

# Cultivo "in vitro" de Condrocitos y reparo de superficies articulares en animales

*Dr. Antonio M. Quiñones Poveda\**

*Dr. Gilberto Sanguino Torrado\*\**

*Dr. Abelardo Rico Ospina\*\*\**

**Premio de Investigación "José Vicente Bernal"  
XXXV Congreso Nacional SCCOT (Cúcuta 1990).**

## INTRODUCCION

Ha sido de vital importancia y motivación para la realización de este trabajo, la ausencia de una solución adecuada para los pacientes que padecen de artrosis postraumática o degenerativa, que se hallan en etapas tempranas de la vida lo cual contraindica cualquier procedimiento protésico como solución.

Hemos hecho la correspondiente revisión bibliográfica acerca de lo que puede ser una plausible solución para la patología enunciada. Ello lo constituyen los reemplazos articulares con aloinjertos y lo que aún es más reciente en el campo de la experimentación animal, el cultivo de condrocitos aislados para luego ser implantados en los defectos articulares. Se han realizado diversos estudios y publicaciones a partir de 1960, cuando hubo un resurgimiento de los reemplazos articulares, motivados por los nuevos descubrimientos inmunológicos, que pudieron desarrollarse gracias a la naciente tecnología que permitió entender mejor el mecanismo de aceptación o rechazo del injerto.

Los cultivos celulares aislados, pasan a ser en la década de los 80 la posible solución, ante los efectos secundarios y resultados regulares de los "allografts" de partes osteocartilaginosas; ello porque parece que las células condrocíticas no despiertan reacción inmunológica importante en el huésped; pero como elementos adversos a ellos se ha presentado, entre otras cosas, lo dispendioso de la técnica, la dificultad para la fijación del implante y el inconveniente de criopreservación de dichas células con la correspondiente baja supervivencia que se ocasiona a los implantes.

Nuestro trabajo ha sido dividido en fases que son: Revisión bibliográfica, estandarización de la técnica de obtención de los injertos, cultivo celular, lo cual corresponde a esta primera publicación, junto con el adelanto del primer caso de injerto de células aisladas y cultivadas previamente, y su resultado. Una segunda publicación, que será presentada próximamente, incluirá el resultado definitivo de la muestra estudiada que esperamos sea estadísticamente significativa, respecto a los injertos realizados en conejos en un estudio comparativo con grupo control.

## OBJETIVO GENERAL

Aplicar una alternativa terapéutica a largo plazo para la artrosis postraumática de pequeñas articulaciones, luego de cumplir una fase experimental en animales, prefiriendo una técnica de cultivo de cartílago articular en una primera fase de investigación y luego una probable aplicación clínica.

## HISTORIA

La historia del uso de los injertos se remonta como una leyenda a la antigüedad. Cosmos y Damian son considerados los santos patronos de los injertos; nacidos en Sicilia (Siglo III d.c.) Cosmos médico y Damian cirujano, realizaron muchas maravillas para su tiempo. Por ello fueron sentenciados por el emperador romano Diocleciano, en el año 287 D.C. En el Siglo V d.c. realizaron un milagro póstumo a un

\* Residente 4.

\*\* Residente 3.

\*\*\* Jefe de la Unidad de Cirugía Ortopédica - Hospital San Juan de Dios. U. Nacional, Bogotá.

sacristán de una basílica en Roma; quien agobiado por sus dolencias ocasionadas por un tumor en una pierna, les invocó y éstos en sueños le realizaron un procedimiento quirúrgico. Los santos resecaron la extremidad enferma y le implantaron una porción de la extremidad inferior perteneciente a un moro que había fallecido el mismo día. Este acontecimiento sirvió de inspiración a muchos pintores de la época, entre ellos Fray Angélico, quien plasmó la escena en un lienzo que reposa en la Catedral de San Marcos (Florencia, Italia)<sup>24,25</sup>.

Tuffier realizó trasplantes articulares parciales, con mínima cantidad de hueso subcondral, en la reconstrucción de luxofracturas posteriores de hombro, en las cuales la respuesta inmune de acuerdo a los conocimientos de la época fue leve.

En la era actual los reemplazos articulares fueron reportados al unísono por Judet y Lexer en 1908, en trabajos independientes<sup>10,24,25</sup>. Judet demostró que la superficie articular transplantada se mantiene intacta por un tiempo, pero que luego se degenera y se compacta. Estos elementos han sido corroborados por otros autores, quienes los explican como secundarios a la fijación del injerto o a defectos biológicos que transcurren en la fase de fijación del mismo.

Lexer reporta, que en una serie total de 23 reemplazos de rodilla totales y 11 en hemiartroplastias, tuvo una utilidad de 50% (1923).

Luego hasta 1960 aparece una larga serie publicada por Ottolenghi y Parrish quienes motivados por descubrimientos realizados por Bonfiglio, Chase y Henrdon en 1954<sup>3,24,25</sup> quienes demuestran la disminución de la inmunogenicidad del cartílago y del hueso utilizando la congelación, lo cual ocurre desde el punto de vista humoral pero no del celular.

Estos hallazgos se suman a los hechos por Elves, quien resume la evidencia acumulada en los últimos 30 años, donde se soporta la teoría de que el hueso fresco congelado y desecado disminuye la inmunidad en ese orden. La razón más probable para que ello ocurra es que las células especializadas presentadoras del antígeno (células pasajeras), que residen en los injertos viables, son destruidas por la congelación y de la desecación<sup>3,37,42</sup>.

Parrish<sup>32,24</sup> en un seguimiento a largo plazo logra la más importante contribución clínica, al demostrar que los injertos hechos en 1960 fueron subsecuente y parcialmente reemplazados e incorporados por el

huésped, pudiendo la articulación ser conservada por más de 20 años.

Langer y Gross en 1974 identificaron anticuerpos anti HLA en humanos. Igualmente Mankin en 1976 comenta que la inmunidad celular es más difícil de definir<sup>24</sup>. En 1970 Lundgren y cols. así como Schachar, identificaron la respuesta celular utilizando técnicas de linfocito-toxicidad<sup>9,37</sup>.

Salter en 1984<sup>34</sup> establece los criterios de evaluación macroscópica de la incorporación de los injertos articulares de acuerdo al aspecto morfológico así:

- a. Aspecto suave, brillante, unión no visible.
- b. Superficie fisurada.
- c. Superficie fisurada, no íntegra con evidencia del sitio de unión.

Igualmente establece, así como Noami Kawabe<sup>22</sup> y Shigeyuki<sup>39</sup> en 1989, la evaluación histológica como criterios de rechazo:

- a. Invasión vascular del cartílago.
- b. Presencia de células mononucleares o linfocitos.
- c. Presencia de necrosis o signos de inflamación.

Shigeyuki en 1989<sup>39</sup> nos muestra las diferentes características de incorporación o rechazo del injerto y las fases normales de la incorporación del mismo:

- a. Ocho semanas: Conformación del tejido de cicatrización sin metaplasia del cartílago.
- b. Ocho a doce semanas: Metaplasia del cartílago.
- c. Doce a veinticuatro semanas: Defecto cubierto con metaplasia cartilaginosa, con leve metacromasia de la matriz y condrocitos de la misma.

## MORFOFISIOLOGIA DEL CARTILAGO ARTICULAR

Morfología del Cartílago Articular Adulto: la superficie del cartílago articular no es completamente lisa ultraestructuralmente. Se demuestra que es irregular con ondulado superficial que acoge el líquido sinovial y a su vez facilita la lubricación de la superficie.

El grosor promedio es de dos a cuatro milímetros en articulaciones mayores y no hay continuidad entre el cartílago y el hueso subcondral. El acople es perfecto a la irregularidad del hueso.

Cerca de la superficie los condrocitos están aplanados y son pequeños, con ejes largos paralelos a la superficie articular. En la capa más profunda son grandes y casi totalmente redondeados, distribuidos en columnas perpendiculares a la superficie articular.

Se ha demostrado una delgada lámina fibrosa en la superficie articular (lámina esplendente). No es pericondrio ya que no posee capacidad germinativa y en los márgenes se une firmemente, confundiendo con el periostio. Posee propiedades mecánicas y previene la fuga de los proteoglicanos<sup>31</sup>.

La unión del cartílago calcificado y el no calcificado por una línea basófila es denominada "línea de marea". El colágeno que hay por encima y por debajo de dicha línea es continuo; así el cartílago no calcificado se fija firmemente al ya calcificado. Esta línea contiene cantidad considerable de lípidos, fosfatasa alcalina y ATP-asa, todos los cuales intervienen en el proceso de mineralización, pero dicha línea de marea es además de una simple unión una zona de actividad metabólica, productora de calcificación del cartílago. Hay áreas de cartílago con más de una línea que tienden a aumentar con los años, lo cual sugiere que la zona calcificada va extendiéndose hacia la no calcificada.

Matriz: aunque la composición del cartílago no es uniforme en toda su extensión, el análisis químico cualitativo muestra que está compuesto por 10 a 15% de proteoglicano, 10 a 15% de colágeno y 70 a 80% de agua<sup>14,15,31</sup>.

— Proteoglicano: la molécula de proteoglicano está formada por un núcleo de ácido hialurónico con cadenas proteicas laterales rodeadas por diversos mucopolisacáridos sulfatados (Condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato y queratán sulfato) cuyas cantidades varían con la edad y zona del cartílago. Esta macromolécula se hincha en presencia de agua y forma una estructura parecida a un escobillón, de consistencia gelatinosa y pegajosa. Los proteoglicanos (monómeros) se unen en asociación no covalente a una cinta central de ácido hialurónico. El monómero de proteoglicano está compuesto de una proteína central a la cual el condroitín y queratán sulfato, oligosacárido N y O, se unen de manera covalente. Proteínas de unión no covalente interactúan en la región de unión con el ácido hialurónico (entre la

proteína central y éste), estableciendo así la interacción<sup>14,27</sup>.

Hay tres secciones importantes en el monómero de proteoglicano:

1. Región de unión condroitín sulfato.
2. Región de unión queratán sulfato.
3. Región de unión hialuronato.

La estructura química varía con la época de la vida, cambiando las proporciones de sus componentes; especialmente el largo de las cadenas de queratán y condroitín sulfato. En personas jóvenes el condroitín sulfato es mayor que el queratán sulfato y con la edad se va invirtiendo la proporción.

El queratán y condroitín sulfato poseen cargas negativas debido a la presencia de grupos carboxilo y el sulfato, asociado a partículas de azúcar; esto favorece la acumulación de grandes cantidades de agua. Así se explica lo voluminoso de la matriz cartilaginosa y de sus propiedades como amortiguante<sup>2,15,31</sup>.

La combinación de moléculas gigantes de proteoglicano y fibras colágenas hace que el cartílago actúe como filtro molecular que permite el paso de las pequeñas partículas y no así de las grandes. De esta manera se evita la entrada de la mayoría de enzimas degradativas<sup>2,31</sup>. La carga negativa fija de los polisacáridos sulfatados afecta la difusión de los electrolitos a través del cartílago, contribuyendo así a la regulación del metabolismo.

La reducción de la concentración de proteoglicanos cambia las propiedades físicas del cartílago haciéndolo menos rígido (Condomalasia). El colágeno no sostenido por el gel de proteoglicano tiende a romperse y deshilacharse (Fibrilación). Su acción de filtro molecular se pierde y el cartílago es vulnerable a las enzimas degradativas.

Los glicosamonoglicanos son producidos por los condrocitos. Su síntesis es controlada por sistemas enzimáticos en la membrana de los organelos celulares. Las reacciones de degradación y síntesis discurren paralelamente. La vida media de la molécula de proteoglicano ha sido reportada entre varios días a meses<sup>14</sup>.

El condrocito posee un número de enzimas lisosomales capaces de digerir la matriz de proteoglicano. El cartílago posee catepsinas B.F.D.; las cuales

pueden degradar proteoglicanos a pH: 5<sup>5</sup> también se ha descrito la elaboración de una proteoglicanasa sintetizada por condrocitos de la zona hipertrófica de la placa de crecimiento, la cual tiene que ver con los procesos de mineralización. Este es el evento central en la osificación endocondral que resulta en el crecimiento longitudinal de hueso. La hipótesis sugiere que los proteoglicanos son capaces de inhibir la mineralización "In Vitro" y al ser degradados por proteasas en la parte más baja de la zona hipertrófica se impide la capacidad de los proteoglicanos para inhibir la mineralización<sup>27</sup>.

Se ha demostrado que las funciones catabólicas del condrocito se pueden controlar por la liberación de factores tisulares sinoviales, provisionalmente llamadas "Catabolinas"; que actúan directamente en las células cartilaginosas. Se ha sugerido que la liberación de catabolinas desde la sinovial dañada o anormal puede causar la degradación de la matriz cartilaginosa; probablemente por la acción de proteasas locales en el ambiente del condrocito<sup>5</sup>.

— Colágeno: el cartílago no posee más que un sólo tipo de colágeno (Tipo II), que se caracteriza por tener tres cadenas alfa 1, en su molécula de triple hélice. Las cadenas alfa 1 poseen más restos de hidroxilisina, que el colágeno tipo I y muchos de tales restos están glicosilados<sup>31</sup>. El contenido del colágeno de las últimas capas de cartílago es de tipo mixto con colágeno tipo I y II. Lo cual se explica por los cambios metabólicos en la zona de osificación, donde el condrocito hipertrófico y degenerado altera su metabolismo produciendo colágeno tipo U<sup>46</sup>.

Es probable que la unión entre colágeno y proteoglicano tenga lugar en los grupos sulfato negativos del proteoglicano y los restos de guanidina del colágeno cargados positivamente. El enlace químico entre colágeno y condroitín-4-sulfato es más fuerte en cartílago joven que el que tiene lugar entre aquel y el condroitín-6-sulfato de los adultos<sup>36</sup>.

— Agua: es el 70-80% del peso del cartílago. La mayoría es extracelular. Su contenido varía según la localización (mayor en la rótula que en cartílago costal). Con la edad no hay cambios en el contenido de agua. El agua está unida al colágeno y en mayor concentración al proteoglicano. Su movimiento depende de esta unión y de las presiones mecánicas a las que se someta el cartílago<sup>14</sup>.

— Células: en las superficies son alargadas y de distribución menos compacta que las células de áreas más profundas, donde se encuentran las célu-

las metabólicamente más activas (Retículo endoplásmico y aparato de Golgi más pronunciados). Las mitocondrias son escasas lo que se relaciona con la tasa comparativamente más baja en el consumo de oxígeno<sup>31</sup>. Se sabe que requieren de una pequeña cantidad de oxígeno para su supervivencia. La relación de las diferentes tensiones de oxígeno para la condrogénesis y actividad metabólica del condrocito ya ha sido reportado. Tensiones bajas del 5% favorecen la producción máxima de condromucoproteínas mientras que la incorporación de sulfato se disminuye con las tensiones altas del 95%. Tensiones de 35% alteran la forma de los condrocitos a elongadas o estrelladas (parecidas a fibroblastos), además la producción de matriz se disminuye. No hay cambios significativos en la mineralización en las condiciones de hiperoxia<sup>47</sup>.

La nutrición de las células se hace por procesos de difusión provenientes del líquido sinovial, vasos capsulares y vasos del hueso subcondral. Estos últimos ofrecen su aporte solamente en individuos en edad de crecimiento y con placas abiertas. La matriz de colágeno actúa como filtro molecular que regula el tamaño de las moléculas que entran y salen. En personas adultas la nutrición del cartílago articular depende casi exclusivamente del líquido sinovial. Para que esta difusión de nutrientes cumpla su cometido se requiere de una membrana sinovial sana, una circulación del líquido a través de la articulación eficiente y disminución de las tasas por una adecuada motilidad articular<sup>31</sup>.

#### **Respuesta del Cartilago Articular a la Injuria Mecánica:**

Algunos tejidos como la piel, hígado, riñón, pulmón, cerebro reparan con una cicatriz de colágeno.

Otros principalmente los tejidos conectivos reparan con un tejido similar al injuriado. Ejemplo: hueso, tendón o membrana sinovial. Actualmente hay controversia sobre la curación del cartílago, en especial si los condrocitos se dividen o no. No hay duda de que el cartílago joven sí tiene esa propiedad. Algunos investigadores han encontrado condrocitos con formaciones nucleares pignóticas, lo que podría ser evidencia de algún proceso de "división amitótica" misteriosa. Estudios con autorradiografías de H3-timidina y contenido nuclear de DNA han sido conclusivos del escaso potencial del condrocito maduro. Actualmente hay evidencia de que el condrocito puede aumentar o disminuir su capacidad de producción de matriz extracelular con diversos estímulos: concentración de oxígeno, pH, presión hidrostática, concen-

tración del calcio, hormona de crecimiento, ascorbato, vitamina E, cortisol. Por esto se supone que el condrocito puede participar de la reparación tisular aumentando su capacidad para producir matriz<sup>24,38,2,27,47,36</sup>.

Recientes estudios publicados en 1980 por Mitchell y Salter y Simonds, informan de la capacidad de reparo del cartílago articular con características similares al original (hialino), cuando los defectos articulares creados artificialmente se logran mantener reducidos con menos de dos milímetros de separación y una adecuada estabilización<sup>29,35</sup>.

Todo proceso de inflamación y reparo pasa por tres fases:

1. Fase de Necrosis: Que comienza desde el momento del trauma y se caracteriza por varios grados de muerte tisular, la cual depende del trauma, suplencia vascular y la riqueza de circulación colateral.

2. Fase de Inflamación: La cual comienza inmediatamente después de la fase de necrosis. Se manifiesta por un aumento del flujo sanguíneo, dilatación de los canales vasculares, aumento de la permeabilidad capilar. Se caracteriza por tumefacción e hiperemia, transudado, exudados que aumentan la concentración de material proteináceo que llenan los espacios extracelulares. Se forma una densa estructura de fibrina y células inflamatorias con capacidad de división y modulación de las mismas en la reparación. Con el tiempo esta estructura se organiza en un "pegante" primitivo entre los extremos del tejido herido.

3. Fase de Reparación: Cuando la masa de fibrina es invadida por vasos sanguíneos neoformados. Las células inflamatorias y la transformación de células primitivas a fibroblastos producen una matriz fibrosa que va llenando y posteriormente cerrando el defecto por contracción. En ciertas partes del cuerpo esta fase se asocia a la replicación de la zona dañada con el mismo tipo de tejido que originalmente fue lesionado (hueso y tendón).

Aplicando estas fases a la reparación del cartílago, la situación es diferente, considerando el estado avascular de este tejido.

La fase de necrosis es igual en el cartílago como en cualquier otro tejido. Como la célula cartilaginosa resiste situaciones de hipoxia, es probable que resiste más que otras células del organismo a la necrosis,

con el mismo tipo de trauma agresor. La segunda fase es totalmente vascular y en el cartílago está ausente. No hay proceso de transudación, exudación o formación de hematomas. No hay producción de fibrina. Respecto a la tercera fase hay que considerar que con la ausencia de fase inflamatoria o vascular se limita considerablemente el número de células capaces de responder al trauma. Se nota que si la injuria se extiende a través de las capas basales hacia el hueso subcondral, todas las fases de la inflamación son posibles.

La necrosis es posible tanto en el cartílago como en el hueso. El hueso subcondral es muy vascularizado y la fase de inflamación es extensa. Hay abundantes células para la fase de reparación.

Estudios microscópicos y ultramicroscópicos demuestran la inhabilidad del cartílago para producir tejido nuevo suficiente para curar una laceración superficial o una úlcera en su superficie. La respuesta es deficiente por la falta de la fase de inflamación y reparación. Una de las teorías más acertadas respecto a la curación de este tipo de heridas es el factor inhibidor de los proteoglicanos en la formación de coágulos. Es muy difícil que haya un daño del cartílago sin que comitantemente se presente daño de vascularización de la membrana sinovial. Normalmente no hay fibronógeno en el líquido sinovial, pero con el trauma se libera desde los vasos sinoviales y forma una capa que cubre el defecto en la superficie cartilaginosa. Pero este fenómeno falla ya que el ácido hialurónico y los proteoglicanos previenen la adhesión de las plaquetas y la formación del coágulo.

Cuando el defecto es penetrante se produce daño de los vasos subcondrales, lo cual hace que la articulación se llene de sangre, se forma un hematoma que finalmente se convierte en fibrina, que posteriormente dará origen al tejido de granulación, que a su vez llena el defecto en la superficie articular con fibrocartílago.

Cuando se sucede un fenómeno de impactación del cartílago en un porcentaje menor del 10% del espesor, éste sobrevive sin aparente daño a los condrocitos. Cuando la impactación es mayor del 40% se presenta la muerte del condrocito. Ante el trauma repetitivo el cartílago responde produciendo una disminución en la concentración de proteoglicanos y sí es exagerado hay degeneración celular<sup>24</sup>.

## Propiedades Mecánicas de Cartilago Articular

El cartilago articular es un material compuesto por una mezcla de sustancias cuyos principales componentes son las fibras colágenas y un gel de glucoproteínas hidratado. Esta mezcla le confiere propiedades excepcionales de deslizamiento, elasticidad, duración y resistencia.

Las fibras colágenas son una red de elementos arciformes que funcionan como una unidad y la lesión de cualquiera de sus partes afectará la integridad y función del conjunto. Las propiedades de las fibrillas colágenas y de la matriz glucoproteica, son muy diferentes pero se complementan idealmente. Las fibras de colágeno solas serían aplastadas por la presión, pero resisten bien la tracción. La glucoproteína hidratada posee las propiedades contrarias de resistir poco la tracción y sí mucho la compresión. Las fuerzas sobre el cartilago producen compresión del colágeno y del proteoglicano. Las fibras colágenas no resistirían mucho la compresión pero el gel que no es compresible tiende a dispersarse. A esto se opone una fuerza similar producida por el gel circundante<sup>31</sup>.

El tamaño y la consistencia del proteoglicano hidratado son los responsables de las propiedades mecánicas. La turgencia del cartilago se debe a la presión oncótica (tumefacción), ejercida por el proteoglicano; los cuerpos gelatinosos están atrapados en la red de colágeno y se alcanza el equilibrio cuando la presión oncótica del gel equilibra la resistencia elástica del colágeno.

— Compresión: Al aplicar una fuerza sobre superficie cartilaginosa, el agua, proteoglicanos y fibras colágenas se deforman permitiendo un escape de agua en pequeña proporción. Luego de esta respuesta elástica inicial, la indentación aumenta lentamente hasta que se alcanza el equilibrio. En este período de deformación progresiva el agua se expulsa de la matriz hasta alcanzar el equilibrio entre la presión de tumefacción, presión hidrostática de la matriz y la fuerza de las fibras colágenas. Al retirar la fuerza, el cartilago exhibe una pequeña recuperación elástica y luego se recupera progresivamente el grosor<sup>31</sup>.

Por otra parte se ha demostrado que entre mayor sea el contenido de proteoglicanos, mayor es la resistencia a la deformación progresiva del cartilago, lo cual no sucede con el colágeno, pues su deformación es independiente de su concentración.

— Tracción Estática: Las fibras colágenas son una red longitudinalmente organizadas y son el principal elemento de resistencia a la tracción. Con la

edad varios tejidos sufren cambios en sus propiedades mecánicas que se asocian a variaciones físicas de las fibras colágenas. La resistencia a la ruptura de esta manera decrece con la edad. Con pequeñas presiones la resistencia depende mucho del contenido de proteoglicanos, mientras que con presiones mayores esta resistencia está dada por las propiedades de la red de fibras colágenas.

— Fatiga: Las fuerzas repetitivas son las responsables por la ruptura que sucede por fatiga en el cartilago. La velocidad de propagación de un defecto por fatiga, depende de la velocidad relativa de la fatiga y de la reparación. En términos prácticos se considera que la velocidad de reparación es nula. La microfractura no se repara y sí se propaga hasta producir ruptura macroscópica en el tejido.

Experimentalmente se ha demostrado que una fuerza breve en duración y aplicada de manera repetitiva puede causar falla mecánica del cartilago; sin que hasta el momento se haya podido responsabilizar la dependencia de la resistencia a la fatiga, si es el colágeno o si son los proteoglicanos los causantes; sólo hay un factor inespecífico demostrado que es la edad<sup>31</sup>.

## FISIOPATOLOGIA DE LA OSTEOARTRITIS

La fisiopatología de la osteoartritis es similar en todas las articulaciones y así como en la rodilla, casi con certeza es atribuible a elementos mecánicos<sup>18</sup>. Los cambios iniciales afectan el cartilago y al menos es probable que la fragmentación de la red de fibras de colágeno causadas por la fatiga al aumento de las fuerzas de contacto, sea el acontecimiento fundamental. El hueso subcondral no tiene cambios hasta que el cartilago se ha perdido y aparece el dolor, que se explica por el contacto hueso-hueso y por las subsecuentes alteraciones mecánicas de contacto<sup>18</sup>. La lesión se puede iniciar como focal o localizada tal como sucede en los casos de osteoartritis unicompartimental, pero que puede ser acelerada por un aumento en las alteraciones mecánicas.

Ahora bien, todo tejido humano que se ve lesionado, responde con neoformación de su propio tejido o por tejido de cicatrización. Parece ser que el tejido cartilaginoso humano no tienen capacidad de mitosis<sup>18</sup>. Para Freeman<sup>42</sup> la acumulación de condrocitos se ha interpretado erróneamente como mitosis, pero no hay una real división celular y por tal motivo no puede existir un fiel reparo de defecto del cartilago articular. Realmente la cicatrización está dada por la formación de tejido cicatricial que llega a recubrir la superficie articular con fibrocartilago que inicial-

mente es funcionalmente útil. Este proviene desde el espacio medular hacia la superficie; por lo tanto necesita como requisito la presencia de brechas óseas y la ausencia de todo tejido esclerótico. Por otra parte la presión debe evitarse en esta fase de reparo para conservar el tejido de granulación tal como lo postulo Mitchel<sup>28,29</sup>, en su experimento y técnica bien popularizada de perforaciones en el hueso subcondral para afrontar esta severa patología.

Conclusivamente se considera que el acontecimiento patológico fundamental en la osteoartritis es la destrucción primaria del cartílago seguida por la destrucción del hueso, que generalmente es asimétrica lo cual lleva a una deformidad con alineación valiosa.

En la osteoartritis es claro el círculo vicioso establecido entre el daño inicial causado por determinada fuerza, que da el daño óseo y cartilaginosa y que continúa actuando y acentuando el defecto. Este a su vez acentúa la fuerza injuriante y dicha fuerza incrementa el daño<sup>13,18</sup>.

La teoría enzimática y bioquímica de osteoartritis constituye un profundo acercamiento acerca de la génesis de la misma. Mitchel Erlich<sup>6</sup> en un trabajo investigativo, nos postula que parece existir una vía final común en la patogénesis de la O.A., prescindiendo de la causa inicial. Ello involucra un aumento en el nivel de las enzimas degradativas del colágeno y de los proteoglicanos, activados a pH normal. Estas incrementan en proporción a la severidad del trauma hasta que la etapa final se alcanza. Este incremento de la actividad enzimática puede ser disparado por un mensajero sinovial de carácter proteico semejante a la interleuquina I.

Es claro que hay muchas rutas que llevan a O.A.: Factores etiológicos que van desde incidente violento traumático hasta alteraciones como las deformidades angulares. De igual manera se implican factores de la infancia, factores generacionales, genéticos o inmunes<sup>5,6</sup>. De todas formas sea cual fuere el factor desencadenante, inicialmente se aumenta la síntesis de proteoglicanos y del colágeno, pero finalmente desaparece. La cuestión es, ¿qué es lo que destruye la matriz? Es ello causado por algún factor proveniente del cartílago, de la sinovia o del elemento celular en el fluido articular<sup>6</sup>. La mayor parte por peso del cartílago es el colágeno; lo cual inicialmente se pensó se mantenía en niveles constantes. Lippiello demostró que tal como se aumenta la síntesis, se aumenta la rata de degradación. Posteriormente se probó que la colagenasa, enzima encargada de degra-

dar el colágeno, no es de origen lisosomal como sí sucede con la proteoglicanasa, sino que más bien depende de un sistema regulador con un sistema inhibidor de la colagenasa que se encuentra en el cartílago.

Fell en 1972, demostró el papel catabólico de la sinovia sobre la matriz cartilaginosa al incubarlo en cultivos<sup>5,6</sup>.

Fue evidente el incremento de la liberación de proteoglicanos del cartílago. Probó que las proteasas liberadas por la sinovia eran las responsables de ese suceso. Pero no sólo la sinovia produce las proteasas.

El propio condrocito se puede controlar por la liberación de factores tisulares provisionalmente llamados Catabolinas, que actúan directamente sobre la célula cartilaginosa<sup>5,6</sup>. Se ha sugerido la liberación de las catabolinas desde la sinovial afectada, puede causar la lesión de la matriz cartilaginosa, probablemente por la acción de proteínas locales en el ambiente pericelular del condrocito. Es necesario definir qué es una catabolina: Son una familia de proteínas capaces de estimular el cartílago vivo para que degrade su propia matriz extracelular<sup>5</sup>. Estas catabolinas parecen ser semejantes a la interleuquina I, la cual estimula al condrocito para producir proteasas neutras, colagenasa y prostaglandinas.

En cuanto a la implicación terapéutica de este cúmulo de conocimientos bioquímicos sería el alterar o mejor el alcanzar el equilibrio entre la síntesis y la degradación, lo cual sucede simultáneamente. Este fenómeno probablemente sea hecho por la alteración mecánica que trae una osteotomía por la disminución de la presión del estímulo degradante.

## **INJERTOS OSTEOCONDRALES Y CULTIVOS CELULARES**

Hoy en día se sabe que todo organismo vivo reacciona ante los tejidos transplantados mediando una respuesta inmunológica de grado variable por parte del huésped, lo cual puede jugar preponderantemente en el éxito o fracaso del trasplante. Son muchas las teorías expuestas y los logros alcanzados en el conocimiento acerca de estos tópicos; por tal motivo al realizar un injerto celular debemos conocer las fuentes inmunológicas básicas de los transplantes, especialmente los osteocartilaginosos.

### **Respuesta Inmune Osteocondral:**

Actualmente los conceptos de inmunología deben ser claros para el cirujano ortopédico particular-

mente en dos áreas: la primera es el ámbito de transplante óseo y la segunda de transplante cartilaginoso, de carácter autólogo, que conlleva un bajo riesgo de sensibilización inmunológica, pero infortunadamente cuenta con escasas fuentes de obtención, por lo cual debemos estar preparados para la utilización de injertos heterólogos como probable solución a la patología.

Hasta hace poco tiempo gran parte de la labor desarrollada en el transplante cartilaginoso se basaba en la noción de que el cartílago era un órgano inmunológicamente privilegiado y antigénicamente inerte<sup>31</sup>. Lo anterior es totalmente errado según se demuestra en los últimos estudios donde se comprueba que el condrocito y su sustrato de sostén son capaces de desencadenar respuesta humoral así como celular en el huésped, constituyéndose finalmente en el factor condicionante y limitante del resultado final<sup>3,7,11,31,38</sup>.

Siempre que el organismo se ve expuesto a tejido extraño (donante), se desencadena una respuesta inmune que está dada por el sistema linfóide del huésped, cuya interacción da la formación de efectos inmunológicos (anticuerpos y linfocitos efectores), que son específicos para el antígeno inductor. El resultado de dicha respuesta deberá ser la destrucción del organismo extraño, pero colateralmente pueden verse afectados sistemas del receptor.

Se entiende por antigenicidad o por inmunogenicidad, la propiedad de una sustancia para desencadenar una respuesta inmune en el huésped. Ella puede variar según las propiedades físicas y bioquímicas de la sustancia estimulante.

Las reacciones inmunológicas del huésped contra el material extraño, (sean microorganismos o injertos hísticos) no terminan por ser bien entendidos aún a nivel celular. Se pueden distinguir dos tipos principales de respuesta inmune: la humoral mediada por anticuerpos y la mediada por células equivalente a hipersensibilidad retardada, y se pueden desencadenar una de las dos o ambas respuestas. Ellas tienen la particularidad de estimular un mecanismo de memoria permanente que ante la presencia ulterior del mismo antígeno, desencadena una respuesta más rápida e intensa que la anterior. Por lo tanto el papel de los anticuerpos en el rechazo primario de un injerto, es un tanto dudosa pero adquiere vital importancia en la destrucción de un segundo injerto.

La respuesta celular inmunológica ocurre en el sitio donde se localiza el antígeno y es mediada por

linfocitos T, reconocedores de este antígeno, que da como respuesta una hiperplasia del tejido linfóide, finalizando en la transformación de los linfocitos en células blásticas, cuya progenie son las células asesinas o efectoras capaces de destruir el material que transporta el antígeno, sin la participación de complemento. Esta respuesta es posible corroborarla en el laboratorio utilizando dos fenómenos: La transformación y citotoxicidad.

Los linfocitos T sensibilizados previamente y estimulados producen una serie de sustancias llamada linfoquinas que actúan de diferentes maneras:

- Como amplificador de la respuesta celular reclutando linfocitos no sensibilizados de la sangre.
- Actuando sobre linfocitos, macrófagos para disminuir su movilidad (factor inhibidor de la movilización: M.I.F.).
- Alteración de la permeabilidad capilar.
- La linfocitotoxina que es una linfoquina que puede causar muerte celular y lesión hística.
- Factor activador de osteoclastos (C.A.F.) que activa los osteoclastos e induce resorción ósea.

Puede que estos dos últimos agentes tengan cierta importancia en la inmunología esquelética. Los osteoclastos y condrocitos se rodean de matriz densa que en el cartílago permiten una permeabilidad a partículas menores de P.M.68.000. Los anticuerpos efectoras humorales son inmunoglobulinas que rebasan dicho límite y por eso no pueden penetrar dicha matriz. Las linfoquinas no son inmunoglobulinas y poseen pesos entre 30 y 80.000, por lo cual penetran a la matriz cartilaginosa y llegan a la célula.

En todas la membranas celulares de cada ser vivo hay antígenos y receptores antigénicos, determinados específicos de especie y para cada individuo. Existen cuatro grupos mayores identificados del sistema HLA, cada uno con sus respectivos subgrupos, pero sólo dos de ellos son importantes clínicamente. Cuando se hace un transplante hístico tales antígenos deben ser en lo probable lo más próximos posibles, para evitar rechazos de tipo celular; pero algunos autores creen que no son importantes para tal fin<sup>6,31</sup>.

### **Respuesta Inmunológica Frente al Cartilago**

Son muchos los trabajos realizados para demostrar la respuesta inmune frente al cartílago. Aunque con-

trovertidos en conclusiones, el consenso general sugiere que sí hay respuesta inmunológica frente a los diferentes componentes del mismo: condrocitos, matriz, colágeno y proteoglicanos. Respecto a los condrocitos no hay trabajos conclusivos, pero se sospecha de manera indirecta ya que se ha visto más respuesta de rechazo si el tejido cartilaginoso se coloca más directamente en contacto con el hueso subcondral del receptor. En cambio si el cartílago se injerta con una delgada lámina de hueso subcondral el rechazo parece ser menor. Hay reportes recientes que sugieren rechazo de la matriz en los cuales la estructura del colágeno es diferente a la del receptor.

Las células de tipo óseo y cartilaginoso poseen estructura antigénica H principal, al igual que el resto de las células del organismo. Mientras la célula cartilaginosa se encuentre rodeada de matriz sana habrá protección frente a respuestas de tipo celular. Las células activadas, por su tamaño, no pueden penetrar en la matriz cartilaginosa; igual sucede con la respuesta humoral mediada por anticuerpos. Su tamaño molecular sobrepasa la permeabilidad de la matriz; sin embargo, la respuesta humoral puede afectar el injerto cartilaginoso de manera indirecta, alterando los tejidos que rodean y sostienen el mismo. Un tercer tipo de respuesta inmunológica mediada por linfocinas citotóxicas si penetra la matriz y afecta el condrocito<sup>6,31</sup>. Bonfiglio y Charlmers demostraron la inmunogenicidad del hueso y del cartílago articular y estudiaron la respuesta inmune a los auto y aloinjertos. Hay múltiples evidencias que soportan la noción que el hueso fresco, hueso congelado y congelado-desechado, disminuyen la inmunogenicidad en ese orden. Se trató de dar una explicación para que ello fuera así. Las células presentadoras del antígeno o células pasajeras, residen en el injerto y parecen ser las responsables de la mediación de la respuesta inmune. Estas células son destruidas tanto por el enfriamiento como por el enfriamiento y la desecación<sup>3,37</sup>.

En la biología de integración de todo injerto existen fases por las cuales también pasan los tejidos osteocondrales. Se puede resumir de la siguiente manera:

1. Fase de inflamación que continúa con osteogénesis y remodelación.
2. Fase de tejido de granulación.
3. Osteogénesis.
4. Remodelación.

Durante la segunda y tercera fases el sistema inmune realiza la sensibilización a los antígenos tisulares<sup>6</sup>.

### **Fuentes no Celulares de Inmunogenicidad**

La matriz puede ser una fuente de inmunogenicidad. Los proteoglicanos han adquirido importancia en los últimos días, pero no así las cadenas proteicas, el conroitín sulfato y el queratán sulfato los cuales han sido evaluados brevemente. Interés especial en la inmunogenicidad de la matriz se ha desarrollado, en asociación con teorías y modelos relacionados con la patogénesis de la artritis; sin embargo, la importancia de la matriz es mayor sobre todo en biología tumoral y de transplantes.

Friedlander<sup>6</sup>, inyectando estas sustancias en rodillas de conejo encontró: el condroitín sulfato A y C causa mínimos cambios sinoviales y no evocan la presencia de anticuerpos. Contrariamente los proteoglicanos sí producen cambios sinoviales, incluyendo un considerable engrosamiento e infiltración de la misma, por células caracterizadas, en agrupaciones de linfocitos y eosinófilos. En todos los animales que recibieron subunidades de proteoglicanos antes del sacrificio, se demostraron títulos altos de anticuerpos contra los mismos. En el momento actual no hay trabajos que demuestren actividad inmunológica contra los componentes del cartílago en los seres humanos.

La primera anomalía encontrada por falla de los injertos de cartílago es la presencia de proteínas de unión, monómero de proteoglicano, disueltas en el líquido sinovial de la articulación transplantada; a diferencia del líquido sinovial de las articulaciones de control, las cuales no presentan estas sustancias. Se supone que su presencia es indicador precoz de la destrucción del injerto<sup>36,37</sup>. En estudios en animales se han encontrado anticuerpos circulantes, antiproteínas de unión y monómeros de proteoglicano, demostrables en el suero y en el líquido sinovial. Cuando su presencia se demuestra en el líquido sinovial, la membrana sinovial se hipertrofia volviéndose hiperplásica e invasiva, destruyendo el cartílago transplantado con el cual está en contacto. Esta respuesta se ve a las seis semanas y es un fenómeno de tipo secundario, en comparación con los antígenos de histocompatibilidad que son los responsables de la respuesta inmune primaria<sup>45</sup>.

Stevenson en otro trabajo experimental fue el primero en informar actividad inmune previa (intraarticular) a la actividad detectable normalmente (sérica).

El uso de injertos compatibles disminuye la sensibilización al igual que los cambios degenerativos postimplante. La respuesta inmune a los injertos no compatibles se disminuye si son congelados o congelados y desecados<sup>36,42,43,37</sup>. La respuesta inmune sube aceleradamente al principio y luego cae lentamente. Si no son criopreservados la respuesta sube y se mantiene alta. Esta actividad es mensurable a las seis semanas y, si se usa criopreservador, sólo hasta la décima segunda semana se puede destacar.

La disminución de la respuesta inmune con injertos criopreservados depende de varios factores:

1. Tipo de injerto (córtico esponjoso, osteocondral y condral).
2. Compatibilidad celular.
3. Tipo de criopreservador.

Algunos autores sostienen que el hueso criopreservado no produce respuesta inmune alguna. Sin embargo, las características antigénicas se conservan con la congelación<sup>38</sup>.

### Técnicas de Conservación

Los diferentes investigadores, ante la necesidad de conservar los condrocitos, una vez cultivados para su posterior utilización, han enfocado parte de su gran esfuerzo hacia la conservación por congelación de los mismos; pero incidentalmente se vieron abocados a diversidad de problemas respecto a la viabilidad celular al ser congelados. Se observó que se perdía un gran porcentaje de la viabilidad; así se descubrieron los criopreservativos que se utilizan hoy por hoy y que dan una viabilidad de cerca del 90%, incluso por períodos de 30 días; cifra útil para la iniciación de nuevos cultivos con la conservación de la función principal del condrocito que es la producción de proteoglicanos.

En 1977 Schachar<sup>37,42,43</sup>, se fijó como meta en un gran trabajo de investigación, el hallar una relación directa entre la concentración de criopreservativos y el tiempo de exposición al mismo por parte de los condrocitos, con respecto al resultado final de la viabilidad y la toxicidad. Concluye que los tiempos hasta de 30 minutos a concentraciones del 20% a 4 grados cent., utilizando DMSO, no alteran la rata de supervivencia por toxicidad. Finalmente expone que la concentración ideal debe ser menor del 12% a 4 grados cent. con tiempo hasta de 240 minutos. Realiza igual laboriosa investigación respecto al gli-

cerol y concluye que a concentraciones equivalentes con el DMSO, es menos tóxico a igual temperatura y tiempo de exposición.

De su trabajo y observaciones<sup>37,42,43</sup> se colige que la matriz cartilaginosa se constituye en un obstáculo para que los criopreservativos cumplan su función. Cuando se congela la célula aislada, el criopreservativo debe penetrar únicamente la membrana celular; pero cuando lo hace en matriz cartilaginosa debe penetrar la matriz y la membrana celular. Un problema adicional presentado por la matriz lo constituye su alto porcentaje de agua el cual es cerca del 75% del peso corporal. El agua en la forma de hielo tanto extra como intracelular es una de las mayores causas de daño celular durante la congelación, ello constituye una verdadera fase de shock osmótico para la célula lo cual puede resultar en una arremetida de agua fuera de la célula, dejando así una potencialmente letal concentración electrolítica dentro de la célula. Adicionalmente como la formación de hielo extracelular progresa, la célula puede perder agua tan rápidamente que se puede deshidratar y "encogerse" dejando con ello irreparables daños en la membrana celular. La formación de hielo intracelular es igualmente peligrosa con lo cual se puede lesionar la configuración espacial molecular.

Ahora, si por el contrario la difusión de agua es lenta, la formación de hielo intracelular puede ser excesiva. El mismo Schachar en 1982<sup>5,37</sup>, sugiere que el libre flujo de agua dentro de la célula está limitado por la matriz cartilaginosa y que dicha situación potencialmente letal ocurre cuando se congela cartílago intacto. Un último problema ofrecido por la matriz lo constituye la no uniforme rata de congelación por todo el tejido; situación que no se presenta con la célula aislada.

Considerando la profundidad de congelación se ha visto que no es necesario llevar a temperaturas extremas bajo cero (-170 grados) sino que en realidad es suficiente a menos de 70 grados, a la cual pueden permanecer expuestos cerca de 210 días sin alteración morfofuncional importante<sup>37,42,43</sup>.

Para el descongelado de cartílago se colocan en una solución de Lactato de Ringer a temperatura de 30 a 40 grados, hasta llevarlo a temperatura ambiente tan rígido como sea posible. Se adicionan antibióticos a la solución y se toman los cultivos respectivos<sup>25,26,37,42,43</sup>.

De otra parte, respecto a la rata de descongelación y congelación, se comprobó que es más eficiente

cuando se hace lentamente en el rango de cero a menos cuatro grados cent., con ellos se elude el efecto nocivo de la descongelación y sus desequilibrios osmóticos celulares.

## RESULTADOS PREVIOS

Primero se utilizaron injertos osteocondrales "allo-grafts" no vascularizados con muy diversos resultados, desde 1908 en los trabajos de Lexer y Bonfiglio y recientemente en los trabajos de Gross y Mc Kee<sup>13</sup>, quienes publicaron un estudio de 110 pacientes a los cuales se les practicó injertos osteocondrales por diversas indicaciones, de ellos 78 fueron por artrosis unicompartimental, artrosis postraumática u osteonecrosis. Concluyen que los mejores resultados clínicos se obtienen para fracturas del platillo tibial antiguas, pérdida traumática y osteonecrosis en su respectivo orden. Es de anotar que si el paciente tiene deformidad angular ella es corregida con una osteotomía correctiva 9 meses antes<sup>13</sup>. El estudio microscópico mostró que el cartílago articular se fisuraba y se perdía la matriz; en otros se perdió totalmente y se identificó fibrocartílago; algunos otros presentan solamente hueso desnudo. Se pudo probar que la parte transplantada sufre el proceso de "creeping substitution" de manera ordenada en el curso de la remodelación ósea.

Luego de 7 u 8 años se han podido ver condrocitos viables con microscopio electrónico, pero en otro número variable de casos se pudo probar fisurización, pérdida de la matriz y empalizada de los condrocitos. En pocos casos no se pudo demostrar la presencia de cartílago hialino<sup>13</sup>.

Parrish<sup>32</sup>, nos da una importante contribución clínica al demostrar que los injertos son parcial y subsecuentemente reemplazados e incorporados por el huésped y la articulación puede ser preservada por más de 20 años.

Manlin<sup>24,25</sup>, en un estudio a largo plazo, no vio correlación con el HLA y el resultado final del trasplante. Lo asocia más a la adecuada fijación del fragmento y a la inmovilización postoperatoria. De un total de 62 casos tuvo 64.5% como excelentes los buenos; 17% pobres y 18% fallas. De este estudio también se colige que entre menor sea el espacio articular prequirúrgico, según la propia clasificación de Mankin de 0 a 5, se obtendrá mejor resultado.

Meyers<sup>26</sup>, publica los resultados obtenidos para reemplazo parcial articular de cadera con aloinjerto fresco en los casos de necrosis avascular idiopática.

Informa un buen resultado en 15 de 21 pacientes, que presentaban buena función y estaban libres de dolor, excluyendo la causada por esteroides.

En cuanto a condrocitos aislados, ellos han sido transplantados y han mostrado su utilidad en modelos de conejos y ratas, posiblemente por la baja inmunogenicidad conferida por la criopreservación sin que se pierda su viabilidad<sup>1,13,24,25,26,41,42,43</sup>. Infortunadamente la tasa de utilidad fue cerca del 40%, ello parece asociado a la pérdida de viabilidad en el trasplante de la célula y la dificultad de la fijación del condrocito libre en el defecto. Sin embargo, una nueva técnica descrita por Shigeyuki<sup>39</sup>, parece suplir este problema. El utiliza el método de cultivo de las células embebidas en un gel de colágeno. Creó defectos en rodillas de conejos y posteriormente se trasplantó cartílago cultivado por el método descrito, obteniendo un reparo del defecto de cartílago hialino productor de colágeno tipo I. Macroscópicamente todos los conejos tuvieron buena función en cuanto a los ángulos de movimiento y actividad.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Desde hace ya varios años, en el inicio de la presente década, el doctor Salter<sup>35</sup>, ha realizado diversas investigaciones acerca de la influencia del movimiento pasivo continuo en las superficies articulares y la reparación cartilaginosa. En un trabajo publicado en 1986<sup>34</sup>, investiga la influencia del CPM con los injertos osteoperiósticos en articulaciones con defectos mayores a 3.5 mm en el cóndilo femoral de 55 conejos. A las 5 semanas del injerto observó que el tejido cartilaginoso hialino era predominante en el 70% de los casos tratados en el postoperatorio con CPM y sólo el 10% en los casos tratados con inmovilización o con movimiento articular intermitente (IAM).

Rubak usó injertos periósticos libres para reparar las superficies cartilaginosas de conejos y observó que se producía muy poco cartílago, cuando era inmovilizado rígidamente. De lo anterior se colige que el movimiento parece ser muy importante en la regulación de la condrogénesis y que el potencial condrogénico del periostio puede ser estimulado por el CPM y su uso para llenar defectos articulares mayores está por probarse.

Del estudio de Salter<sup>34,35</sup> se obtienen los siguientes resultados: luego de crear un defecto en el cóndilo femoral de conejos e injertarlos con periostios de tibia invertidos, fueron divididos en tres grupos de postoperatorio: 1. Inmovilización rígida. 2. Otro con CPM y 3. IAM. Se analizaron las adherencias post-

quirúrgicas intraarticulares, área de movimiento, rigidez articular, estudio histopatológico, integridad de la superficie articular. El cartílago hialino fue el tejido predominante en sólo uno de 10 casos con inmovilización y de IAM contrario a lo encontrado con el CPM donde hubo 7 de 10 casos lo cual es significativo. La integridad de la superficie del tejido reparado fue inferior en los casos de IAM e inmovilización, cntra 9 y 10 en los de CPM.

Se utilidad radica igualmente en que el repaso de los defectos osteocondrales por osteocondritis disecante, fracturas condrales u osteoartritis focal, podría alternativamente encontrar su solución paralelamente al uso de cultivo de cartílago y su posterior reimplante, objeto de nuestra revisión.

## VARIABLES

Teniendo en cuenta que el trabajo, ha sido dividido en dos fases; la primera referente a la obtención de las células aisladas y la consecución de la reproducción celular "In Vitro" y la publicación del primer caso como injerto, la segunda fase comprenderá la publicación de resultados, definitivos del total de la muestra. Aquí incluiremos parte del protocolo final respecto a hipótesis y consideraciones estadísticas.

### Variables Independientes:

Considerando el tipo de trabajo y el número de variables independientes sería muy extenso; especialmente aquellas que tienen que ver con los distintos pasos del protocolo.

Realizamos previamente una serie de experimentos modificando factores ambientales, procedimentales, cualiutilizadas. Una vez obtenidos los mejores resultados, optamos por dejarlos como factores constantes y por tanto se excluyen como elementos que tengan injerencia en el resultado final; quedando resumidas las variables independientes así:

a. *Raza*: se utilizaron conejos blancos (New Zeland), cruzados en nuestro biotario.

b. *Edad*: entre 5 y 6 semanas como donantes y conejos adultos entre uno y dos años para los receptores.

c. *Peso*: 800 a 1200 gramos para los donantes y pesos de 4 a 6 Kgrs para los receptores, pesados en básculas Krupps.

d. *Articulaciones*: para los donantes fueron tomada las articulaciones que soportan carga; hombro y rodilla; considerando que el cartílago en dichas

articulaciones es de características similares. Para los receptores fue elegida la articulación patelofemoral, por su fácil acceso, tamaño y similitud a la articulación humana. Es conveniente para la creación de defectos condrales y colocación de los implantes, corte y preparación de las muestras histopatológicas.

e. *Inmovilización*: posoperatoria inmediata con férula de yeso en posición funcional por 8 días, con el fin de permitir el manejo de la herida quirúrgica y el dolor posoperatorio. Posteriormente se deja libre la articulación con actividad en la jaula hasta el día del control definitivo.

f. *Tiempo de Cultivo*: se harán los implantes entre la sexta y octava semana del cultivo celular.

g. *Viabilidad*: la preimplante se procura que esté cerca del 80%, medida con la prueba de Azul Tripano<sup>1,37,42</sup>.

h. *Perforaciones*: se creará un defecto de 4 mm a nivel del surco patelofemoral tanto en el grupo control como en el grupo de estudio.

## Dependientes

a. *Infección*: si se presenta será descartado el caso para análisis de resultados. Se corroborará paraclínicamente por medio de cultivos.

b. *Integración*: macro y microscópicamente de acuerdo a las escalas modificadas de Shigeyuki<sup>34,39</sup> y Salter<sup>34,39</sup> y Salter<sup>34,35</sup>.

c. *Estado Histológico*: se evaluará el estado histológico ya sea de cartílago, fibrocartílago, tejido fibroso o ausente de tejido.

d. *Rechazo*: Se evaluará histológicamente la presencia o no de rechazo según los criterios de Noami Kawabe<sup>22,34,39</sup>:

A. Invasión Vascolar del Cartílago.

B. Presencia de células mononucleares.

C. Presencia de Necrosis.

e. *Valoración macroscópica*: la calidad de la superficie de acuerdo al tejido regenerado se evalúa<sup>34</sup>:

A. *Superficie Integra*: Suave y Brillante, no se nota la Unión.

B. *Superficie Fisurada o fibrilada*.

C. *Superficie no Integrada*, completamente rota.

f. *Viabilidad del Implante*: Se valúa por el comportamiento a las tinciones de Zafrañin O y de Azul de Toluidina, que valoran la sobrevida y la función celular.

g. *Artrosis*: Su presencia o no se valorará por la degeneración articular global, extensión del defecto creado inicialmente, exposición subconfral, fisurización del cartílago en áreas diferentes a la inicial, imagen radiográfica y pérdida clínica de la función.

## HIPOTESIS

**Hol:** Los condrocitos o el cartílago articular cultivado, no mejorarán los defectos cartilaginosos creados.

**Hil:** Los condrocitos o el cartílago articular cultivado, sí mejoran los defectos cartilaginosos creados.

**Ho2:** No es posible cultivar condrocitos articulares en el laboratorio.

**HI2:** Si es posible cultivar condrocitos articulares en el laboratorio.

**Ho3:** El uso de la congelación en el cartílago no mejora el resultado de los injertos en los defectos condrales.

**HI3:** El uso de la congelación en el cartílago sí mejora el resultado de los injertos en defectos condrales.

## Tamaño de la Muestra

Los resultados serán evaluados desde el punto de vista estadístico con la prueba de **STUDENT**, considerando el tamaño de muestra adecuada como prueba de significación estadística final.

El cálculo de la población se hará teniendo en cuenta que la sensibilidad deseada del estudio (capacidad de encontrar una diferencia significativa, si en realidad la hay), lo asumimos de acuerdo a criterios internacionales, que es del 80% para un error Beta del 20% o 0.2 de falsos negativos.

De acuerdo a la fórmula de cálculo de muestras para experimentos clínicos (Dobson A.J. y Colton T.), referidos en Denis<sup>4</sup> es:

$$n = \frac{(P1 (100 - P1)) + (P2 (100 - P2))}{* F (\text{alfa} - \text{beta})} \\ (P1 - P2) 2$$

Donde:

n: número de sujetos del estudio.

P1: estimativo probable de respuesta en el grupo control en porcentaje. Que para nuestro estudio suponemos no debe existir, ya que bien es sabido que un defecto en el cartílago articular no cura con cartílago hialino, por lo tanto se asume como cero.

P2: estimativo probable de respuesta en el grupo de tto. que queremos detectar diferente de P1. En el trabajo asumimos como mínimo de buena respuesta comparativa en el 50%; dado que hasta el momento cualquier mejoría con cartílago hialino es buena.

F (alfa y beta): estimativo de cómputo de los niveles alfa y beta dispuestos a tolerar y que se presentan en la tabla anexa.

Alfa: 0.05 y Beta: 0.02

Con poder de Beta'' 1 — Beta (o la sensibilidad del estudio), que para todos los trabajos de investigación se ha establecido internacionalmente sea de 0.8. Por lo tanto el cálculo de nuestra población es de 11 conejos.

## METODOLOGIA

### Obtención:

El presente trabajo de carácter analítico experimental preliminar, se realiza en el Hospital San Juan de Dios y en el Instituto Nacional de Cancerología de Bogotá, por parte de dos residentes de la Unidad Especializada de Ortopedia y Traumatología de la Universidad Nacional de Colombia, con la colaboración material del Departamento de Inmunología de los Hospitales enunciados previamente.

Se tomaron conejos blancos New Zeland cruzados en el biotario del HSJD, entre cinco y seis semanas de nacidos y pesos entre 500 y 1200 grs, para los donantes y entre 4 y 6 Kgrs y 12 a 24 meses de edad para el receptor. (Se utilizó báscula tipo Krupps). Se comprobó el buen estado físico general y de las articulaciones.

Una vez recolectado todo el material quirúrgico, el animal es llevado a la sala de cirugía con todas las condiciones de asepsia y antisepsia, donde se practica inducción anestésica inhalatoria sin intubación,

con nuestro propio método. Se procede al lavado general del animal y del área donante previo rasurado. Se prepara el campo operatorio con ropa quirúrgica estéril, al igual que el baño quirúrgico de los cirujanos.

Se procede, con doble equipo de trabajo, a realizar artrotomías de la rodilla y del hombro. Una vez expuesto el cartílago articular se reseca por disección cortante en porciones de 2 mm de ancho por 5 mm de largo y de espesor parcial; con el mínimo de hueso sucondral. Se colocan en el medio de transporte Ham F-10 en tuvos de 15 cc (Falcon), previamente pesados con su contenido líquido. Se sacrifica el animal por sobredosis de pentotal sódico parenteral.

Una vez en el laboratorio se pesa el tubo de transporte y se sustrae el peso previamente calculado para obtener el peso real del cartílago extraído (Báscula Sartorius Digital). Con los cálculos se procede a pesar y a preparar las cantidades necesarias de tripsina y colagenasa a proporción de 4 cc para el cartílago extraído a concentraciones estandarizadas (tripsina 0.25% y colagenasa 0.05%<sup>1,6,39,40</sup>).

Las enzimas se preparan en medio F-10 de Ham (Sigma), previamente preparado según las instrucciones del fabricante, balanceando su pH a 7.3-7.4 utilizando bicarbonato de sodio (Merck) y HEPES (Merck); se comprueba con pH-metro (Beckman 32-meter digital) y su correspondiente filtrado y prueba de esterilidad en incubadora (Scientific). Los sustratos de las enzimas a preparar se pesan en balanzas de microgramos de alta sensibilidad (Sartorius Excellent R 2008 Digital).

En cámaras de flujo laminar y con control de esterilidad por luz ultravioleta (Flow Laboratories Stick with Quality go with Flow); se procede a preparar y a filtrar las enzimas con filtros de 0.045 micras y luego por 0.022 micras (MSF), en las cantidades calculadas. El cartílago se expone a la actividad enzimática de la tripsina (Sigma) en tubos Falcon por 30 minutos, alternativamente en incubadora a 37 grados en condiciones de cultivo (Humedad de 96% y CO<sub>2</sub> 5%) o se colocan en agitadores magnéticos (Fisher Lab Co.) a temperatura ambiente por el mismo período de tiempo.

Posteriormente se realiza el lavado de la enzima con medio F-10 de Ham y se centrifuga a 800 RPM por 5 min. (Centrífuga Jouan 210 D) y se procede a la segunda fase de la digestión de la matriz cartilaginosa con colagenasa (Sigma) en tuvos Falcon, durante tiempos variables, oscilando de 16 a 36 horas, previo

control microscópico de la digestión enzimática. Todas las fases de incubación, de digestión o de cultivo se realizan en incubadoras a condiciones de cultivo.

Una vez comprobada la digestión y la liberación de las células cartilaginosas con microscopio invertido (Karl Zeiss Jena) y sistema fotográfico incluidos; se procede al centrifugado y lavado del pellet celular con F-10 Ham, para neutralizar la acción enzimática residual. Se utilizan centrífuga Jouan y Beckman TJ-6, durante 5 min. a 800 rpm por tres ocasiones. Para el desecho del medio se utilizan micropipetas Pasteur y aspiradoras (Sigma). Posteriormente se procede al filtrado para eliminar las partículas grandes de matriz y de colágeno utilizando filtros de transfusión (Fenwal y Travenol), previamente acondicionados a nuestras necesidades. El pellet de células obtenidos se lleva a dilución estándar 1:10 para facilitar la comprobación de viabilidad celular y los cálculos de población celular para cultivo.

Las pruebas de viabilidad se hacen con Azul Tripano en proporciones 1:1 tomando 500 microlambdas para cada una de micropipetas. Se coloca la lámina de vidrio para extendido con su correspondiente cubreobjetos. Se hacen las lecturas del caso con microscopio y se determina el porcentaje de viabilidad; el cual se recomienda sea superior al 80%<sup>1,6,24,25,27,37,39,40,42,43</sup>. Se realizan las diluciones necesarias hasta obtener poblaciones de 10.000 células por mm<sup>3</sup> utilizando para ello el sistema de conteo por Hemocitómetro (Clay Adams).

Luego de obtenidas las diluciones correspondientes, se colocan las cantidades con micropipeta en cajas de cultivo de 24 pozos (Nunc Microwall 67008) y en frascos de cultivo (Corning O. Nunc) de 50 cc. Ocasionalmente utilizamos cajas de Petrie de 5 cc (Falcon). Posteriormente se colocan en incubadora a 37 grados de temperatura 5% de CO<sub>2</sub> y 96% de humedad. Es de anotar que el medio de cultivo F 10 HAM se suplementa con suero fetal bovino al 10% (Veecol), el cual para poderse utilizar es sometido a una serie de procesos y recomendaciones del proveedor y se filtra en el momento de suplementar el suero. Este medio de cultivo se suplementa con ácido ascórbico (Merck) 50 microgramos por cc y antibióticos: Penicilina cristalina 100 U por cc (Special) y Gentamicina 4 mgrs por 100 cc (Undra).

Se realizan controles periódicos de adherencia celular a las paredes del recipiente de cultivo y del metabolismo de medio, cuyas características se determina por cambios de coloración y Ph. Al cuarto día se

realiza el primer cambio y luego se continúa así dos a tres veces por semana según el crecimiento celular hasta cuando se realicen los subcultivos o bien cuando completan seis a ocho semanas de incubación al cabo de los cuales se realiza el injerto.

### Procedimiento de Injerto

Se toma el animal elegido y estandarizado. En las mejores condiciones de asepsia y antisepsia y con la técnica anestésica descrita, se procede a abordar las rodillas por artrotomía parapatelar externa, se expone la superficie articular y se realiza un defecto de 4 mm de diámetro (broca Zimmer), en la superficie femoral bilateralmente hasta llegar al hueso subcondral sangrante. En el lado derecho se coloca el injerto celular y se procede a cerrar la articulación de manera estándar. La rodilla izquierda se cerrará de igual manera pero no se le colocará injerto; ello para que nos sirva como elemento de control. Se utilizará cefalosporina transoperatoria 50 mgrs por Kg, se inmovilizará la articulación con yeso durante ocho días, para favorecer la cicatrización, analgesia y control de la infección. Posteriormente se deja libre motilidad dentro de la jaula del animal. Se realiza control interdiario del estado del animal y del área intervenida. Se deja evolucionar libremente en el biotario hasta que cumpla el tiempo en semanas requerido para realizar los controles, los cuales se llevarán a cabo a las 4, 12 y 25 semanas<sup>1,6,39,40</sup>.

Los resultados anatomopatológicos se realizan siguiendo los criterios de Shigeyuki<sup>39</sup>, que son:

a. Reparó completo: cuando ha llenado completamente el defecto con cartílago hialino y condrocitos aislados en lagunas, rodeados de matriz metacromática a la coloración de azul de toluidina.

b. Reparó incompleto: cuando hay completo llenado del defecto pero con cartílago fibroso.

c. No reparó: ni hay formación de ningún tipo de cartílago.

La valoración macroscópica será realizada según los criterios de Salter<sup>34,35</sup>, que valora la incorporación del injerto así:

- Aspecto suave brillante, unión no detectable.
- Superficie fisurada.
- Superficie no íntegra, rota completamente y evidencia clara del sitio de unión.

La evaluación del rechazo del injerto se realizará por la escala de Naomi Kawabe et al.<sup>22</sup>, con criterio histológico catalogado así:

- Invasión vascular del cartílago.
- Presencia de células mononucleares o de linfocitos.
- Necrosis o signos de inflamación.

Las células cartilaginosas se reconocen por tener aspecto poligonal y por la producción de matriz refráctil de aspecto metacromático con azul de toluidina<sup>40</sup>.

La evaluación de la calidad del cartílago y del injerto será realizada por medio de técnicas de preparación, corte y tinción con azul de toluidina y con zafranin O, con la colaboración del Departamento de Patología del Hospital de la Misericordia (Bogotá).

### RESULTADOS PARCIALES

No pretendemos hacer una disertación acerca de los resultados o técnicas empleadas; sólo pretendemos relatar nuestra experiencia personal a lo largo de 2 arduos años de trabajo que llevamos en él. En este apartado nos referiremos básicamente a la obtención y reproducción celular "in vitro" y demás aspectos del laboratorio.

Como primera medida debemos decir que para poder estandarizar la técnica tuvimos que pasar mas o menos por seis experimentos previos, hasta llegar a las condiciones mas apropiadas y óptimas aunque difieran en algo a las publicadas en la literatura. Ellas se refieren básicamente a la concentración enzimática, tiempo de exposición a la digestión, condiciones físicas tales como temperatura, humedad, agitación magnética o no. Se probó la labilidad al cambio de Ph. En los primeros experimentos tuvimos total desaparición de las células cartilaginosas matrices al hacer el recuento. En otra oportunidad tuvimos células totalmente muertas al hacer la prueba de azul tripano para la viabilidad. Condiciones diferentes al alternar el proceso de digestión enzimática nos llevaron a no tener liberación celular en otras oportunidades.

Cambios de temperatura incluso la generada por el propio agitador magnético no controlado nos llevaron a la lisis celular en otro intento más por conseguir células libres.

Esos son en síntesis algunos de los problemas y resultados obtenidos en las fases iniciales del experimento; resultado que en cada paso no cuesta mate-

realiza el primer cambio y luego se continúa así dos a tres veces por semana según el crecimiento celular hasta cuando se realicen los subcultivos o bien cuando completan seis a ocho semanas de incubación al cabo de los cuales se realiza el injerto.

### Procedimiento de Injerto

Se toma el animal elegido y estandarizado. En las mejores condiciones de asepsia y antisepsia y con la técnica anestésica descrita, se procede a abordar las rodillas por artrotomía parapatelar externa, se expone la superficie articular y se realiza un defecto de 4 mm de diámetro (broca Zimmer), en la superficie femoral bilateralmente hasta llegar al hueso subcondral sangrante. En el lado derecho se coloca el injerto celular y se procede a cerrar la articulación de manera estándar. La rodilla izquierda se cerrará de igual manera pero no se le colocará injerto; ello para que nos sirva como elemento de control. Se utilizará cefalosporina transoperatoria 50 mgrs por Kg, se inmovilizará la articulación con yeso durante ocho días, para favorecer la cicatrización, analgesia y control de la infección. Posteriormente se deja libre motilidad dentro de la jaula del animal. Se realiza control interdiario del estado del animal y del área intervenida. Se deja evolucionar libremente en el biotario hasta que cumpla el tiempo en semanas requerido para realizar los controles, los cuales se llevarán a cabo a las 4, 12 y 25 semanas<sup>1,6,39,40</sup>.

Los resultados anatomopatológicos se realizan siguiendo los criterios de Shigeyuki<sup>39</sup>, que son:

a. Reparó completo: cuando ha llenado completamente el defecto con cartílago hialino y condrocitos aislados en lagunas, rodeados de matriz metacromática a la coloración de azul de toluidina.

b. Reparó incompleto: cuando hay completo llenado del defecto pero con cartílago fibroso.

c. No reparó: ni hay formación de ningún tipo de cartílago.

La valoración macroscópica será realizada según los criterios de Salter<sup>34,35</sup>, que valora la incorporación del injerto así:

- Aspecto suave brillante, unión no detectable.
- Superficie fisurada.
- Superficie no íntegra, rota completamente y evidencia clara del sitio de unión.

La evaluación del rechazo del injerto se realizará por la escala de Noami Kawabe et al.<sup>22</sup>, con criterio histológico catalogado así:

- Invasión vascular del cartílago.
- Presencia de células mononucleares o de linfocitos.
- Necrosis o signos de inflamación.

Las células cartilaginosas se reconocen por tener aspecto poligonal y por la producción de matriz refráctil de aspecto metacromático con azul de toluidina<sup>40</sup>.

La evaluación de la calidad del cartílago y del injerto será realizada por medio de técnicas de preparación, corte y tinción con azul de toluidina y con zafranin O, con la colaboración del Departamento de Patología del Hospital de la Misericordia (Bogotá).

### RESULTADOS PARCIALES

No pretendemos hacer una disertación acerca de los resultados o técnicas empleadas; sólo pretendemos relatar nuestra experiencia personal a lo largo de 2 arduos años de trabajo que llevamos en él. En este apartado nos referiremos básicamente a la obtención y reproducción celular "in vitro" y demás aspectos del laboratorio.

Como primera medida debemos decir que para poder estandarizar la técnica tuvimos que pasar mas o menos por seis experimentos previos, hasta llegar a las condiciones mas apropiadas y óptimas aunque difieran en algo a las publicadas en la literatura. Ellas se refieren básicamente a la concentración enzimática, tiempo de exposición a la digestión, condiciones físicas tales como temperatura, humedad, agitación magnética o no. Se probó la labilidad al cambio de Ph. En los primeros experimentos tuvimos total desaparición de las células cartilaginosas matrices al hacer el recuento. En otra oportunidad tuvimos células totalmente muertas al hacer la prueba de azul tripano para la viabilidad. Condiciones diferentes al alternar el proceso de digestión enzimática nos llevaron a no tener liberación celular en otras oportunidades.

Cambios de temperatura incluso la generada por el propio agitador magnético no controlado nos llevaron a la lisis celular en otro intento más por conseguir células libres.

Esos son en síntesis algunos de los problemas y resultados obtenidos en las fases iniciales del experimento; resultado que en cada paso no cuesta mate-

rial, recurso humano y tiempo así como el agotar la disponibilidad de la utilización de las cámaras de cultivo tan escasas en el sitio donde se elabora el trabajo.

Luego de superada la fase y al obtener las células viables libres, vinieron los problemas inherentes a la manipulación de tres cambios de medio a 1 semana en forma repetitiva. Es lógico pensar que si el medio utilizado HAM F 10 modificado es tan rico en nutrientes que favorece el desarrollo y la división celular de elementos tan sensibles y de difícil estímulo mitótico como son los condrocitos; los gérmenes patógenos bacterianos y micóticos hallaron en él, el más rico habitat para su reproducción. No en vano se recalca la importancia de hacer todos los procedimientos asépticamente y siempre en cámara de flujo laminar esterilizada por rayos ultravioleta. En varias ocasiones tuvimos el problema de contaminación micótica la cual logramos solventar al agregar Anfotericina B al medio de cultivo; luego vino la contaminación con gérmenes bacterianos e infección cruzada con la presentada en otros trabajos elaborados en la misma Institución. Por si fueran pocos los problemas hasta ahora sorteados y ya en las fases de preinjerto (cuarta y quinta semana de cultivo), y cuando teníamos una producción celular que nos alentaba a pensar optimistamente que podríamos injertar varios animales a la vez (seis cajas de 50 cc), hubo un daño en la incubadora, lo cual modificó la concentración de CO<sub>2</sub> con la consecuente baja del Ph en los medios acaecidos en un fin de semana y nuevamente la desalentadora visión de la muerte celular en casi la totalidad; ello simplemente nos significa la pérdida de mas de dos meses de ardua labor y el vernos avocados a comenzar desde "cero", lo cual nos llevó en más de una ocasión a tener un "alto" obligado en la intención de elaborar este trabajo.

Finalmente y luego de otras innumerables dificultades que no es del caso enumerar, nos vimos frente a la situación de tener células viables pero que no se reproducen o lo hacen lentamente. Pero luego de las correspondientes asesorías y consultas llegamos a la solución de agregar factores de crecimiento celular reconocidos como tal en las publicaciones científicas, llevándonos así a la obtención de un número suficiente de células que nos permitieran realizar el primer injerto el día 11 03 del 90.

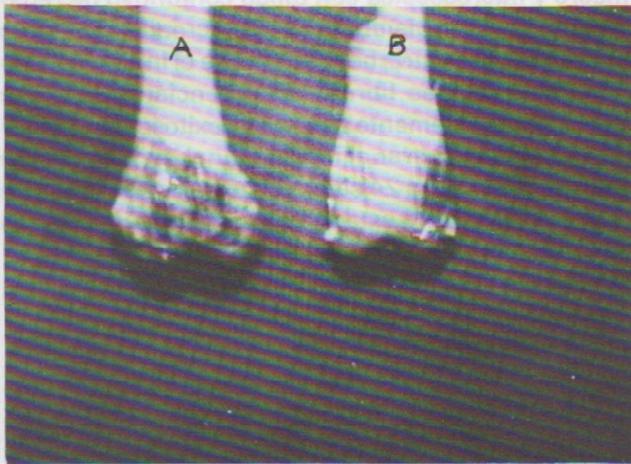
Las pruebas para determinar que sí es tejido cartilaginoso el obtenido son de carácter bioquímico, histoquímico y morfológico. Este último se refiere al aspecto poliedrico de las células y al carácter refráctil que se observa en los diferentes campos microscópi-

cos. Los histoquímicos y bioquímicos se refieren a la conservación de la capacidad del condrocito de sintetizar colágeno y proteoglicanos, lo cual se prueba como resultado final al hacer el estudio de los especímenes. Por otra parte las tinciones de azul de toluidina nos permiten ofrecer a ustedes las microfotografías de la reacción metacromática que identifica este tipo celular.

En definitiva, las células cartilaginosas se pueden reproducir en medios de laboratorio un tanto sofisticadas y delicadas, a partir de células que aún conservan el potencial de división celular' es decir de células inmaduras, como las que se obtienen de las articulaciones de conejos de menos de 6 semanas de vida. Luego de un proceso quirúrgico estéril de obtención de los sitios donantes y de un intrincado proceso lógico secuencial enzimático bajo condiciones físicas estrictas, se liberan las células que se cultivan en el medio específico HAM F 10 modificado, pasando por varias etapas de subcultivo para incrementar paulatinamente la población celular, hasta obtener la monocapa visible incluso macroscópicamente. Luego se realiza el injerto de acuerdo a la metodología descrita. Cumplimos todos los pasos establecidos por dicho protocolo y el informe preliminar de un caso correspondiente al animal que completó 16 semanas (4 meses) de post injerto, cuyas fotografías se anexan e incluyen todo el proceso de injerto, inmovilización post quirúrgica, evolución, sacrificio del animal, aspecto macroscópico y estudio microscópico, con el cual no damos una conclusión pero sí adelanta más su resultado en espera de completar la muestra total calculada, para obtener resultados estadísticamente significativos, los cuales serán objeto de una segunda publicación.

El primer animal se dejó evolucionar 14 semanas antes de ser sacrificado para el estudio histológico. Deambulaba libremente en la jaula con buena carrera y libertad de movimiento en las patas traseras. Se sacrifica de manera convencional y bajo condiciones de esterilidad, se resecan las porciones distales del fémur, se toman fotografías en fresco y se coloca en formol. Luego viene el proceso de preparación de 6 niveles de corte por cada rodilla desde el surco intercondileo hasta el surco patelofemoral.

Se anota que en la rodilla no injertada hay fibrosis y vasculatura macroscópicamente visible con disminución del surco patelar, viéndose claramente el sitio del defecto y el tejido fibroso que le ocupa diferenciándose del cartílago adyacente. Fotografías donde la rodilla derecha (A) es la injertada y la izquierda (B) es el control. En la derecha no hay evidencia del



Post-operatorio 16 semanas.

sitio de unión; tiene superficie brillante, pulida, lo cual no sucede en el otro lado.

Los cortes histológicos leídos gracias al departamento de patología de la Universidad Javeriana nos dejan ver:

- Corte A (D): Hueso y cartílago normal.
- Corte G (I)'' Hay parte de cartílago normal, pero se evidencia algo de defecto creado, no cicatrizado (Foto 2).



Defecto articular creado

- Corte B (D)'' Cartílago hialino incipiente, inmaduro en formación. Cartílago vivo.
- Corte H (I)'' Equivalente al B pero hay cartílago de mala calidad, presencia de fibrosis en actividad.

- Corte CV (D)'' Visión panorámica del sitio de unión de cartílago normal con el reparado, hay gran actividad celular.
- Corte I (I): Necrosis difusa, presencia de tejido conjuntivo.
- Corte D (D): Cartílago hialino sobre hueso subcondral. En un extremo hay cartílago ya formado y en el otro está en formación y es de carácter hialino. En Algún sitio se ven islotes intraóseos.
- Corte J (I): Se inicia la reparación del cartílago aunque es anormal y a expensas de tejido conjuntivo.
- Corte E (D): Cartílago deformado con atrofia y al parecer pérdida de cartílago en un extremo por defecto técnico (Foto 3).



Corte E. Rodilla Injertada

- Corte K (I): Necrosis total. Degeneración del cartílago (Foto 4). No se puede determinar la existencia previa del mismo.
- Corte F (D): Proceso continuo de reparación del cartílago y cartílago normal (Foto 5).
- Corte L (I): Continúa cartílago degenerado, despegado del hueso subcondral y se visualiza defecto de llenado en un extremo (Foto 6).

Todo lo anterior nos lleva a pensar que el cartílago injertado (Derecho) va en proceso de buen reparo con presencia de cartílago hialino y obliteración macro y microscópico del defecto creado artificialmente. En el no injertado (Izquierdo), hay fibrosis



Rodilla Injertada



Rodilla Injertada



Rodilla No Injertada

macro y microscópica con tejido conjuntivo de reparación y aún es visible el defecto creado; por tanto podríamos aventurarnos a decir que el injerto cartilaginoso de células libres con potencial de división celular, aparentemente es bueno y exitoso; sin embargo, debemos esperar el informe final donde haya un seguimiento hasta 24 semanas o más del injerto y se tenga una muestra estadísticamente significativa de acuerdo a lo expuesto previamente en este trabajo.

## CONCLUSIONES

— A pesar de ser dispendioso, delicado, difícil, costoso, fue posible obtener células vivas libres cartilaginosas con potencial de división celular.

— Los condrocitos son células muy sensibles a los cambios físicos y condiciones ambientales en el medio de cultivo.

— La crioconservación de condrocitos se constituye en una solución para el almacenamiento de las células previamente cultivada con viabilidad similar a las reportadas en la literatura, del 70 al 80%.

— El crecimiento de las células es de carácter bifásico con una segunda parte de crecimiento rápido exponencial.

— Los subcultivos son necesarios en la reproducción "In Vitro" para evitar la inhibición del crecimiento celular.

— El injerto es difícil de realizar, dispendioso y de acuerdo con otros autores, la principal dificultad radica en la fijación de las células al defecto creado.

— El uso de sustratos especiales parece mejorar la fijación de las células al defecto creado y probablemente favorezcan el crecimiento tridimensional del cultivo.

— El aspecto del injerto por la clasificación de Shigeyuki para valoración del cartílago neoformado es estado A: Formación de cartílago hialino con condrocitos aislados. En la zona control (Corte L), corresponde a la escala C: No reparo.

— Por la clasificación macroscópica de Salter el aspecto es estado A para el injertado: Unión no detectable y el control corresponde al grupo C: Unión fibrosa y visible.

— En cuanto al rechazo del injerto por la escala Kawabe: No hay ninguno de los criterios de rechazo.

— Respecto a las fases de incorporación del injerto de Shigeyuki se dice que es estado B: Metaplasia del cartílago y escasa reacción metacromática, que indicaría fase C.

— Los hallazgos macro e histopatológicos, reunidos por las diferentes escalas, nos permite adelantarnos a concluir acerca de un buen resultado con esta técnica, lo cual nos lleva a pensar optimistamente y a continuar con este trabajo; sin embargo, un resultado definitivo histopatológico sólo será obtenido luego de 24 semanas de seguimiento.

## SUMMARY

The objective of this experimental study is to achieve the production in vitro of immature cartilaginous cells and its conservation, storing and effectiveness in the repairement of injured articular surfaces.

After a broad bibliographic revision of the osteoarticular and chondral allografts as well as the recent studies of culture isolated cells of cartilage, we decided to carry out in a practical way and according to our enviroment along term prospective study of animal comparative experimental character with the initial aim to standarized a technique for the obtention of free articular cells as well as to achieve its conservation and obtain its reproduction in vitro using the F-10 HAM medium.

After to create articular defaults in the knee of mature rabbits, we grafted with cells previously cultured in the laboratory, we present the preliminar hystologic, morphologic and biochemical results using the mentioned technic.

If we obtain good results and an adecuate statistics tests, we will apply the same technic in humans at the label of minor articulations. With the first results we obtained a viability of 80% (with coloration of Trypan-blue), formation of metachromatic reaction (with Toluidin-blue) and a satisfactory result on the 16 week of the allografts; it will be valorated by macroscopic scale of Salter-O'Driscoll; microscopic seale of Shigeyuki and the hystologic rebound criterion of kawabe.

In addition we gain the celular crioconservation for more than 120 days using de DMSO 10% as the crioprotector following the schemes and postulates of Schachar and Tomford; avoiding damage of the functions an viability, which was mantain in about 80%.

## AGRADECIMIENTOS

Siempre es difícil acordarse a último momento de todas las personas y entidades, que nos han aportado su invaluable ayuda; pero es necesario resaltar el apoyo tanto locativo como de asesoría investigativa ofrecido por el Doctor Oscar Orozco, Jefe de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología y de su asesora la Doctora Alba Lucía Cómbita.

Al Doctor Gabriel Ortega eminente Patólogo de la Universidad Javeriana, quien sin pertenecer a nuestra Facultad, nos prestó su invaluable y desinteresado aporte respecto a la microfotografía.

Finalmente a todas aquellas personas que de una u otra manera nos alentaron y apoyaron para no desfallecer en esta ardua labor, a todos mil gracias.

## BIBLIOGRAFIA

1. ASTON J.E. Repair of articular surfaces aby allograft of articular and growth palte cartilage. J. Bone. Joint. Surg. 68 B: 29-31; 1876.
2. CAPLAN A.I., Syftnesstad G. and Osbody P. The development of embryonic bone and cartilage in tissue culture. Clin. Orthop. 174: 243-263, 1982.
3. CALZTROM A.A., Langer F, Mc Kee and Gross A. Bone and cartilage allografts transplantation. Clin. Orthop. 208: 414-445, 1985.
4. DENIS J.R. Acta Médica Colombiana. Vol. 14 No. 2: 92-99, 1989.
5. DINGLE J. Catabolin A. Cartilage catabolic factor from synovium. Clin. Orthop. 156:219-231, 1981.
6. ERLICH M., Amstromg L, Treadwell B, Mankin H. Degradative enzyme systems in cartilage. Clin. Orthop. 213: 62-68, 1986.
7. FRIEDLANDER G. Inmune responses to osteochondral allografts. Clin. Orthop. 154:58-68, 1983.
8. FULKERSON J, Damian P. Effect of prostaglandin E2 on adult pig articular cartilage slices in culture. Clin. Orthop. 179: 266-269, 1983.

— Respecto a las fases de incorporación del injerto de Shigeyuki se dice que es estado B: Metaplasia del cartílago y escasa reacción metacromática, que indicaría fase C.

— Los hallazgos macro e histopatológicos, reunidos por las diferentes escalas, nos permite adelantarnos a concluir acerca de un buen resultado con esta técnica, lo cual nos lleva a pensar optimistamente y a continuar con este trabajo; sin embargo, un resultado definitivo histopatológico sólo será obtenido luego de 24 semanas de seguimiento.

## SUMMARY

The objective of this experimental study is to achieve the production in vitro of immature cartilaginous cells and its conservation, storing and effectiveness in the repairement of injured articular surfaces.

After a broad bibliographic revision of the osteoarticular and chondral allografts as well as the recent studies of culture isolated cells of cartilage, we decided to carry out in a practical way and according to our enviroment along term prospective study of animal comparative experimental character with the initial aim to standarized a technique for the obtention of free articular cells as well as to achieve its conservation and obtain its reproduction in vitro using the F-10 HAM medium.

After to create articular defaults in the knee of mature rabbits, we grafted with cells previously cultured in the laboratory, we present the preliminar hystologic, morphologic and biochemical results using the mentioned technic.

If we obtain good results and an adecuate statistics tests, we will apply the same technic in humans at the label of minor articulations. With the first results we obtained a viability of 80% (with coloration of Trypan-blue), formation of metachromatic reaction (with Toluidin-blue) and a satisfactory result on the 16 week of the allografts; it will be valorated by macroscopic scale of Salter-O'Driscoll; microscopic seale of Shigeyuki and the hystologic rebound criterion of kawabe.

In addition we gain the celular crioconservation for more than 120 days using de DMSO 10% as the crioprotector following the schemes and postulates of Schachar and Tomford; avoiding damage of the functions an viability, which was mantain in about 80%.

## AGRADECIMIENTOS

Siempre es difícil acordarse a último momento de todas las personas y entidades, que nos han aportado su invaluable ayuda; pero es necesario resaltar el apoyo tanto locativo como de asesoría investigativa ofrecido por el Doctor Oscar Orozco, Jefe de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología y de su asesora la Doctora Alba Lucía Cómbita.

Al Doctor Gabriel Ortega eminente Patólogo de la Universidad Javeriana, quien sin pertenecer a nuestra Facultad, nos prestó su invaluable y desinteresado aporte respecto a la microfotografía.

Finalmente a todas aquellas personas que de una u otra manera nos alentaron y apoyaron para no desfallecer en esta ardua labor, a todos mil gracias.

## BIBLIOGRAFIA

1. ASTON J.E. Repair of articular surfaces aby allograft of articular and growth palte cartilage. J. Bone. Joint. Surg. 68 B: 29-31; 1876.
2. CAPLAN A.I., Syftnesstad G. and Osbody P. The development of embryonic bone and cartilage in tissue culture. Clin. Orthop. 174: 243-263, 1982.
3. CALZTROM A.A., Langer F, Mc Kee and Gross A. Bone and cartilage allografts transplation. Clin. Orthop. 208: 414-445, 1985.
4. DENIS J.R. Acta Médica Colombiana. Vol. 14 No. 2: 92-99, 1989.
5. DINGLE J. Catabolin A. Cartilage catabolic factor from synovium. Clin. Orthop. 156:219-231, 1981.
6. ERLICH M., Amstromg L, Treadwell B, Mankin H. Degradative enzyme systems in cartilage. Clin. Orthop. 213: 62-68, 1986.
7. FRIEDLANDER G. Inmune responses to osteochondral allografts. Clin. Orthop. 154:58-68, 1983.
8. FULKERSON J, Damian P. Effect of prostaglandin E2 on adult pig articular cartilage slices in culture. Clin. Orthop. 179: 266-269, 1983.

9. GEOFFREY D, Friedlander G, Mankin H. Current perspectives and future direction: the 1983 investigational conference on osteochondral allografts. *Clin. Orthop.* 197: 141-147, 1985.
10. GOLDVERG V, Heiple K. Experimental hemijoint and whole joint transplantation. *Clin. Orthop.* 174: 43-53, 1983.
11. GOLDVERG P, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin. Orthop.* 225: 7-16, 1987.
12. GOLDWASSER M, Astley T, et al. Analysis of the type of the collagen present in osteoarthritic human cartilage. *Clin. Orthop.* 167: 292-302, 1982.
13. GROSS A, Mc Kee N, Langer F. Reconstructional of eskeletal deficit at the knee. *Clin. Orthop.* 174: 96-106, 1983.
14. GSCHWEND Z, et al. The knee ligament and articular cartilage injuries. Springer-Verlag. 1978.
15. HAM A. Tratado de histología. Interamericana, séptima edición" 343-351, 1975.
16. HASEGAMA I, Kuriky S, et al. Dependence of electrical conductivity on fixed charge density in articular cartilage. *Clin. Orthop.* 177: 283-288, 1983.
17. HAVDRUP T, Telitag H. Mitosis of condrocytes in normal adult joiant cartilage. *Clin. Orthop.* 153: 248-251, 1980.
18. INSALL J. Cirugía de la rodilla. Panamericana Buenos Aires. 13-54; 544-567, 1986.
19. ITAYS A, Nevo Z. Use of cultured embryonal chicks epiphyseal chondrocytes as grafths for defects in chicks articular cartilages. *Clin. Orthop.* 220; 284-303, 1987.
20. JOHNSON R, et al. The response of articular cartilage to the in vivo replacement of synovial fluid with saline. *Clin. Orthop.* 174: 285-292, 1983.
21. KATO Y, Iwamoto M, Koike T, Suzuky F, Takano Y. Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures ground in certrifuge tubes: regulation by transforming growth factor beta and serum factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Cell Biology.* 85: 9552-9556, 1988.
22. KAWABE N, Erlich M, Mankin H. Growth plate reconstruction using chondrocyte allografts transplant. *J. of Pediatric Orthop.* 7: 381-388, 1987.
23. LANGMAN J. Embriología Médica. Tercera Ed. Interamericana. 125-139, 1983.
24. MANKIN H, Tomford W. Clinical experiences with allografts implantation. *Clin. Orthop.* 174: 69-83, 1983.
25. MANKIN H. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J. Bone. Joint. Surg.* 64 A; 460-465, 1982.
26. MEYERS J, et al. Fresh autogenous grafts and osteochondral allografts for the treatment of segmental collapse in osteonecrosis of the hip. *Clin. Orthop.* 174: 107-112, 1983.
27. MERCIER E, Erlich P and Mankin H. Elaboration of neutral proteoglycanase by growth plate tissue cultures. *J. Bone. Joint. Surg.* 69 A: 76-82, 1987.
28. MITCHELL N and Sheparo N. The resurfing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforation throught the subchondral bone. *J. Bone. Joint. Surg.* 58 A: 230-233, 1976.
29. MITCHELL N and Shepard N. Healing of articular cartilage of intrarticular fractures in rabbits. *J. Bone. Joint. Surg.* 62 A: 628-634, 1980.
30. NOGAME H, et al. Effects of electrical current on chondrogenesis in vitro. *Clin. Orthop.* 163: 244-247, 1982.
31. OWEN R, et al. Fundamentos científicos de ortopedia y traumatología. Salvat. Barcelona. 11-18, 39-44, 53-59, 299-316, 325-328, 1984.
32. PARRISH F. Allografts replacement of all or part of the end or a long bone following excision on a tumor. *J. Bone. Joint. Surg.* 55 A: 1-23, 1973.
33. RODRIGO J, Thompson E. Deep Freezing vs, 4 grade preservations of avascular osteocartilagenous shell allografts in rats. *Clin. Orthop.* 218: 268-275, 1987.
34. SALTER R, O'Driscoll S. The repair of mayor osteochondral defects in joint surface by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous pasive motion. *Clin. Orthop.* 208: 131-140, 1986.
35. SALTER R and Simmonds, The biological effects of continuous passive motion on the healing of full thickness deffect in articular cartilage. *J. Bone. Joint. Surg.* 62 A: 1232-1251, 1980.
36. SATO K, Urist M. Bone morfogenetic protein induced cargulage development in tissue culture. *Clin. Orthop.* 183: 180-187, 1984.
37. SCHACHAR N, Mc Gann L. Investigations of low temperature storage of articular cartilage for transplantation. *Clin. Orthop.* 208: 146-150, 1984.

38. SHARON S. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J. Bone. Joint. Surg.* 69 A: 573-582, 1987.
39. SHIGEYUKI W, et al. Repair of rabbit articular surfaces with allografts chondrocytes embedded in collagen gel. *J. Bone. Joint. Surg.* 71 B: 74-80, 1989.
40. SHIMOMURA Y, Suzuki F. Cultured growth cartilage cell. *Clin. Orthop.* 184: 93-105, 1984.
41. SMITH L. Effects of pulsing electromagnetic fields on bone growth and articular cartilage. *Clin. Orthop.* 181: 227-282, 1983.
42. TOMFORD W, Duff G, Mankin H. Experimental freeze preservation of chondrocytes. *Clin. Orthop.* 197: 11-14, 1985.
43. TOMFORD W, Mankin H. Investigational approaches to articular cartilage preservation. *Clin. Orthop.* 174: 22-27, 1983.
44. TREADWELL B, Mankin H. The synthetic processes of articular cartilage. *Clin. Orthop.* 213: 50-61, 1983.
45. YABLON I, Cooperband S, Coval D. Matrix antigens in allografts. *Clin. Orthop.* 168: 243-251, 1982.
46. YADUI N, et al. Transition in collagen types during endochondral ossification in human growth cartilage. *Clin. Orthop.* 183: 215-218, 1984.
47. ZIPPER H, et al. Development of chick limb bud chondrocytes in cell culture: morphogenetic and oxidative metabolic observation. *Clin. Orthop.* 155: 187-195, 1981.