estadísticas simultáneamente, ya que el valor de alfa (α) puede ser apropiado para un grupo de comparación, pero no para todo el grupo de comparaciones. Por ese motivo el valor de alfa (α) necesita ser ajustado en función del número de comparaciones que se realicen.

En nuestra investigación decidimos adoptar la corrección de Bonferroni que sitúa al valor de p corregido en:

$$p' = 1 - (1 - \alpha)^{1+n}$$

Discusión de los resultados

1º.- Fotografiar con un microscopio electrónico de barrido ambiental la superficie articular de injertos osteocondrales en estado fresco, conservados por congelación y por criopreservación, sin emplear métodos físico-químicos de fijación de la muestra.

Empleando un microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA) realizamos cien fotografías de la superficie articular de injertos osteocondrales en estado fresco, de injertos conservados por congelación a 233,15 °K (-40 °C) durante 15 días, y de injertos conservados por criopreservación a 77,15 °K (-196 °C) durante igual número de días. Ninguno de los especímenes fue expuesto a procesos de fijación química o física que incrementara la probabilidad de artefactos e inducir de este modo falsas observaciones en lo referente a la morfología de la pieza.

Con la microscopía electrónica de barrido convencional, es necesario fijar la muestra previamente a través de métodos de punto crítico y baño de metal conductor (por ejemplo, oro), o bien criofijación. Si la muestra no se fija, al observarla a través del microscopio existe interferencia de la humedad del tejido con el vacío de la cámara y no se logra la imagen (además de que se va alterando la muestra progresivamente por el efecto del rayo de electrones). (Hayat, 1989).

En la revisión de la literatura que se realizó, no se encontró ninguna aplicación anterior del MEBA en el estudio del cartílago (un tejido muy rico en agua), y a pesar de que este equipo tiene entre sus finalidades observar muestras húmedas, no habían evidencias de que fuera un instrumento útil para el fin que le queríamos dar.

Fotografías de los injertos osteocondrales en estado fresco

Las imágenes captadas con el MEBA muestran una superficie articular con muy pocos defectos de relieve consistentes en protuberancias y colinas. Estas últimas tienen una cima de mayor extensión que su altura. También se han observado forámenes ovalados de bordes netos, las cuales corresponden seguramente a lagunas condrocíticas en cuyo interior hay cuerpos ovalados, de superficie lisa, de bordes redondeados que no guardan contacto con las paredes de la laguna, y que podrían tratarse de condrocitos.

Nuestras observaciones nos han permitido constatar que las irregularidades detectadas no son producto de artefactos por técnicas de fijación, ya que no hemos empleado ninguno de estos procedimientos, ni tampoco por técnica de conservación en frío, por lo que consideraremos estas imágenes como un patrón para la comparación de muestras similares sometidas a procesos de conservación.

Igualmente, basado en nuestras imágenes, confirmamos que la superficie articular en estado fresco de los injertos osteocondrales de cóndilo femoral interno de conejo New Zeland, albino, hembra, de 10 a 12 meses de edad, no es completamente lisa.

Las investigaciones de las superficies articulares utilizando microscopía electrónica de barrido convencional han sido criticadas en los ámbitos biológicos y físicos, ya que las preparaciones deben ser deshidratadas antes de ser examinadas en medio del vacío de la cámara de muestras. El material debe ser fijado con formalina o con tetróxido de Osmio frío inmediatamente después de ser tomada la muestra. Seguidamente se debe dejar secar al aire. Como una alternativa, la muestra puede ser criofijada. Una vez deshidratado,

el espécimen es recubierto con una delgada capa de metal eléctricamente conductivo como por ejemplo una aleación de Oro/Paladio para prevenir la carga eléctrica de la superficie durante el bombardeo de electrones. Cada uno de estos pasos preparativos puede inducir artefactos.

Desde el punto de vista biológico, el material examinado no es estrictamente el que mismo que hay in vivo, pues ha sido privado de las condiciones fisiológicas desde el momento de la eutanasia del animal, aunque se ha asumido que por las características de avascularidad del tejido cartilaginoso, los cambios que puedan ocurrir en él no acontecen tan rápidamente.

Otro factor a considerar es la disminución del tiempo de manipulación y procesamiento de las muestras hasta su observación con el MEBA, reduciendo también de este modo la posibilidad de inducir artefactos por estas causas.

En la superficie articular de injertos frescos se observaron en varias oportunidades protuberancias redondeadas y/o alargadas, de superficie lisa, cuyo origen o composición no pudimos dilucidar con el MEBA. Algunos autores también las han reportado utilizando el microscopio electrónico convencional de barrido y han sugerido, entre otras hipótesis, que se deben a la extrusión de material de condrocitos aplanados de la superficie o al colapso de los mismos (Gardner y Mc Gillivray, 1971). Otra hipótesis podría plantearse en base a partir de la constitución de la capa de matriz extracelular suprayacente al condrocito, pues en estudios en cartílago de rata empleando microscopio electrónico de transmisión (Gardner, 1972) se ha observado que ésta es rica en fibras colágenas densamente empaquetadas lo cual, a nuestro juicio, podría influir en la formación de las prominencias observadas, y porqué éstas podrían tener en ocasiones formas alargadas que no corresponden con el modelo de condrocito ovoideo o esférico de la superficie articular.

Las imágenes de pequeños objetos amorfos y blanquecinos en algunos puntos de la superficie podrían corresponder a cristales o depósitos provenientes del líquido sinovial o a fragmentos (debris) óseos que se forman durante la extracción de la muestra con trefina, pero que podrían ser eliminados del campo con el lavado de la muestra con la misma solución fisiológica. Estas partículas sin distribución o tamaño uniforme, fueron publicadas por primera vez en 1980 por Bloebaum y Wilson (1980) empleando microscopia electrónica de barrido convencional para el estudio de la morfología de cartílago de rata. Estos últimos autores concluyen que estas partículas son grandes cristales de líquido sinovial.

Con respecto al uso de la solución fisiológica para transporte del injerto en estado fresco, consideramos que es importante para evitar los efectos de la deshidratación de la muestra por la humedad del ambiente o de aire corriente a su alrededor. También nos sirvió para limpiar la superficie del disco osteocondral una vez tomada la muestra del injerto.

Como se ha mencionado con anterioridad, las muestras de injertos osteocondrales en estado fresco fueron obtenidas de zonas de carga de la articulación de la rodilla del conejo New Zealand. Por lo tanto, sería interesante evaluar si la superficie articular de injertos en estado fresco de zonas que no sean de carga, presentan las mismas características morfológicas que las que hemos observado, y si estas influyen o no en la biomecánica del injerto.

La presencia de fracturas en la superficie articular fue muy poco frecuente en los injertos en estado fresco. Esta situación contrasta con las observaciones de Juverlin y colaboradores (1983). Posiblemente existan varias causas en la producción de fracturas. La primera es la manipulación de la muestra, ya que según el instrumento de corte y la técnica que se emplee para la sección del

tejido pueden producirse deformaciones que lleven a la pérdida de continuidad de la superficie. La segunda fuente podría consistir en la exposición de condiciones físico-químicas (deshidratación, punto crítico, etc), que son importantes para la observación al microscopio electrónico convencional. Como en nuestras investigaciones no empleamos este tipo de procedimientos, ésta podría ser la explicación de porqué hemos observado menos frecuentemente las fracturas que Juverlin y colaboradores.

Hong y Henderson (1996), Juverlin y colaboradores (1983) describieron superficies con predominancia fibrosa que no observamos en nuestra investigación. Consideramos que está justificado por diversos motivos: el uso de un microscopio electrónico distinto, tejidos cartilagosos de distintos animales y de distintas áreas anatómicas, posiblemente entre otros.

Injertos congelados

Las imágenes de la superficie de injertos frescos preservados por congelación fueron particularmente interesantes al ser comparadas con aquellas derivadas de los injertos en estado fresco.

Observamos un aumento de los accidentes topográficos tanto en cantidad como en calidad. Hay una mayor proporción de irregularidades (colinas y protuberancias) en relación a la superficie fotografiada. No necesariamente coinciden ambos accidentes en una misma región. Es particularmente difícil correlacionar la aparición de estas diferencias con algún factor en específico, porque posiblemente sea multifactorial. Una de las condiciones que cobra gran importancia es la deshidratación que sufre el tejido al ser expuesto a bajas temperaturas en ambientes secos (caso de la congelación). Inclusive,

debido a factores osmóticos, puede haber alguna deshidratación celular aunque el tejido se encuentre inmerso en solución criopreservante.

En algunas áreas de la superficie, las protuberancias eran más grandes y frecuentes que las que habíamos observado en estado fresco. Nuevamente nos inclinamos a pensar que estas protuberancias podrían estar justificadas por la protusión de material a partir de condrocitos subyacentes, quizás exacerbado por las distintas noxas a las que se sometió el tejido.

En la superficie se observaron muchos forámenes ovalados que podrían corresponder a lagunas condrocíticas. Sin embargo, llamaba mucho la atención que no era posible detectar los cuerpos ovalados que habíamos identificado como condrocitos en los injertos frescos. Quizás esto sea motivado a un proceso de muerte celular debido al estrés osmótico, al frío, o a varios factores simultáneamente. Las imágenes de forámenes vacíos coinciden con las descripciones que realizaron Gardner y McGillivray (1971) en superficie de cartílago fresco observadas con microscopía electrónica de barrido. Estos forámenes, tal y como planteaban los mismos autores, podrían haber sido producto de lagunas que alojaron condrocitos que desaparecieron durante el proceso de fijación para la microscopía electrónica convencional.

Observamos en este grupo de injertos congelados las partículas amorfas y blanquecinas que aparecían en la superficie de las muestras en estado fresco, y que en apariencia corresponden con fragmentos óseos producto del corte con trefina o a la cristalización de elementos del líquido sinovial.

Las fracturas también se dieron cita en esta oportunidad en la superficie de los injertos congelados. Como es de suponer, la dilatación de líquidos tisulares en el proceso de congelación y el regreso a su estado natural en el

recalentamiento, son factores importantes en la generación de las disrupciones de superficie.

Es de destacar que tampoco en este grupo de injertos se observaron superficies fibrosas como las mencionadas por Hong y Henderson (1996) y Juverlin y colaboradores (1983).

Nuestros estudios de la superficie de injertos osteocondrales congelados son los primeros en el campo de la criobiología en mostrar imágenes cuyas diferencias con la superficie de injertos en estado fresco no pueden ser atribuidas a los métodos de fijación físico-químicos que se requieren en la microscopia electrónica de barrido convencional; esto gracias a la tecnología del MEBA.

Injerto criopreservados

Muchas de las imágenes de la superficie de los injertos que fueron criopreservados, recordaban la apariencia de la superficie en estado fresco. Las colinas y las protuberancias seguían presentes, aunque en modo más discreto que en los injertos congelados. Algunas lagunas condrocíticas que se detectaron aparentaban estar ocupadas por cuerpos ovoideos con aspecto de condrocito, aunque con algunas diferencias. Algunos de estos presentaban moteados y punteados oscuros que parecen indicar la integridad de la membrana celular ha sido vulnerada después del proceso de conservación.

El papel que juega la membrana celular en la viabilidad post-criopreservación del condrocito es muy importante. Durante el estrés osmótico del recalentamiento del cartílago, la membrana celular debe permitir un flujo de líquidos y electrolitos a una velocidad adecuada para que no se produzca la

muerte celular. Algunos agentes crioprotectores como el DMSO aumentan la permeabilidad de la membrana celular por mecanismos que todavía no están claramente establecidos, reduciendo así el daño durante el estrés osmótico.

Estas observaciones sobre la morfología del condrocito son la que nos hacen sospechar que el protocolo de criopreservación que se empleó en nuestros estudios podría ser adaptado para conseguir condrocitos que morfológicamente sean más próximos al estado fresco.

Por otra parte, también se detectaron algunas regiones de la superficie articular de los injertos criopreservados que se asemejaban más a una superficie congelada, pues en ella nos encontramos con mayores irregularidades tanto en colinas como en protuberancias e incluso con lagunas condrocíticas vacías.

Estas observaciones las explicamos de distintos modos: 1º.- Considerando la posibilidad de que el efecto deletéreo del frío en algunas áreas del injerto no haya podido ser contrareestado por la solución criopreservante, por una formulación subóptima en la misma (ya se ha mencionado que originalmente es una composición que no está específicamente diseñada para la preservación de cartílago sino para la preservación de tejido vascular y cardíaco), o bien por las mismas limitaciones del proceso de criopreservación, que se aleja de ser el método de conservación ideal desde el punto de vista morfológico y biológico. 2º.- Exposición insuficiente de la superficie articular del injerto a todos los componentes de la solución criopreservante, quizás por la ubicación del injerto en la bolsa de criopreservación o la presencia de otros factores que no han sido ponderados como sedimentación de solutos, etc. 3º.- Alteraciones propias de la superficie articular independientes del proceso de criopreservación. Desde luego, la combinación de todos estos factores y,

seguramente algún otro desconocido hasta ahora, pueden ser la respuesta a este planteamiento.

Sería de utilidad complementar los estudios observacionales realizados con el MEBA con técnicas que permitieran determinar bioquímicamente la viabilidad del tejido estudiado, en particular en lo referente al metabolismo del condrocito, y también en lo referente a las propiedades biomecánicas del tejido ya que, después de todo, el fin último de todo este procedimiento es mantener en el tiempo las condiciones biomecánicas de un tejido cartilaginoso una vez implantado en el paciente.

Hay muchos factores que afectan la conservación del tejido cartilaginoso por criopreservación. La congelación, el recalentamiento, y las propiedades de las soluciones crioprotectoras influyen notoriamente en las características que presentarán los tejidos después del proceso.

El estudio de todos estos factores se reconoce como empírica, tal y como es la criobiología actual. Los distintos mecanismos de acción de los agentes crioprotectores comúnmente utilizados varían según las células y los tejidos que se deseen preservar. Las imágenes obtenidas en nuestra investigación demuestran que en al menos en las regiones estudiadas de las superficies articulares de los injertos, nuestro protocolo de criopreservación aparenta ser de mayor utilidad que la conservación de los injertos por congelación en el mantenimiento de la morfología del espécimen. Sin embargo, consideramos que pueden haber protocolos de criopreservación que se adapten mejor a las características del tejido que deseamos almacenar, ya que como se mencionó anteriormente los pasos seguidos son los mismos que hoy en día se aplican en nuestro laboratorio para la conservación de tejido vascular y cardíaco. A pesar de ello, podría constituir una alternativa superior a la congelación seca de los

injertos, hasta no diseñar un procedimiento de criopreservación que mejore al empleado en este estudio.

Como mencionamos en el estudio de los injertos en estado congelado, nuestros experimentos son los primeros en el campo de la criobiología en emplear un MEBA para el estudio de la superficie articular de los injertos criopreservados, sin ninguna técnica de fijación físico-química.

2º.- Diseñar un sistema de clasificación de los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, empleando fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental y validando dicho sistema por variabilidad intra e interobservador.

La diversidad de accidentes topográficos en la superficie del cartílago articular ha hecho históricamente que sus descripciones morfológicas sean controversiales, aún en estado fresco y con instrumentos de alta tecnología (Kobayashi y col, 1995).

El propósito de crear una escala propia para hacer menos subjetiva las descripción y comparación de los cambios de la superficie del cartílago durante su conservación, responde a la necesidad de disponer de una herramienta que permita al observador reconocer eventos morfológicos que puedan advertir de un futuro comportamiento indeseable del injerto una vez implantado en el paciente o animal de experimentación.

Al diseñar nuestra propia escala buscamos un patrón de referencia para ésta y otras investigaciones futuras. Para ello será necesario validarla, es decir, conocer sus limitaciones, lo que realizaremos determinando estadísticamente la variabilidad inter e intraobservador que existe al aplicarla, empleando el

estadístico llamado "índice kappa de Cohen" para variables cualitativas (Cohen, 1960).

La constitución de la escala definitiva estuvo basada en las experiencias de otros investigadores (Juverlin y col, 1983; Hong y Henderson, 1996) que han tratado temas similares y cuyas experiencias las consideramos de gran valor para la prosecución de nuestros objetivos.

La importancia de la escala que planteamos está en que proponemos categorías de aspectos morfológicos que tenemos la seguridad de que no surgen como artefactos de proceso de fijación, de modo que nos aproximamos más a la superficie verdadera que si se empleara el microscopio electrónico de barrido convencional.

En 1996 Hong y Henderson plantearon que algunas de las categorías de la escala de Juverlin y col. (1983) estaban viciadas de nulidad por que ellos consideraban que eran artefactos (por ejemplo, las fracturas de la superficie).

Las fracturas en la superficie del injerto pueden ser producto del proceso de conservación, pero al haberlas observado en algunas muestras de tejido en estado fresco, esto nos lleva a pensar en la posibilidad que la forma de obtención del espécimen podría producirlas.

Escala para la superficie del cartílago (Cartilage Surface Scale). Escala CSS

Para determinar el diseño y validez de una escala para clasificar los accidentes morfológicos de la superficie de los injertos osteocondrales, nos valimos de las fotografías obtenidas del grupo control de nuestro experimentos, que corresponden a los injertos en estado fresco.

Se describieron tres grandes categorías, denominadas:

- A.- Relieve de superficie
- B.- Hendiduras de superficie
- C.- Lagunas

A.- Relieve de superficie (Evenness of surface)

Esta categoría se subdivide según los accidentes topográficos más frecuentes y de más fácil identificación que reconocimos en las fotografías estudiadas en relieve liso o irregular. Dentro de esta última subcategoría incluimos las colinas y las protuberancias.

A.1.- Superficie lisa (Even surface)

Esta categoría se refiere a la calidad del relieve de la superficie. De la muestra analizada, el primer observador consideró que el 71 % de las fotografías mostraba una superficie lisa y el segundo observador consideró que solo el 62 % de las fotografías pertenecían a esta categoría. El índice kappa para la variabilidad intraobservador presentó una fuerza de concordancia muy buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,9067$; $DE=\pm 0,0457$; IC 95 %= $0,8171$ a $0,9963$), y en la variabilidad interobservador una fuerza buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,7998$; $DE= \pm 0,0637$; IC 95 %= $0,8717$ a $0,9554$). La discrepancia entre los índices kappa (intra-inter observador) pudo haber sido motivada a la subjetividad al momento de clasificar aquellas superficies que presentaban relieves muy pequeños o discretas irregularidades que se prestaron a confusión.

A.2.- Superficie irregular (Uneven surface)

A.2.1.- Superficie con colinas (Hillocky surface)

Esta categoría se refiere a la calidad del relieve de la superficie. En contraposición a la categoría de superficie lisa, la categoría de superficie irregular trata de abarcar aquellas imperfecciones que, en general, se traten de colinas o protuberancias.

Una superficie puede presentar simultáneamente colinas o protuberancias, es decir, no son mutuamente excluyentes. Tal y como se mencionó con antelación, la presencia de hendiduras (fracturas) o de lagunas no define a una superficie como irregular.

De las fotografías estudiadas, los observadores consideraron que entre el 17 % y el 22 % de las fotografías realizadas podían ser clasificadas dentro de esta categoría. El índice kappa para la variabilidad intraobservador presentó una fuerza de concordancia muy buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,9323$; $DE=\pm 0,0474$; IC 95 % = 0,8394 a 1,000), y en la variabilidad interobservador una fuerza buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,7145$; $DE=\pm 0,0908$; IC 95 % = 0,5365 a 0,8924). Creemos que las discrepancias pudieron haber estado dadas por las superficies con relieves muy pequeños o con discretas irregularidades de confusa clasificación. Basándonos en estos resultados podemos señalar que la superficie del cartílago fresco observada, aunque presenta colinas en un 17% a 22 %, no es de topografía muy lominhiesta.

A.2.2.- Superficie con protuberancias (Knobby surface)

Esta categoría se refiere a la calidad del relieve de la superficie. De las fotografías estudiadas, los observadores consideraron que entre el 12 % y el 16 % de las fotografías realizadas podían ser clasificadas dentro de esta categoría. El índice kappa para la variabilidad intraobservador presentó una fuerza de concordancia muy buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,9117$; $DE= \pm 0,0618$; $IC\ 95\ \% = 0,7905$ a $1,000$), y en la variabilidad interobservador una fuerza buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,7517$; $DE= \pm 0,0983$; $IC\ 95\ \% = 0,5590$ a $0,9443$). Las discrepancias en esta categoría pudieron haber estado dadas por considerar como protuberancias a algunas de las partículas (debris) óseas, por su ocasional similitud con el evento topográfico.

B.- Hendiduras de superficie

B.1. - Superficie sin hendiduras

De las fotografías estudiadas, los observadores consideraron que entre el 92 % y el 95 % de las imágenes podían ser clasificadas dentro de esta categoría. El índice kappa para la variabilidad intraobservador presentó una fuerza de concordancia buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,6787$; $DE= \pm 0,1401$; $IC\ 95\ \% = 0,4041$ a $0,9532$), y en la variabilidad interobservador una fuerza moderada (Landis y Koch, 1977) ($k=0,4262$; $DE= \pm 0,2091$; $IC\ 95\ \% = 0,0163$ a $0,8361$). Estas observaciones refuerzan nuestros planteamientos de los efectos artefactantes del proceso de fijación físico-químicos, y concuerdan con las observaciones de Hong y Henderson (1996) con respecto a que las hendiduras en la superficie cartilaginosa son atípicas y probablemente originadas artificialmente en algunos casos, durante la manipulación de la muestra. En nuestra opinión deben ser tomados en cuenta por poder

constituirse en lesiones que puedan llevar al fracaso del injerto osteocondral una vez implantado en pacientes o animales de experimentación.

B.2.- Superficie con hendiduras superficiales

De las fotografías estudiadas, los observadores consideraron que entre el 4 % y el 7 % de las fotografías realizadas podían ser clasificadas dentro de esta categoría. El índice kappa para la variabilidad intraobservador presentó una fuerza de concordancia buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,7839$; $DE= \pm 0,1229$; IC 95 % = 0,5430 a 1,000), y en la variabilidad interobservador una fuerza buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,7126$; $DE= \pm 0,1634$; IC 95 % = 0,3924 a 1,000). Contemplamos que el principal motivo de la fuerte concordancia de esta categoría, es la es la baja prevalencia del evento topográfico en las imágenes (menos del 10 % de las fotografías analizadas). Atribuimos la presencia de hendiduras superficiales a múltiples factores tales como fenómenos topográficos poco frecuentes propios de la superficie cartilaginosa o a una inadecuada manipulación de la muestra al momento de la extracción del espécimen, por ser esta de gran dificultad.

B.3.- Superficie con hendiduras profundas

De las fotografías estudiadas, los observadores coincidieron que el 1 % de las fotografías realizadas podían ser clasificadas dentro de esta categoría. El índice kappa para la variabilidad inter e intraobservador presentó por lo tanto una fuerza de concordancia muy buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,9117$; $DE= \pm 0,0618$; IC 95 % = 0,7905 a 1,000). Contemplamos que el principal motivo de la fuerte concordancia de esta categoría, es la baja prevalencia de la variable en las imágenes (menos del 10 % de las fotografías analizadas).

Atribuimos la presencia de hendiduras profunda a una inadecuada manipulación de la muestra en el momento de la extracción del espécimen, por ser esta de gran dificultad, pero que puede influir negativamente en las funciones a mediano y largo plazo del implante.

Consideramos de interés establecer las categorías de hendidura superficial y profunda por ser aspectos que pueden ser observados en la superficie cartilaginosa en estado fresco, y no necesariamente como producto del proceso de fijación físico-químico en microscopia electrónica convencional. Por las características morfológicas de las hendiduras decidimos rescatar esta categoría planteada en 1983 por Juverlin (1983), aunque planteando una connotación de accidente topográfico menor y poco frecuente.

C.- Lagunas

C.1.- Superficie sin lagunas

De las fotografías estudiadas, los observadores consideraron que las imágenes podían ser clasificadas dentro de esta categoría entre 78 % y 82 % de los casos. El índice kappa para la variabilidad intraobservador presentó una fuerza de concordancia muy buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,9398$; $DE= \pm 0,0422$; IC 95 % = 0,8571 a 1), y en la variabilidad interobservador una fuerza buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,7506$; $DE= \pm 0,0846$; IC 95 % = 0,5849 a 0,9164). La alta prevalencia de este aspecto concuerda con las descripciones histológicas tradicionales del cartílago articular en estado fresco. Es de resaltar que la capa superficial del cartílago articular no es por excelencia la zona del tejido donde se encuentra la mayor celularidad.

C.2.- Superficie con lagunas llenas

De las fotografías estudiadas, los observadores consideraron que entre 17 % y el 20 % de las imágenes podían ser clasificadas dentro de esta categoría. El índice kappa para la variabilidad intraobservador presentó una fuerza de concordancia muy buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,9351$; $DE= \pm 0,0455$; IC 95 % = 0,8460 a 1), y en la variabilidad interobservador una fuerza buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,7020$; $DE= \pm 0,0948$; IC 95 % = 0,5163 a 0,8877). El contenido de las lagunas se refería principalmente a cuerpos de superficie esférica u ovalada lisa, bien definidos, y en ningún caso a otros cuerpos como las partículas óseas en el caso hipotético de que existieran.

C.3.- Superficie con lagunas vacías

De las fotografías estudiadas, los observadores consideraron que entre el 1 % y el 2 % de las imágenes podían ser clasificadas dentro de esta categoría. El índice kappa para la variabilidad intraobservador presentó una fuerza de concordancia muy buena (Landis y Koch, 1977) ($k=1$; $DE= \pm 0,00$; IC 95 % = 1 a 1), y en la variabilidad interobservador una fuerza buena (Landis y Koch, 1977) ($k=0,6622$; $DE= \pm 0,3361$; IC 95 % = 0,033 a 1). La baja prevalencia de este accidente morfológico y la sencillez de su reconocimiento podrían ser las explicaciones de la muy buena concordancia en la variabilidad intraobservador. Debido a la metodología que seguimos, atribuimos que la presencia eventual de lagunas que fueron identificadas como vacías, se podía deber a limitaciones de la técnica de microscopía que no permite realizar incursiones visuales dentro de la laguna, o bien a verdaderas lagunas vacías que por algún proceso fisiológico llevó a la desaparición del contenido.

3º.- Emplear un sistema de clasificación validado para comparar los principales aspectos morfológicos de la superficie articular de injertos osteocondrales frescos, con los de injertos que han sido almacenados por congelación y por criopreservación, a partir de fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental.

A.1.- Superficie lisa (Even surface)

En el caso de la comparación del grupo de injertos frescos *versus* congelados, las pruebas estadísticas rechazan la hipótesis nula, por lo que se acepta que las diferencias existentes no son debidas al azar. Estos resultados pueden ser interpretados como que la congelación efectivamente produce cambios en la superficie del cartílago que la hacen distinta a la superficie lisa del estado fresco. En la comparación de los grupos fresco *versus* criopreservado, nuevamente observamos que la distribución alcanzó significancia estadística, por lo que la criopreservación igualmente introdujo cambios en la superficie del cartílago fresco. Al comparar los grupos tratados con congelación y criopreservación, encontramos que igualmente se rechaza la hipótesis nula y la frecuencia de observancia de superficie no pueden ser explicadas totalmente por efectos del azar. A partir de estos resultados concluimos que la congelación y la criopreservación introducen cambios en la superficie lisa del injerto osteocondral fresco.

A.2.- Superficie irregular (Uneven surface)

A.2.1.- Superficie irregular con colinas (Hillocky surface)

Al comparar esta categoría en grupos de injertos fresco y congelado, la distribución resulta significativa, por lo que parece que el azar no puede explicar totalmente las diferencias. Lo mismo ocurre al establecer la comparación del grupo congelado con el criopreservado. Al cotejar el grupo fresco con el criopreservado, encontramos que las diferencias no son estadísticamente significativas. Por estos motivos, concluimos que la preservación por congelación introduce un aumento en el número de colinas de la superficie articular fresca. Este aspecto morfológico no varía significativamente desde el punto de vista estadístico al comparar los injertos frescos con los criopreservados.

Pensamos que las colinas descritas en nuestra escala, corresponden a elevaciones que realizan las fibras colágenas empaquetadas en las capa más externas del tejido cartilaginoso que sobresalen por una ubicación más superficial de las mismas (lo que explicaría su presencia en los injertos en estado fresco), o bien por efecto de la pérdida de volumen del tejido producto de la exposición del injerto a un ambiente de bajas temperaturas y de baja humedad (por almacenamiento en congelación). El efecto de la pérdida de volumen por escasa humedad queda contrareestado en parte por la solución criopreservante, pero el efecto osmótico de los solutos podría contribuir negativamente en este sentido, lo que podría justificar las colinas en injertos criopreservados.

A.2.- Superficie irregular (Uneven surface)

A.2.1.- Superficie irregular con protuberancias (Knobby surface)

Al relacionar las características de la superficie articular en esta categoría, observamos que existen diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones de grupos fresco *versus* congelado, y fresco *versus* criopreservado, pero no así en la comparación de congelado con criopreservado. Al exponer el injerto fresco a la criopreservación o a la congelación se produce un aumento estadísticamente significativo en las protuberancias de superficie, pero no es significativo entre los grupos congelado y criopreservado.

Creemos que en este caso ocurre un fenómeno similar al descrito para la categoría anterior, pero en lugar de intervenir las fibras colágenas densamente empaquetadas, las prominencias observadas son producidas por los condrocitos que se encuentran en la capa más superficial del tejido.

B.- Hendiduras de superficie (Surface splits)

B.1.- Superficie sin hendiduras (No-splits)

Ninguna de las comparaciones establecidas para esta categoría entre los grupos experimentales presentaron cambios estadísticamente significativos. Esto nos hace pensar que, según nuestros estudios, ni la congelación ni la criopreservación son factores que produzcan *per se* hendiduras en la superficie articular fresca, por lo tanto no son eventos morfológicos que sirvan como indicador para valorar los procedimientos de conservación experimentados en este trabajo. Es probable que esta categoría tenga utilidad en la valoración del procedimiento de extracción y manipulación posterior de la

muestra, por lo que planteamos que este accidente topográfico podría ser objeto de otros estudios, descartando su génesis como artefacto de procesos de fijación físico-química en microscopia electrónica.

B.2.- Hendidura superficial (Superficial splits)

Al igual que en la categoría anterior, las distribuciones en todas las comparaciones resultaron ser estadísticamente no significativas. También concluimos que las hendiduras superficiales no son hechos que pueden estar relacionados con los procedimientos de preservación estudiados.

B.3.- Hendidura profunda (Deep split)

Así como ocurrió en las dos categorías anteriores, la distribución de frecuencias en los tres grupos estudiados tampoco mostraron diferencias significativas. Reiteramos nuestro planteamiento de producción de las fracturas en la superficie por efectos distintos al proceso de criopreservación o congelación, tales como la obtención y manipulación de la muestra.

C.- Lagunas (Lacunae)

C.1.- Superficie sin lagunas (No-lacunae)

Las relaciones entre las características de la superficie articular de los injertos de los distintos grupos, en función de la ausencia de lagunas, mostraron ser estadísticamente no significativas en los casos de comparación de fresco con congelado y con criopreservado. Sin embargo, la distribución si mostró diferencias significativas en la comparación entre el grupo de injertos congelados con el criopreservado. Este último resultado nos llamó la atención

ya que los procesos de preservación estudiados no influyen directamente en el número de lagunas. Es por este motivo que creemos que por el aumento de las irregularidades de la superficie del cartílago en el momento de la congelación (demostrado anteriormente), las imágenes obtenidas dificultan al observador discernir entre algunas depresiones y forámenes compatibles con lagunas condrocíticas, por lo que estas podrían pasar desapercibidas.

C.2.- Lagunas llenas (Filled lacunae)

Al analizar la presencia de condrocitos dentro de las lagunas, observamos que es estadísticamente significativa la diferencia que hay entre los grupos de injertos frescos y congelados y congelado con criopreservado. En las imágenes de la superficie articular después de la congelación, no se observaron lagunas ocupadas, lo cual puede estar vinculado a un proceso de muerte celular por efecto de las condiciones adversas del medio externo. Cuando comparamos el grupo de estado fresco con criopreservado, la distribución mostró ser no significativa. En referencia a esta última observación, es de hacer notar que el hecho de que no se observen diferencias estadísticamente significativas entre el número de lagunas llenas del grupo criopreservado y fresco, no implica que los condrocitos en el cartílago criopreservado tengan la misma capacidad metabólica en este último conjunto. En algunas fotografías fue posible observar que la superficie del condrocito del tejido que había sido criopreservado presentaba imágenes que hacían pensar que la membrana había sido afectada en alguna de las fases del proceso, de ahí nuestras sospechas sobre el compromiso de las reacciones metabólicas de la célula, por lo que sugiere estudios que amplíen estas observaciones.

C.3.- Lagunas vacías (Empty lacunae)

Se observaron diferencias significativas en las comparaciones entre el grupo de injertos congelado y criopreservado con el grupo de injertos en estado fresco. En cualquiera de los procesos experimentales se produjo un aumento en el número de lagunas vacías, aunque estadísticamente no significativo al comparar el grupo congelado con el criopreservado. A pesar de que se exponga el tejido osteocondral a un proceso de criopreservación, como el empleado por nosotros, se produce la desaparición de los condrocitos, probablemente por efecto de las bajas temperaturas y por el mismo mecanismo que induce la desaparición en el caso de la congelación, lo que demuestra que el proceso de criopreservación que hemos experimentado no es totalmente efectivo para mantener el número de células que existe en el estado fresco.

Conclusiones

- 1º.- **El microscopio electrónico de barrido ambiental es una herramienta útil que permite realizar estudios fotográficos de muestras de la superficie de injertos osteocondrales en estado fresco, conservados por congelación y por criopreservación,** sin la necesidad de emplear métodos físico-químicos de fijación del espécimen, ni exponerlo a condiciones de vacío absoluto en la cámara de muestras.

- 2º.- Las fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido ambiental pueden ser almacenadas electrónicamente constituyendo así un **banco informatizado de imágenes** para futuras investigaciones de la superficie del cartílago que empleen el mismo modelo animal y la misma metodología utilizados en este estudio.

- 3º.- La superficie articular de los injertos osteocondrales frescos no es totalmente lisa, hallándose en ella diversos aspectos que pueden clasificarse en un sistema cualitativo para su reconocimiento y para la detección de cambios en situaciones experimentales o patológicas, **conformando un patrón de referencia para la valoración de biopsias de este tipo de tejidos.**

- 4º.- **El sistema de categorías cualitativas propuesto en nuestra investigación es válido y brinda valores de concordancia aceptables para realizar estudios de cambios en la superficie articular,** empleando el mismo modelo animal que en nuestro estudio.

- 5^o.- **La superficie articular del injerto osteocondral conservado por congelación, presenta cambios consistentes en un aumento de colinas y protuberancias al compararlos con los injertos frescos y criopreservados, así como un mayor número de lagunas condrocíticas vacías.**
- 6.- **La superficie articular del injerto osteocondral almacenado por criopreservación, muestra un aumento de colinas y protuberancias al compararlos con los injertos frescos. El aspecto de los condrocitos observados en el tejido criopreservado difiere del tejido fresco en algunas oportunidades, mostrando imágenes de posible lesión en su membrana o lagunas vacías.**

Referencias

- 1.- **Arakawa T, Carpenter J, Kita Y, Crowe J.** The basis for toxicity of certain cryoprotectants. *Cryobiology*. 1990, 27: 401-415
- 2.- **Aubin PP, Chaeh HK, Davis AM, Gross AE.** Long-term follow-up of fresh femoral osteochondral allografts for posttraumatic knee defects. *Clin Orthop* 2001, 10: S318-27
- 3.- **Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE.** Heterogeneity of articular chondrocytes, en Articular Cartilage and Osteoarthritis. New York. 1992, 237-49
- 4.- **Bailey, N.** Statistical methods in biology. Hodder and Stoughton, Second edition. London. 1981, 56-89
- 5.- **Bakay A, Csonge L, Papp G, Fekete L.** Osteochondral resurfacing of the knee joint with allografts. Clinical analisis of 33 cases. *Int Orthop*. 1998, 22, 277-81
- 6.- **Bald W, Robards A.** A device for the rapid freezing of biological specimens under precisely controlled and reproductable conditions. *J Microscopy*. 1978, 112: 3-15
- 7.- **Baron J, Klein KO, Yanovski JA, Novosad JA, Bacher JD, Bolander ME, Cutler GB Jr.** Induction of growth plate cartilage ossification by basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*. 1994, 135, 2790-3
- 8.- **Bauer M, Jackson RW.** Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classifications. *Arthroscopy*. 1988, 4: 97-102
- 9.- **Bayne O, Langer F, Pritzker K, Houpt J, Gross A.** Osteochondral allografts in the treatment of osteonecrosis of the knee. *Orthopedic Clinics of North America*. 1985, 16: 727-40
- 10.- **Benedetti M, Levi A, Chao MV.** Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and nerutrophin responiveness. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90: 7859-63
- 11.- **Bentley G, Minas T.** Treating joint damage in young people. *BMJ*, 2000, 320: 1585-8
- 12.- **Black J, Shadle C, Parsons J, Brighton C.** Articular cartilage preservation and storage. II. Mechanical identation testing of viable, stored articular cartilage. *Arthritis & Rheumatism*. 1979, 22: 1102-8

- 13.- **Bloebaum R, Wilson A.** The morphology of the surface of articular cartilage in adult rats. *J Anat.* 1980. 131: 333-46
- 14.- **Bonner WM, jonsson H, Malanos C, Bryant M.** Changes in the lipids of human articular cartilage with age. *Arthritis Rheum,* 1975; 18: 461-73
- 15.- **Brian R.** Clinical disagreement: II. How to avoid it and how to learn from one's mistakes. *CMA Journal.* 1980, 123: 613-617
- 16.- **Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A et al.** Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop.* 1996, 326: 270-283
- 17.- **Brockbank K et al.** Measurement of postcryopreservation viability. *Am J of Phys.* 1987, S1: 143-57
- 18.- **Buckwalter JA, Rosenberg LC.** Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans: Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit core protein. *J Biol Chem.* 1982, 257: 9830-9
- 19.- **Buckwalter JA, Kuettner KE, Thonar EJ.** Age-related changes in articular cartilage proteoglycans: Electron microscopic studies. *J Orthop Res.* 1985, 3: 251-7
- 20.- **Buckwalter JA, Pita JC, Müller FJ, Howell DS.** Structural differences between two populations of articular cartilage proteoglycan aggregates. *J Orthop Res.* 1994, 12: 144-8
- 21.- **Buckwalter JA.** Activity vs rest in the treatment of bone, soft tissues and joint injuries. *Iowa Orthop J.* 1995 a, 13: 29-42
- 22.- **Buckwalter JA.** Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: Experimental studies. *J Rheumatol.* 1995 b, 43: 13-5
- 23.- **Buckwalter JA, Lane NE.** Aging, sports and osteoarthritis. *Sports Med Arthrosc Rew.* 1996, 4: 276-87
- 24.- **Buckwalter JA, Mankin HJ.** Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *AAOS Instructional Course Lectures.* 1998, 47: 477-86

- 25.- **Buckwalter JA.** Evaluating methods of restoring cartilaginous articular surfaces. *Clin Orthop.* 1999, 367: 224-38
- 26.- **Bugbee W. Convery F.** Osteochondral allograft transplantation. *Clinics in Sports medicine.* 1999, 18: 67-75
- 27.- **Campbell IK, Piccoli DS, Butler DM, Singleton DK, Hamilton JA.** Recombinant human interleukin-I stimulates human reticular cartilage to undergo resorption and human chondrocytes to produce both tissue- and urokinase- type plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta.* 1988, 987: 183-94
- 28.- **Candolin T, Videman T.** Surface changes in the articular cartilage of rabbit knee during immobilization. A scanning electron microscopic study of experimental osteoarthritis. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica.* 1980, 88: 291-7
- 29.- **Carbonell JA, Suso S, Segur JM, Manero JM, Planell JA.** Banco informatizado de imágenes por microscopía electrónica de estructuras del aparato locomotor. Un apoyo al investigador. Libro de resúmenes. III Congreso General de la Sociedad Española de Investigación en Cirugía Ortopédica y Traumatología (INVESCOT), 2000.
- 30.- **Carlevaro MF, Albini A, Ribatti D, Gentili C, Benelli R, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F.** Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion: implication in cartilage neovascularization. *Journal of Cell Biology.* 1997, 136: 1375-84
- 31.- **Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi R, Cancedda F.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: autocrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci.* 2000, 113: 59-69.
- 32.- **Caterson B, Flannery CR, Hughes CE, Little CB.** Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol.* 2000, 19: 333-44
- 33.- **Cawston T.** Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today.* 1998, 4: 130-7

- 34.- **Chopra R, Anastassaiades T.** Specificity and synergism of polypeptide growth factors in stimulating the synthesis of proteoglycans and a novel high molecular weight anionic glycoprotein by articular chondrocyte cultures. *J Reumatol.* 1998, 25: 1578-84
- 35.- **Christel P., Versier G. Landrau Ph. Drijon P.** Osteochondral grafting using the mosaicplasty technique. *Rev. Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.*, 2002; 88: 139-148.
- 36.- **Clarke I.** Surface characteristics of human articular cartilage: A scanning electron microscope study. *J Anat.* 1971, 108: 23-30
- 37.- **Cohen JA.** Coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological measurement.* 1960, 20: 37-46
- 38.- **Combe B.** Inflammation and joint destruction during rheumatoid polyarthritis: What relation?. *Press Med.* 1998, 27: 481-3
- 39.- **Convery F, Meyers M, Akeson W.** Fresh osteochondral allografting of the femoral condyle. *Clin Orthop.* 1991, 273: 139-145
- 40.- **Coutts R, Healey R, Ostrander R, Sah R, Gomel R, Amiel D.** Matrices for cartilage repair. *Clini Orthop.* 2001, 391S: 271-9
- 41.- **Crang R y Klomparens K.** Artifacts in biological electron microscopy. Plenum Press, New York, 1988, 15-45
- 42.- **Curl W, Krome, J, Gordon S, Rushing J, et al.** Cartilage injuries: a review of 31516 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 1997, 13: 456-60
- 43.- **Czitrom AA, Keating S, Gross AE.** The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. *J Bone Joint Surgery,* 1990, 72 A: 574-581
- 44.- **Davis-Smith T, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N.** The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J.* 1996, 15: 4919-27
- 45.- **De Bari C, Dell'Accio F, Luyten F.** Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.* 2001, 44: 85-95

- 46.- Dempsey G, Bullivant S.** A copper block mated for freezing non-cryoprotected tissue to produce cristal-free regions for electron microscopy. I. Evaluation using freeze substitution. *J Microscopy*. 1976, 106: 251-60
- 47.- Descalzi Cancedda F, Melchiori A, Benelli R, Gentili R, Masiello L, Campanile G Cancedda R, Albini A.** Production of angiogenesis inhibitors and stimulators is modulated by cultured growth-plate chondrocytes during in-vitro differentiation: dependence on extracellular-matrix assembly. *European Journal of Cell Biology*. 1995, 66: 60-8
- 48.- Desjardins M, Hurtig M, Palmer N.** Incorporation of fresh and cryopreserved bone in osteochondral autografts in the horse. *Vet Surg*. 1991, 20: 446-52
- 49.- Devries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT.** The fms-like tyrosine kinasa, a receptor for endothelial growth factor. *Science*. 1992, 255: 989-91
- 50.- Diduch D, Jordan L, Mierisch C, Balian G.** Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy*. 2000, 16: 571-7
- 51.- Dijkgraaf LC, de Bont LGM, Boering G, Liem RSM.** Normal cartilage structure, biochemistry and metabolism: a review of the literature. *J Oral maxillofac Surg*. 1995, 53: 924-9
- 52.- Dreyfus CF, Dai X, Lercher LD, Racey BR, Friedman WJ, Black IB.** Expression of neurotrophins in the adult cord in vivo. *J Neurosci Res*. 1999, 56: 1-7
- 53.- Durr J, Lammi P, Goodman SL, Aigner T, Von Der Mark K.** Identification and immunolocalization of laminin in cartilage. *Experimental Cell Research*, 1996, 222: 225-33
- 54.- Edwards J, Sedgwick A, Moore A, Al-Duaij A, Willoughby D.** Degradation of cartilage in contact with soft tissue. *International Journal of Tissue Reactions*. 1996, 8: 309-19
- 55.- Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Deryinck R.** Towards a molecular understanding of skeletal development. *Cell*. 1995, 80: 371-8

- 56.- Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P, Shuler FD, Mi Z, Robbins PD.** Using gene therapy to protect and restore cartilage. Clin Orthop. 2000, 379: 214-9
- 57.- Eyre DR, Apone S, Wu JJ, Ericsson LH, Walsh KA.** Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen cartilage. FEBS Lett. 1987, 220: 337-41
- 58.- Eyre DR, Wu JJ, Wodds P.** Cartilage-specific collagens: Structural studies, in Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG et al (Eds): Articular Cartilage and Osteoarthritis. New York, NY. Raven Press. 1992, 119-31
- 59.- Eyre DR.** Collagen structure and function in articular cartilage: Metabolic changes in the development of osteoarthritis, in Kuettner KE, Goldberg VM (Eds): Osteoarthritic Disorders. Rosemont, IL. American Academy of Orthopaedic Surgeons, AAOS. 1995, 219-29
- 60.- Farkas T, Reffy A, Frenyo S.** Microlesions of articular cartilage as a possible cause for post-traumatic osteoarthritis. Archiv fur Orthopadische und Unfall-Chirurgie. 1975, 81: 279-84
- 61.- Fernández de Retana, P.** Osteointegración del homoinjerto óseo triturado en los defectos cavitarios. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, Facultat de Medicina. 1993. Barcelona
- 62.- Ficat P.** La dégénérescence du cartilage de la rotule. Sem. Hôp. Paris. 1974, 50: 198-201.
- 63.- Ficat P.** Les contusions du cartilage articulaire. Etude expérimentale. Rev. Chir. Orthop. 1976, 62: 493-500
- 64.- Ficat P.** Degeneration of the patello-femoral joint. Proc. Of International Congress. Rotterdam. Excerpta Medica Amsterdam. 1973, 72-79
- 65.- Ficat P.** Cartilage et arthrose; exploration fonctionnelle, pathologie et thérapeutique. Masson. Barcelone. 1979, 55-99
- 66.- Fischer AE, Carpenter TA, Tyler JA, Hall LD.** Visualisation of mass transport of small organic molecules and metal ions through articular cartilage by magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging. 1995, 13: 819-26

- 67.- Fitzpatrick P, Morgan D.** Fresh osteochondral allografts: a 6-10-year review. *ANZ Journal of Surgery.* 1998, 68: 573-9
- 68.- Friedlaender G, Strong D, Tomford W, Mankin H.** Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthopaedic Clinics of North America.* 1999, 30: 583-8
- 69.- Fu LL, Maffulli N, Chan KM.** Intra-articular hyaluronic acid following knee immobilisation for six weeks in rabbits. *Clin Rheumatol.* 2001, 20: 98-103
- 70.- Gardner D.** The influence of microscopic technology on knowledge of cartilage surface structure. *Ann Rheum Dis.* 1972, 31: 235-58
- 71.- Gardner D, McGillivray D.** Surface structure of articular cartilage. *Ann Rheum. Dis.* 1971, 30: 10-14
- 72.- Gardner D, O'Connor P, Middleton J, Oates, Orford C.** An investigation by transmission electron microscopy of freeze replicas of dog articular cartilage surfaces. *J Anatomy.* 1983, 137: 573-82
- 73.- Garret J.** Osteochondral allograft reconstruction of the knee. *Instr. Course Lect.* 1993, 42: 355-358
- 74.- Gerstenfeld LC, Shapiro FD.** Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem.* 1996, 62: 1-9
- 75.- Ghivizzani SC, Oligino TJ, Robbins PD, Evans CH.** Cartilage injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2000, 11: 289-307
- 76.- Gillogly S, Voight M, Blackburn T.** Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *JOSPT.* 1998, 4: 241-51
- 77.- Glant TT, Hadhazy CS, Micek K, Sipos A.** Appearance and persistence of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin with collagen type II. *Histochemistry.* 1985, 82: 149-58.

- 78.- Goldring MB.** The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res.* 1999, 40: 1-11.
- 79.- Goodman SB, Fornasier VL, Lee J, Kei J.** The effects of bulk versus particulate titanium and cobalt chrome alloy implanted into the rabbit tibia. *J Biomed Mater Res* 1990, 24 (11): 1539-49.
- 80.- Gross A. Hutchinson C. Agnidis Z. Et al.** Fresh osteochondral allografts for osteochondral defects. *Cartilage and Cartilage repair in the new millennium.* ICRS. Goteborg. 2000, 16.
- 81.- Guerne PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M.** Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Reum.* 1995, 38: 960-8
- 82.- 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.
- 83.- Guilak F, Ratcliffe A, Lane N, Rosenwasser M, Mow V.** Mechanical and biomedical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orth Res.* 1994, 12: 474-484
- 84.- 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- b. *Biochem J.* 1989; 258: 115-9.
- 85.- Hagiwara H, Schröter-Kermani C, Merker HJ.** Localization of collagen type VI in articular cartilage of young and adult mice. *Cell Tissue Res.* 1993, 272: 155-60
- 86.- Harding NR, Lipton JF, Vigorita VJ, Bryke E.** Experimental lead arthropathy: an animal model. *J Trauma.* 1999, 47: 951-5
- 87.- Harvey AK, Stack ST, Chandrashekar S.** Differential modulation of degradative repair responses of interleukin-1-treated chondrocytes by platelet-derived growth factor. *Biochem J.* 1993, 292: 129-36
- 88.- Hayat MA.** Principles and techniques of electron microscopy. Third edition, Mac Millan press scientific and medical. 1989, 78-127

- 89.- Hayes D, Brower R, John K.** Articular cartilage. Anatomy, injury and repair. Clin podiatr Med Surg. 2001, 18: 35-53
- 90.- Heinegard D, Oldberg A.** Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. FASEB J. 1989, 3: 2042-51
- 91.- Heyner S.** The survival of embrionic mammalian cartilage after freezing to -79°C . J Exp Zool. 1960, 144: 165-72
- 92.- Henry W, Schachar NS, Wadsworth P, Castronovo F, Mankin H.** Feline model for the study of frozen osteoarticular hemijoint transplantation. Clin Orthop. 1986, 208: 146-50
- 93.- Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslathi E.** Interactions of the small interstitial proteoglycans biglican, decorin and fibromodulin with Transforming Growth Factor Beta. Biochem J. 1994, 302: 527-34
- 94.- Hill DJ, Logan A.** Peptide growth factors and their interactions during chondrogenesis. Prog Growth Factor Res. 1992, 4: 45-68
- 95.- Hinkelmann K., Kempthorne O.** Design and analisis of experiments. Wiley-Interscience, New York. 1994, 26-58
- 96.- Hong SP, Henderson C.** Articular cartilage surface changes folling immobilization of the rat knee joint. Acta anat. 1996, 157: 27-40
- 97.- Huibregtse B, Johnstone B, Goldberg V, Caplan A.** Effect of age and sampling site on the chondro-osteogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells. J Orthop Res. 2000, 18: 18-24
- 98.- Hunter W.** On the structure and diseases of articulating cartilages. Philos Trans R Soc Lond B Biol. Sci. 1743, 42(B): 514-521
- 99.- Hurtig M, Novak K, McPherson R, McFadden S, Mc. Gann L.** Osteochondral dowel transplantation for repair of focal defects in the knee. An outcome study using an ovide model. Vet Surg. 1998, 27: 5-16
- 100.-Hynes RO, Bader BL, Hodivala-Dilke K.** Integrins in vascular development. Braz J Med Biol Res. 1999, 32: 501-10

- 101.- Hynes RO.** Integrins:a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987, 48: 549-54
- 102.- ICRS Clinical Cartilage Injury Evaluation system.** International Cartilage Research Society. Third meeting. ICRS. Goteborg. Sweden. 2000
- 103.- Insall JN, Windsor R, Scott W, Kelly m, Aglietti P.** Surgery of the knee. Second edition. Churchill Livingstone. New York. 1993, 217-239
- 104.- Jalkanen M, Jalkanen S, Bernfield M.** Binding of extracellular effector molecules by cell surface proteoglycans. En: Mc Donald JA, Mecham RP (Eds). *Receptors for extracellular matrix*. Academic Press. San Diego. 1991, 1-38
- 105.- Jakstys B.** Artifacts in sampling specimens for biological electron microscopy. In: *Artifacts in biological electron microscopy*. Plenum Press, New York. 1988, 12-45
- 106.- Jikko A, Wakisaka T, Iwamoto M, Hiranuma H, Kato Y, Maeda T, Fujishita M, Fuchihata H.** Effects of interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures. *Cell Biol Int*. 1998, 22: 615-21
- 107.- Jobanputra P, Parry D, Meads C, Burls. A.** Autologous chondrocyte transplantation for cartilage defects in the knee joint. A West Midlands development and evaluation service report. Department of Public Health and Epidemiology. University of Birmingham. United Kingdom. 2000, 1-26
- 108.- Jurverlin J, Kuusela T, Heikkilä R, Pelttari A, Kiviranta I, Tammi M, Helminen HJ.** Investigation of articular cartilage surface morphology with a semiquantitative scanning electron microscopic method. *Acta anat*. 1983, 116: 302-311
- 109.- Kiefer G, Sundby K, McAllister D, Sirve N, Frank C, Lma T, Schachar NS.** The effect of cryopreservation on the biomechanical behavior of bovine articular cartilage. *J Orthop Res*. 1989, 7: 494-501
- 110.- Kielty CM, Whitaker SP, Grant ME, Shuttleworth CA.** Type VI microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *Journal of Cell Biology*. 1992, 118: 979-90

- 111.- Kobayashi S, Yonekubo S, Kurogouchi Y.** Cryoscanning electron microscopic study of the surface amorphous layer of articular cartilage. *J Anat.* 1995 187: 429-444
- 112.- Kubo T, Arai Y, Namie K, Takahashi K, et al.** Time-sequential changes in biomechanical and morphological properties of articular cartilage in cryopreserved osteochondral allografting. *J Orthop Sci.* 2001, 6: 276-81
- 113.- Landis JR y Koch GG.** An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among observers. *Biometrics.* 1977, 33: 363-374
- 114.- LaPrade R, Konowalchuk B, Fritts H, Wentorf A.** Articular cartilage injuries of the knee. Evaluation and treatment options. *The physician and sportsmedicine.* 2001, 29: 1-10
- 115.- Lexer E.** Substitution of whole or half joint from freshly amputated extremities by free plastic operation. *Sur Gynecol Obst.* 1908, 6: 601-7
- 116.- Loeser RF.** Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix protein. *Arthritis Rheum.* 1993, 36: 1103-10
- 117.- Lohmander LS, Saxne T, Heinegard DK.** Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1994, 53: 8-13
- 118.- Mackay A, Beck S, Murphy J, Barry F, Chichester C, Pittenger M.** Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 1998, 4: 415-28
- 119.- Majumdar MK, Wang E, Morris E.** BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol.* 2001, 189: 275-84
- 120.- Mankin HJ, Mow, VC, Buckwalter JA, Iannotti JP, Ratcliffe A.** Forma y función del cartílago articular, en *Ciencias Básicas en Ortopedia.* American Academy of Orthopaedic Surgeons. 1997, 3-45
- 121.- Martell-Pelletier J.** Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998, 6: 374-6

- 122.- Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA.** Age-related decline in chondrocytes response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. *J Orthop Res.* 1997, 15: 491-8
- 123.- Mason RM.** Recent advances in the biochemistry of hyaluronic acid in cartilage, en *Connective Tissue Research: Chemistry, Biology and Physiology.* New York. 1981, 87-112
- 124.- Matsumoto T, Tsukazaki T, Enomoto H, Iwasaki K, Yamashita S.** Effects of interleukin-1 b on insulin-growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 1994, 53: 128-33
- 125.- Matthews W, Jordan CT, Weigand GW, Pardoll D, Lemischka IR.** A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell enriched populations. *Cell.* 1991, 65: 1143-52
- 126.- Mazur P.** Freezing of living cells. Mechanisms and implications. *Am J Physiol.* 1984, 241: 125-142
- 127.- McDermott A, Langer F, Pritzker K, et al.** Fresh small-fragment osteochondral allograft. *Clin Orthop.* 1985, 197: 96-102
- 128.- McGee, H.A., Jr. and W.J. Martín W.** Cryochemistry. *Cryogenics.* 1962, 2: 1-11
- 129.- Meachim G, Stockwell RA.** The Matrix, en *Adult Articular Cartilage.* 2nd Ed. Tunbridge Wells: Pitman Medical. 1979, 1-67
- 130.- Minas T, Nehrer S.** Review: Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics.* 1997, 20: 525-537
- 131.- Minas T.** Chondrocyte implantation in the repair of chondral lesions of the knee: economics and quality of life. *Am J Orthopedics.* 1998, 11: 15-21
- 132.- Miosge N, Flachsbarth K, Goetz W, Schultz W, Kresse H, Herken R.** Light and electron microscopical immunohistochemical localisation of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. *Histochemical Journal.* 1994, 26: 939-5
- 133.- Mollenhauer J, Bee JA, Lizarbe MA, Von Der Mark K.** Role of anchorin CII, a 31000-mol-wt membrane, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol.* 1984, 98: 1572-8

- 134.- Moses MA, Sudhalter J, Langer R.** Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science*. 1990, 248: 1408-10
- 135.- Moses MA.** A cartilage-derived inhibitor of neovascularization and metalloproteinases. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1993, 11S: 67-9
- 136.- Muir H.** The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. *Bioessays*. 1995, 17: 1039-48
- 137.- Muldrew K, Hurtig M, Novak K, Schachar N, McGann LE.** Localization of freezing injury in articular cartilage. *Cryobiology*. 1994, 31: 31-38
- 138.- Muldrew K, Novak K, Yang H, Zernicke R, Schachar N, McGann L.** Cryobiology of articular cartilage: ice morphology and recovery of chondrocytes. *Cryobiology*. 2000, 40: 102-9
- 139.- Muldrew K, Chung M, Novak K, Schachar N, Zernicke R, McGann L.** Evidence of chondrocyte repopulation in adult ovine articular cartilage following cryoinjury and long-term transplantation. *Osteoarthritis cartilage*. 2001, 9: 432-9
- 140.- Muldrew K, Novak, Studholme C, Wohl G, Zernicke R, Schachar N.** Transplantation of articular cartilage following a sep-cooling cryopreservation protocol. *Cryobiology*. 2001, 43: 260-7
- 141.- 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
- 142.- O'Connor P, Oates K, Gradner D.** Low temperature and conventional scanning electron microscopic observations of dog femoral condylar cartilage surface after anterior cruciate ligament division. *Anns of Rheum Dis*. 1985, 44: 321-27
- 143.- O'Connor WJ, Botti T, Khan SN, Lane JM.** The use of growth factors in cartilage repair. *Orthop Clin North Am*. 2000, 31: 399-410

- 144.- Oegema TR, Thompson R.** Histopathology and pathobiochemistry of the cartilage-bone interface in osteoarthritis. En Osteoarthritis disorders. Kuettner and Goldberg, Illinois. AAOS. 1995, 205-217
- 145.- Ohlendorf C, Tomford W, Mankin HJ.** Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. J Orthop Res. 1996, 14: 413-416
- 146.- Olsen BR.** New insights into the function of collagens from genetic analysis. Curr Opin Cell Biol. 1995, 7: 720-7
- 147.- Otsuka T.** Experimental study on histology changes of articular cartilage of femoral head under nonweight-bearing conditions. Journal of the Japanese Orthopaedic Association. 1991, 65: 70-80
- 148.- Outerbridge RE.** The etiology of chondromalacia patellae. J Bone Joint Surg. 1961, 43-B: 752-767
- 149.- Padros E, Creus M, Padros JL, Manero JM.** Una nueva etapa en la investigación odontológica con el microscopio electrónico de barrido ambiental. Revista del Colegio de Odontólogos de España (RCOE). 1999, 4: 73-80
- 150.- Pfaffle M, Borchert M, Deutzmann R, Von Der Mark K, Fernández MP, et al.** Anchorin CII, a collagen-binding chondrocyte surface protein of the calpactin family. Prog Clin Biol Res. 1990, 349: 147-57
- 151.- Piedrafita J. y Puig P.** Análisis estadístico, diseño experimental e interpretación de resultados. Curso de formación de personal investigador usuario de animales para la experimentación y otras finalidades científicas. Edt. Universidad Autónoma de Barcelona. 2001, 3-28
- 152.- 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). NY Raven Press, New York. 1992, 455-69
- 153.- Poole AR, Matsui Y, Hinek A, Lee R.** Cartilage macromolecules and the calcification of the cartilage matrix. Anat Rec. 1989, 224: 167-79
- 154.- Poole AR.** Cartilage: Molecular Aspects. Edt. Hall BK-Newman SA, Florida. 1991, 179-211

- 155.- Poole CA, Ayad S, Gilbert RT.** Chondrons from articular cartilage . Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *Journal of Cell Science*, 1992, 103: 1101-10
- 156.- Poole CA, Ayad S, Schofield JR.** Chondrons from articular cartilage (I). Immunolocalisation of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine chondrons. *Journal of Cell Science*. 1988 b, 90: 635-45
- 157.- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW.** Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *Journal of Anatomy*. 1984, 138: 113-38
- 158.- Poole CA, Wotton S, Duance VC.** Localisation of type IX collagen in chondrons isolated from porcine articular cartilage and rat chondrosarcoma. *Histochemical Journal*. 1988 a, 20: 567-74
- 159.- Poole CA.** Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat*, 1997, 191: 1-13
- 160.- Prat S.** Sustitución del ligamento cruzado anterior con aloinjertos tendinosos criopreservados. Estudios experimental de plastias en disposición helicoidal. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultat de Medicina. 1992. Barcelona
- 161.- Pynsent P, Fairbank J, Carr A.** Outcomes measures in orthopaedics. Butterworth Heinemann. Oxford. 1994, 59-84
- 162.- Ratcliffe A, Mow VC.** Articular Cartilage, en *Extracellular Matrix*. Vol 1. Tissue Function (Ed. Comper WD). The Netherlands: Harwood Academic Publishers. 1996, 234-302
- 163.- Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, Kuwano M.** Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells-possible roles of SP-1. *J Biol Chem*. 1996, 271: 220-8
- 164.- Sackett D.** Clinical disagreement: 1.- How often it occurs and why. *CMA Journal*. 1980, 123: 499-04
- 165.- Salai M, Ganel A, Horoszowski H.** Fresh osteochondral allografts at the knee joint: good functional results in a follow-up study of more than 15 years. *Archives of Orthopaedic & Trauma Surgery*. 1997, 116: 423-5

- 166.- Sandell LJ.** Molecular biology of collagens in normal and osteoarthritic cartilage, in Kuettner KE, Goldberg VM (Eds): Osteoarthritic Disorders. Rosemont, IL. American Academy of orthopaedic surgeons. 1995, 131-46
- 167.- Schachar NS, Tomford W, Mankin H.** The effect of cryopreservative agents on the viability of frozen human articular cartilage. Can Orthop Res Soc Annual meeting book, 1977
- 168.- Schachar NS, Locksley E. Mc Gann E.** Investigations of low-temperature storage of articular cartilage for transplantation. Clin Ortho Rel Res. 1986; 208: 146-50
- 169.- Schachar NS, Cucheran DJ. McGann L, Novak K, Frank C.** Metabolic activity of bovine articular cartilage during refrigerated storage. J Orthop Res. 1994, 12: 15-20
- 170.- Schachar NS.** Assessing outcomes of surgical procedures. Can J Surg. 1998, 41: 184-5
- 171.- Schachar NS. Novak K. Hurtig M. et al.** Transplantation of cryopreserved osteochondral dowel allografts for repair of focal articular defects in an ovine model. J Orthop Res. 1999a, 6: 909-19
- 172.- Schachar NS, Novak K, Muldrew K, Zernicke R, McGann L.** Articular cartilage joint surface reconstruction techniques. J Orthop Sci. 1999b, 4: 457-61.
- 173.- Schreiber RE, Ratcliffe A.** Tissue engineering of cartilage. Methods Mol Biol. 2000, 139: 301-9
- 174.- Segur JM.** Anàlisi dels factors d'optimització dels resultats d'un Banc d'Ossos Regional. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona, Facultat de Medicina. 1995. Barcelona.
- 175.- Segur JM, Garcia S, Combalia A, Suso S.** Bone allograft contamination in multiorgan and tissue donors. Arch Orthop Trauma Surg. 1998, 118: 156-8
- 176.- Segur JM, Suso S, García S, Combalía A, Fariñas O, et al.** The procurement team as a factor of bone allografts contamination. Cell and Tissue banking. 2000, 1: 117-119

- 177.- Suso S, Segur JM.** Metodología de un banco de huesos regional: En "Monografía SECOT N° 4: Banco de Huesos". Edt. Masson. Barcelona. 2002, 25-34
- 178.- Suso S, Segur JM, Torner P, Mateos G, García S, Combalía A.** Cryopreserved bone allograft in tibial plateau fractures. *Cryobiology*. 1997, 35: 378-9
- 179.- Suso S, Carbonell JA, Segur JM, Manero JM, Planell JA.** Imaging study of the cartilage surface appearance without fixation processes using an environmental scanning electron microscope. 10th EATB Annual Meeting. Eilat, Israel, 2001
- 180.- Seyedin SM, Rosen DM.** Matrix proteins of the skeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1990, 2: 914-9
- 181.- Shakibaei M, Souza P de, Merker HJ.** Integrin expression and collagen type II implicated in maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture (an immunomorphological study). *Cell Biol Int*. 1997, 21:115-25
- 182.- Shakibaei M.** Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res*. 1998, 240: 95-106
- 183.- Shibayama E, Koizumi H.** Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol*. 1996, 148: 1807-18
- 184.- Shortkroff S, Barone L, Hsu H-P, Wrenn C et al.** Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*. 1996, 17: 147-54
- 185.- Shoukri MM, Edge VL.** Statistical methods for health sciences. CRC Press, Boca Raton Fl. First Edition. 1996, 83-91
- 186.- Simon W, Richardson S, Herman W, Parsons Jr.** Long-term effects of chondrocyte death on rabbit articular cartilage in vivo. *J Bone and Joint Surg*. 1976, 58A: 517-26
- 187.- Sipe JD.** Acute-phase proteins in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 1995, 25: 75-86

- 188.- Smith A.** Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage adult mammals. *Nature*. 1965, 205: 782
- 189.- Smith RJ, Justen JM, Sam LM, Rohloff NA, Ruppel PL, Brunder MN, Chin JE.** Platelet-derived growth factor potentiates cellular responses of articular chondrocytes to interleukin-1. *Arthr Rheum*. 1991, 34: 697-706
- 190.- Smith RL.** Degradative enzymes in osteoarthritis. *Front Biosci*. 1999, 4: 704-12.
- 191.- Stevenson S.** Enhancement of fracture healing with autologous and allogeneic bone grafts. *Clin. Orthop*. 1998, 355S: 239-46
- 192.- Taylor M, Elrifai A, Bailes J.** Hypothermia in relation to the acceptable limits of ischemia for bloodless surgery. *Advances in Low Temperature Biology*. 1996, 3: 1-64
- 193.- Thompson R, Oegema T, Lewis J, Wallace L.** Osteoarthrotic changes after acute transarticular load. An animal model. *J Bone and Joint Surg*. 1991, 73A: 990-1001
- 194.- Thumb N.** Function of cytokines in cartilage degradation. *Wien med wochenschr*. 1995, 145: 99-100
- 195.- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA.** The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991, 266: 11947-54
- 196.- Tomford W, Mankin H.** Investigational approaches to articular cartilage preservation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1983, 174: 22-27
- 197.- Tomford W, Springfield D, Mankin H.** Fresh and frozen articular cartilage allografts. *Orthopedics*. 1992, 15: 1183-8
- 198.- Toolan B, Frenkel S, Pereira D, Alexander H.** Development of a novel osteochondral graft for cartilage repair. *J Biomed Mater Res*. 1998, 41: 244-50.

- 199.- Valenzuela DM, Maisonpierre PC, Glass DJ, Rojas E, Nuñez L, Kong Y, Gies DR, Stitt TN, Ip NY, Yancopoulos GD.** Alternative formes of rat TrkC with different functional capabilities. *Neuron*. 1993, 10: 963-74
- 200.- Van de Kraan PM, Vitters EL, Van den Berg WB.** Inhibition of proteoglycans synthesis by transforming growth factor in anatomically articular cartilage of murine patellae. *Ann Rheum Dis*. 1992, 51: 643-7.
- 201.- Van Den Berg WB, Bresnihan B.** Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-I. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 1999, 13: 577-97.
- 202.- Van Den Berg WB.** The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol*, 1999, 58: 136-41
- 203.- Van Valburg A, Wenting MJ, Beekman B, Te koppele J, Lafeber F, Bijlsma J.** Degenerated human articular cartilage at autopsy represents preclinical osteoarthritic cartilage: comparison with clinically defined osteoarthritic cartilage. *Journal of rheumatology*. 1997, 24: 358-64
- 204.- Vega JA, García-Suárez O.** Regulación de la biología del cartílago articular normal y patológico por los factores de crecimiento. *Rev Ortop Traumatol*, 2000, 3: 316-23
- 205.- Vega JA, García-Suárez O, Martínez-Almagro A.** Cartílago articular y factores de crecimiento. *Mapfre Medicina*. 2000, 11: 212-25
- 206.- Vignon E, Bejui J, Mathieu P, Hartmann J, Ville G, Evreux J, Descotes J.** Histological changes in a rabbit model of osteoarthritis. *Journal of Rheumatology*. 1987, 14 S:104-6
- 207.- Vilalta C.** Adelantamiento de la tuberosidad anterior en el tratamiento de la artrosis rotuliana. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona. España. Febrero. 2001.
- 208.- Vilalta C, Ferrer-Roca, O.** Regeneration of the articular cartilage. An experimental work. *Acta orthop belg*. 1979, 45: 79-90

- 209.- Wakitani S, Goto T, Young R, Mansour J, et al.** Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Engineering*. 1998, 4: 429-444
- 210.- Weakley B.S.** A Beginner's handbook in biological transmission Electron Microscopy. Second edition. Churchill Livingstone, New York. 1981, 49
- 211.- Westacott CI, Sharif M.** Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction?. *Semin Arthritis Rheum*. 1996, 25: 254-72
- 212.- Williams, MA.** Quantitative methods in biology, in: *Practical Methods in Electron Microscopy, Vol 6, Part II*. Elsevier. New York. 1977, 15-34
- 213.- Wohl G, Goplen G, Ford J, Novak K et al.** Mechanical integrity of subchondral bone in osteochondral autograft and allografts. *Can J Surg*. 1998, 41: 244-50
- 214.- Wotton SF, Duance VC, Fyer PR.** Type IX collagen: a possible function in articular cartilage. *FEBS letters*. 1988, 234: 14-7
- 215.- Wotton SF, Jeacocke RE, Maciewicz RA, Wardale RJ, Duance VC.** The application of scanning confocal microscopy in cartilage research. *Histochemical Journal*. 1991, 23: 328-35
- 216.- Wu DD, Burr DB, Boyd RD, Radin EL,** Bone and cartilage changes following experimental varus or valgus tibial angulation. *J Orthop Res*. 1990, 8: 572-85