

# Aloinjertos Osteocondrales: Comparación de diferentes métodos de preservación en un modelo animal

Mauricio Gutiérrez V. M.D.\*

Pedro Jiménez F. M.D.\*

Germán Carrillo A. M.D.\*\*

Camilo Soto M. M.D.\*\*\*

## RESUMEN

Se comparan diferentes métodos de preservación aplicados a cartilago articular proveniente de conejos Nueva Zelanda: criopreservación en Dimetilsulfóxido al 10% por 6 horas y congelación lenta hasta  $-76^{\circ}\text{C}$ , congelación sin criopreservación y refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  encontrando que la criopreservación y congelación lenta ofrece mejores resultados con una viabilidad celular del 25% luego de una semana de almacenamiento. En una segunda fase "in vivo" se tomaron 3 grupos de conejos (6 en cada grupo) que recibieron un aloinjerto osteocondral del cóndilo femoral externo. En el primer grupo se usaron injertos frescos, en el segundo injertos refrigerados a  $4^{\circ}\text{C}$  por una semana y en el tercero injertos criopreservados en dimetilsulfóxido y congelados lentamente y posteriormente almacenados a  $-76^{\circ}\text{C}$  por una semana. Los resultados funcionales a corto plazo son mejores en el tercer grupo. Se espera informar los resultados funcionales y morfológicos luego de un período de seguimiento de un año.

Premio al Mejor Trabajo de Ingreso, XXXV Congreso Nacional SCCOT, 1990.

## INTRODUCCION

La reparación de los defectos en el cartilago articular constituye un problema aún no resuelto. La experiencia ha demostrado que los reemplazos protésicos sólo se aproximan a las articulaciones normales en términos de duración y función, constituyendo una alternativa terapéutica reservada para pacientes de mayor edad<sup>1</sup>. Es bien conocida la limitada capacidad de reparación del cartilago articular y los autoinjertos carecen de utilidad práctica tratándose de este tipo de tejido, a diferencia del hueso del cual se dispone de cierta "reserva" corporal.

El cartilago no depende del aporte circulatorio pues deriva su nutrición de los tejidos blandos adyacentes por un proceso de difusión. La supervivencia de sus células luego de transplantadas no debería, en teoría, ser un problema en tanto la matriz perma-

nezca intacta, permita la difusión de nutrientes y limite tanto el ingreso de anticuerpos como el egreso de antígenos<sup>2</sup>.

Se han llevado a cabo numerosos estudios experimentales en animales sobre trasplante alogénico de cartilago con resultados contradictorios en cuanto a la supervivencia del cartilago. Carigmyle, Chesterman y Smith<sup>3</sup>, Hamilton y col. y algunas observaciones en humanos por Gibson<sup>2</sup>, Mankin<sup>4,5</sup> y Meyers<sup>6</sup> han mostrado buena preservación de los tejidos

\* Residente IV Programa Integrado de Ortopedia y Traumatología Facultad de Medicina Pontificia Universidad Javeriana.

\*\* Profesor Ortopedia y Traumatología, Centro Médico de Los Andes, Fundación Santa Fe.

\*\*\* Instructor Ortopedia y Traumatología, Hospital San Ignacio, Instituto Nacional de Cancerología.

transplantados por largos períodos de tiempo. Sin embargo, se ha llegado a acumular cierta evidencia de que los aloinjertos transplantados no sobreviven tan bien como los autoinjertos<sup>4,7,14</sup> y demuestran algún grado de infiltración linfocitaria en la articulación en forma de pannus tempranamente luego del injerto<sup>7,12</sup>; subsecuentemente se desarrollan fisuras y el cartílago puede cicatrizar pero éstas pueden persistir<sup>2,7</sup>.

En términos de resultados tardíos tanto en animales como en humanos, varios estudios demuestran cambios degenerativos en el cartílago<sup>7,9,14,15</sup> que puede llevar a erosión de la superficie articular y denudación hasta exponer el hueso subcondral pero sin la respuesta proliferativa observada en la osteoartritis<sup>2</sup>. Se ha sugerido que esta respuesta es mediada por algún tipo de reacción inmunológica, lo cual sin embargo, aún no ha sido aclarado<sup>16,17</sup>.

Se ha trabajado en transplante alogénico de condrocitos aislados encontrándose que cuando éstos eran provenientes de animales inmaduros fueron capaces de llenar defectos en el cartílago articular lo cual no pudo obtenerse usando células de animales maduros<sup>3</sup>. Aston y Bentley informaron que el cartílago intacto transplantado a un defecto articular era capaz de formar una superficie casi indistinguible de la del receptor, el cartílago de placa epifisiaria mostraba una apariencia modificada y los condrocitos aislados no llenaban el defecto<sup>18</sup>, sugiriendo la utilización de condrocitos incluidos en una matriz artificial lo cual fue realizado recientemente con éxito por Wakitani y col.<sup>19</sup>.

Cuando se considera el transplante de aloinjertos osteocondrales preservados surgen interrogantes respecto a las respuestas biológicas, los modelos experimentales usados, las diferentes técnicas de preservación, características individuales de los animales, técnicas quirúrgicas, cantidad de hueso presente en el injerto, estrés mecánico al cual está sometido, etc. Los datos generados por este tipo de investigación, con frecuencia contradictorios, agregan aún más confusión al tema dejando en gran medida sin resolver el problema del destino biológico final de los injertos osteocondrales alogénicos y aún en forma considerable también de los autoinjertos, particularmente en relación con las formas de almacenamiento y en especial en tejidos humanos<sup>2</sup>.

Aunque la utilización clínica de aloinjertos óseos se inició en las primeras décadas del presente siglo, luego del trabajo experimental de Ollier y Axhausen, y de que actualmente se estima que el 69% de los

Ortopedistas norteamericanos en ejercicio usarían aloinjertos si los tuvieran disponibles y que un 55% de los directores de programas de Cirugía Ortopédica utilizan de hecho aloinjertos preservados, sólo recientemente se ha dirigido la atención hacia otros tejidos musculoesqueléticos con intención de utilizarlos como aloinjertos<sup>20</sup>.

Uno de los problemas prácticos en la utilización de aloinjertos es la reacción inmunológica que suscitan. El cartílago se ha considerado un tejido inmunológicamente privilegiado puesto que sobrevive mayor tiempo luego de transplantado que cualquier otro excepto la córnea, lo cual ha sido explicado tanto por una relativa debilidad antigénica o, más probablemente, por la presencia de la matriz que actuaría como una barrera aislante para los condrocitos<sup>3,21,22</sup>. Lo anterior resulta válido tratándose de cartílago intacto puesto que se ha demostrado que los condrocitos sí poseen determinantes antigénicos capaces de suscitar en el huésped una respuesta inmunológica.

Por otro lado, en la utilización de aloinjertos de cartílago articular surge el problema de la forma de proveer su adecuada fijación al sitio receptor<sup>23</sup>. Esto ha sido resuelto mediante el uso de aloinjertos osteocondrales valiéndose de la porción ósea como soporte y medio de fijación, lo cual permite que haya suficiente neoformación ósea antes de que el colapso subcondral durante la revascularización destruya el soporte del cartílago suprayacente. El hueso, sin embargo, no es inmunológicamente inerte y probablemente genere una respuesta inmune<sup>14</sup>.

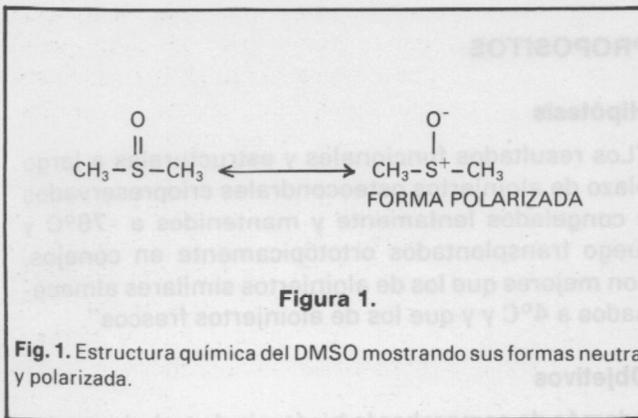
Se asume en general que la función del tejido cartilaginoso transplantado es mejor si el tejido es vivo y la presencia de células viables en el aloinjerto contribuye por lo menos a una supervivencia prolongada del injerto<sup>24</sup>, comprobándose experimentalmente deterioro a largo plazo de las superficies articulares causada por la muerte de los condrocitos<sup>25</sup>. No existen hasta el presente, sin embargo, estudios comparativos que evalúen la función luego de transplantes de cartílago vivo y muerto<sup>26</sup>. El injerto osteocondral ideal, por lo tanto, debería contener cartílago viable que pueda sobrevivir indefinidamente y hueso muerto subcondral carente de inmunogenicidad<sup>26</sup>.

Se han intentado diferentes métodos de tratar los tejidos musculoesqueléticos con el objeto de disminuir la inmunogenicidad: ebullición, congelación, liofilización, irradiación y varios métodos de tratamiento químico, los cuales aunque eficientes en cuanto a la reducción de la inmunogenicidad<sup>8,27,28</sup>,

resultan también en la muerte de la porción cartilaginosa del injerto<sup>26</sup>. Además, tanto la irradiación como la liofilización reducen significativamente la resistencia del injerto, en tanto que la congelación profunda no parece hacerlo<sup>29,31</sup>.

Un problema final que debe ser resuelto es el almacenamiento de los aloinjertos que permita su disponibilidad manteniendo las características citadas. La congelación es el método más comúnmente usado pero infortunadamente el cartílago no sobrevive a la congelación en la mayoría de los casos. La preservación de condrocitos aislados ha sido posible por congelación hasta  $-80^{\circ}\text{C}$  en presencia de glicerol o Dimetilsulfóxido (DMSO)<sup>7,32</sup>. Se ha demostrado igualmente la supervivencia de condrocitos viables en cartílago articular animal intacto utilizando el dimetilsulfóxido como "criopreservación"<sup>33</sup>. El uso de otros métodos de preservación utilizados en el pasado ha sido abandonado por sus inconvenientes y resultados poco satisfactorios (solución salina, meriolate, alcohol, refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  plasma)<sup>7,9,24,33</sup>.

En 1965 Smith reportó el primero de sus intentos experimentales por preservar condrocitos aplicando los conocimientos derivados de sus trabajos con espermatozoides<sup>34</sup>. Encontró que el tratamiento con Dimetilsulfóxido (DMSO) (fig. 1) y la congelación



lenta resultaba en células vivas que sobrevivían luego de ser implantadas en animales. Chesterman y Smith extendieron los trabajos originales a cartílago articular y en 1968 reportaron el fracaso en su intento de lograr supervivencia del cartílago pretratado con DMSO y congelado y posteriormente transplantado, a diferencia de los condrocitos aislados manejados en forma similar y que sí fueron capaces de generar tejido cartilaginoso<sup>3</sup>. Brighton no lograron la supervivencia del cartílago intacto tratado con DMSO<sup>35</sup>. Los trabajos de Tomford, Fredericks y Mankin sobre condrocitos aislados bovinos<sup>33,36</sup> evaluando

la toxicidad del glicerol y del DMSO, lo mismo que sobre cartílago intacto<sup>33</sup> concluyeron que era necesaria una congelación lenta (entre los  $0^{\circ}$  y los  $-4^{\circ}\text{C}$ ) para obtener un máximo de supervivencia celular. Jiménez y Brighthon no encontraron supervivencia celular con cartílago intacto incubado en DMSO en medio de cultivo celular independientemente de la velocidad de congelación y descongelación<sup>37</sup>. Malinin y col. no encontraron diferencia entre el glicerol y el DMSO como criopreservativos con pobres resultados luego de la congelación de los injertos en cuanto a supervivencia celular<sup>32</sup>. Rodrigo y col. compararon injertos osteocondrales de rata preservados a  $4^{\circ}\text{C}$  por 6-48 horas con injertos congelados hasta  $-80^{\circ}\text{C}$  previo tratamiento con DMSO al 10% a  $4^{\circ}\text{C}$  por una hora encontrando que el almacenamiento a  $4^{\circ}\text{C}$  por 12-24 h. tenía poco efecto sobre la viabilidad del cartílago en tanto la congelación mostró resultados muy variables<sup>26</sup>.

Tomford y col. presentaron en el 35<sup>o</sup> Congreso de la Orthopaedic Research Society en 1989 los resultados de sus trabajos de investigación en preservación de cartílago animal, tendientes a aclarar las diferencias observadas en la literatura entre las altas tasas de viabilidad celular observadas en la criopreservación de condrocitos aislados (hasta 90%) y las bajas en el cartílago articular intacto (10-15%). En el primero de sus experimentos evaluó la toxicidad del DMSO a diferentes concentraciones encontrando que no tenía efectos tóxicos significativos en concentraciones del 10 al 20% con un tiempo de exposición de 24 horas. En el segundo experimento se evaluó el tiempo de exposición antes de la congelación utilizando las concentraciones óptimas halladas, evidenciándose que la máxima criopreservación se obtenía con DMSO al 10% por 6 horas precongelación que resultaba en una viabilidad del 51%. La última experiencia comparaba los efectos tóxicos del DMSO sobre condrocitos aislados y sobre tajadas de cartílago hallando que la viabilidad del cartílago intacto prácticamente no variaba luego de 24 horas de incubación en este agente a una concentración del 10% en contraposición con una disminución significativa en la supervivencia de las células aisladas. Los autores concluyen que la débil penetración del crioprotector en la matriz cartilaginosa puede ser un factor importante en los pobres resultados de la criopreservación de cartílago articular intacto<sup>33A</sup>.

Un enfoque distinto al problema del almacenamiento de injertos osteocondrales ha sido propuesto por autores como Black, Brighthon, Jiménez, Kwan, quienes sugieren la utilización de técnicas de cultivo tisular con el fin de almacenar el tejido cartilaginoso y

mantenerlo viable<sup>29,35,37,38</sup>. Esto plantea una serie de problemas de índole práctico sobre la tecnología necesaria, sus costos y el inconveniente adicional de no disminuir la antigenicidad de la porción ósea del injerto.

Existen pocos trabajos experimentales con cartílago articular humano, los cuales sugieren que éste puede tener una mayor resistencia a la congelación y que concentraciones de DMSO del 5%-10% proveen una criopreservación adecuada<sup>39</sup>. Curiosamente, se han utilizado clínicamente injertos osteocondrales en humanos con relativo éxito<sup>4,5,6,40,41,42</sup>. Otros autores no han tenido el mismo resultado satisfactorio en humanos<sup>15,43,44,45</sup>.

A pesar de la información confusa, los resultados clínicos con injertos osteocondrales en humanos proveen un incentivo sustancial para una mayor investigación en el área tendiente a incrementar la utilización de éstos en procedimientos reconstructivos ortopédicos. Una cuestión de importancia, aún por resolver, es la ateniencia a la forma óptima de preservar y almacenar los injertos osteocondrales. La refrigeración al aire puede preservar células viables por períodos breves, los injertos frescos ofrecen excelente viabilidad celular con la conservación de las características inmunogénicas tisulares, pero el mejor método disponible (tal vez el único que permite tasas razonables de sobrevivencia celular sin implicar tecnología compleja y costosa) para la preservación por períodos más prolongados disminuyendo la antigenicidad, parece ser la congelación lenta previa criopreservación en DMSO a concentraciones y por períodos óptimos. Tal como lo sugiere Tomford la prueba definitiva debe realizarse en un sistema "in vivo"<sup>46</sup> y es éste precisamente el propósito del presente trabajo: reproducir las técnicas de criopreservación con tecnología adaptada a nuestro medio y comparar en un modelo experimental "in vivo" dos formas de almacenamiento de tejido osteocondral: refrigeración a 4°C y congelación lenta a -76°C previo tratamiento con DMSO al 10% como criopreservativo, en relación con aloinjertos frescos, evaluando sus resultados a largo plazo.

## JUSTIFICACION

Aunque existen publicadas una serie de investigaciones acerca de los resultados de transplante de aloinjertos osteocondrales en modelos experimentales animales "in vivo", ensayos de preservación de cartílago articular con diferentes metodologías e incluso reportes de experiencia clínica, es mucho aún lo que se ignora con respecto a la mejor forma de preservar para almacenamiento este tipo de injertos.

La mayoría de los trabajos en este último tópico son realizados "in vitro" y los informes más recientes por Tomford y Mankin<sup>33A</sup> sugieren buenos resultados con la utilización de DMSO como criopreservativo y posterior congelación lenta, lo cual, sin embargo, no ha sido estudiado "in vivo".

Si el método en cuestión permite obtener una buena tasa de viabilidad celular disminuyendo simultáneamente la antigenicidad de la porción ósea del injerto, se abre la posibilidad de almacenamiento por períodos prolongados de injertos de esta clase, de importancia en el tratamiento quirúrgico de patologías articulares como la osteocondritis disecante, condromalacia patelar, osteoartritis incipiente, secuelas de trauma además de su probada utilidad en el tratamiento de tumores del aparato locomotor con preservación de la extremidad. Un atractivo adicional de la técnica es su aplicabilidad a un medio como el nuestro, especialmente si se cuenta ya con un Banco de Hueso.

Se desea comparar los resultados de aloinjertos congelados previa criopreservación con los de aloinjertos almacenados a 4°C por cuanto estas son dos opciones fácilmente aplicables en nuestro medio, a diferencia de los aloinjertos frescos que presentan inconvenientes de disponibilidad y mayor inmunogenicidad.

## PROPOSITOS

### Hipótesis

"Los resultados funcionales y estructurales a largo plazo de aloinjertos osteocondrales criopreservados y congelados lentamente y mantenidos a -76°C y luego transplantados ortotópicamente en conejos, son mejores que los de aloinjertos similares almacenados a 4°C y que los de aloinjertos frescos".

### Objetivos

Además de comprobar la hipótesis de trabajo, se tienen como objetivos secundarios el realizar una revisión de la literatura sobre el tema, lograr entrenamiento en trabajo experimental tanto de laboratorio como de quirófano y valorar la real aplicabilidad al medio de las técnicas en estudio.

## MATERIAL Y METODOS

Se trata de un trabajo experimental en dos fases: una inicial "in vitro", de reproducción, comprobación y estandarización de la técnica de criopreservación y congelación lenta ya descrita, evaluando la viabilidad celular, y una segunda fase de aplicación "in vivo" en

un modelo experimental animal con seguimiento a largo plazo.

### A. Estudio "In vitro"

Se tomaron muestras de cartílago articular intacto provenientes de cóndilos femorales, platillos tibiales, acetábulo y cabeza femoral de conejos Nueva Zelanda adultos de 5 meses de edad y peso aproximado de 2,5 kg, en condiciones de esterilidad, utilizando un abordaje parapatelar lateral en la rodilla y posterolateral en la cadera y tomando tajadas de cartílago mediante la utilización de una hoja de bisturí número 15. Las muestras para evaluación de almacenamiento a 4°C se colocaron en recipientes estériles y se introdujeron inmediatamente en una nevera convencional a esta temperatura. Las muestras para estudiar la técnica de criopreservación y congelación lenta fueron introducidas inmediatamente después de recolectadas en recipientes plásticos estériles conteniendo Dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración del 10% v/v en PBS (volumen a volumen en solución salina amortiguada con "buffer" de fosfatos de la utilizada en laboratorio clínico, de la casa Merck) previamente esterilizada a gas (óxido de etileno). Los cortes de cartílago fueron incubados en criopreservativo por espacio de 6 horas a una temperatura de 4°C al cabo de las cuales se extrajo el DMSO colocando los cortes en recipientes plásticos estériles a su vez introducidos en Icopor para depositarlos en un congelador vertical a -76°C con la idea de lograr una congelación lenta de aproximadamente 1°C/min<sup>26,33</sup>. Los injertos fueron mantenidos por una semana en el congelador y luego descongelados adicionando 2 cc de Medio Mínimo Esencial (MEM) precalentado a 37°C.

Adicionalmente se tomaron muestras que fueron congeladas a -76°C sin criopreservación previa ni congelación lenta, con objeto de valorar los cambios en la viabilidad celular inducidos por la congelación profunda rápida.

Para el aislamiento de los condrocitos, el cartílago se incubó en MEM, pH 7,2, al cual se le agregó colagenasa de clostridio al 0.1% (Sigma), a 37°C por 18 h. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm obteniéndose un conglomerado de condrocitos en el cual se lava 3 veces con PBS (solución salina amortiguada con fosfatos, Merck)<sup>33,36</sup>.

La viabilidad de las células aisladas se evaluó de acuerdo con el método descrito por Amos<sup>48</sup> en el cual se utiliza la exclusión del colorante Azul de Tripiano (se colorea el agregado celular por 6 min. Con una solución al 0,25% del colorante): las células viables

no captan el colorante mientras las no viables se tiñen con él. Se determina el porcentaje de células viables por conteo al microscopio corriente.

### B. Estudio "In vivo"

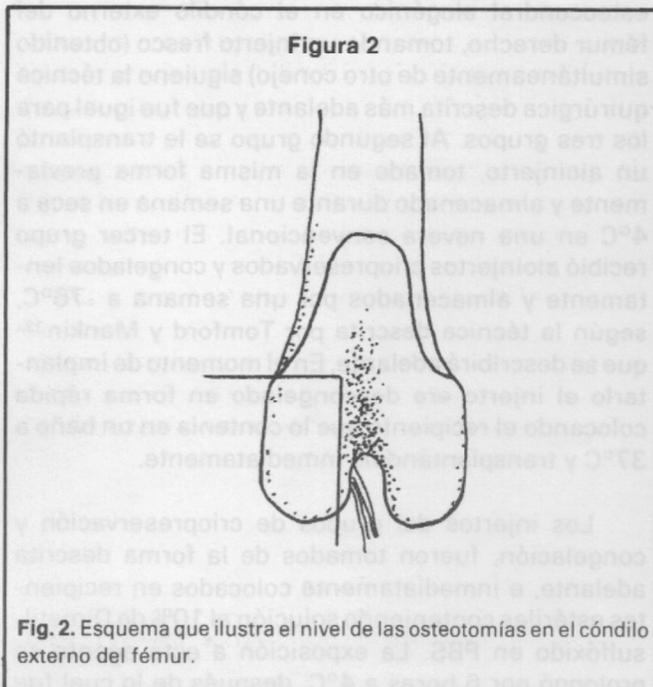
Se tomaron 3 grupos de conejos Nueva Zelanda adultos jóvenes de 5 a 6 meses de edad y entre 2.5 y 3 kg de peso, machos. Al primer grupo se realizó un injerto osteocondral alogénico en el cóndilo externo del fémur derecho, tomando un injerto fresco (obtenido simultáneamente de otro conejo) siguiendo la técnica quirúrgica descrita más adelante y que fue igual para los tres grupos. Al segundo grupo se le transplantó un aloinjerto, tomado en la misma forma previamente y almacenado durante una semana en seca a 4°C en una nevera convencional. El tercer grupo recibió aloinjertos criopreservados y congelados lentamente y almacenados por una semana a -76°C, según la técnica descrita por Tomford y Mankin<sup>33A</sup> que se describirá adelante. En el momento de implantarlo el injerto era descongelado en forma rápida colocando el recipiente que lo contenía en un baño a 37°C y transplantándolo inmediatamente.

Los injertos del grupos de criopreservación y congelación, fueron tomados de la forma descrita adelante, e inmediatamente colocados en recipientes estériles conteniendo solución al 10% de Dimetilsulfóxido en PBS. La exposición a este agente se prolongó por 6 horas a 4°C, después de lo cual fue congelado cada injerto dentro de un recipiente de Icopor hasta -76°C y mantenido de esta forma en un congelador vertical por una semana.

La anestesia consistió en la administración intramuscular en el muslo izquierdo de una mezcla de Rompún<sup>®</sup> (clorhidrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4 H-1,3-tiacina) 0.6 mg/kg más Tranquilán<sup>®</sup> (azepromazina) 0,1 cc/Kg como inducción, seguida de la administración también por vía intramuscular de Ketamina (Ketalar<sup>®</sup>) a dosis de 15 mg/kg de peso una vez obtenida la sedación con las primeras drogas. Durante el acto quirúrgico se administraron dosis de refuerzo de Ketamina a 7 mg/kg en caso de presentarse movimiento o signos de superficialidad. Se administró una dosis única de Penicilina Cristalina a 30.000 U/kg intramuscular antes de la incisión.

La técnica quirúrgica consistió en una modificación de la descrita por Lane<sup>48</sup>. Los procedimientos se realizaron en la sala de cirugía experimental observando las normas usuales de asepsia y antisepsia. Por vía parapatelar externa y a través de una incisión de 4 cm que compromete piel, subcutáneo, fascia, se practica una artrotomía luxando medialmente la

rótula. De esta forma se exponen el ligamento colateral externo, el tendón del Poplíteo y el tendón de origen del Extensor Digitorum Longus que se seccionan en su inserción femoral. El cóndilo lateral se osteotomiza a nivel de este último tendón transversalmente y longitudinalmente inmediatamente lateral al surco patelofemoral, tratando de conservar las inserciones del ligamento cruzado anterior (figura 2).



El injerto obtenido de esta forma mide por término medio 1,0 x 0,6 x 0,4 cm siendo el espesor del hueso subcondral de 5 mm en promedio. El aloinjerto es transplantado ortotópicamente y fijado mediante dos claves de Kirschner uno de ellos roscados y una lazada de alambre en forma de "8". El cierre se realiza reinsertando los tendones y el ligamento colateral y suturando cápsula y piel con sutura de poliglactina (Vicryl®). No se colocó inmovilización permitiéndose apoyo y movilidad inmediata. Se tomaron estudios radiográficos a las 3 semanas del procedimiento.

### Métodos de Evaluación

La evaluación funcional se realizó teniendo en cuenta la movilidad y la marcha de acuerdo con la siguiente escala:

<b>MOVILIDAD</b>	Normal (igual a la contralateral)	3
	Disminución hasta 30°	2
	Disminución mayor de 30°	1

<b>MARCHA</b>	Normal	3
	Cojera leve (apoyo de la extremidad operada)	2
	Cojera marcada (no apoyo)	1

Al término del seguimiento propuesto se realizará una evaluación morfológica del estado de la articulación y del cartílago articular macro y microscópicamente. La evaluación histológica se hará con cortes embebidos en parafina y teñidos con Hematoxilina y Eosina y la evaluación del contenido de proteoglicanos utilizando la técnica descrita por Rosemberg utilizando tinción ortocromática con Safranina O<sup>49</sup>. La valoración histológica de acuerdo con los hallazgos de las tinciones descritas se hará utilizando las escalas propuestas por Stevenson (modificación de la descrita por Mankin en 1971)<sup>50</sup> y O'Driscoll<sup>51</sup>.

Los métodos estadísticos utilizados comprenden el cálculo de la muestra y la comparación de los resultados por grupos. El cálculo del tamaño de la muestra se hizo de acuerdo con las fórmulas diseñadas para este tipo de estimaciones cuando se busca establecer diferencias entre promedios<sup>52,53</sup> con los siguientes parámetros: desviación estándar 1,6, diferencia esperada 3,06 en la escala histológica antes citada<sup>50</sup>, nivel alfa de 0,05 y un poder de 0,9<sup>52</sup>, lo cual nos arroja un resultado de 5,7 (6 animales por grupo) para el estudio in vivo y de células para el estudio in vitro. Las diferencias observadas entre promedios de evaluación según las tablas mencionadas se compararán con pruebas de significación para comparación de promedios (test de Student)<sup>52,53</sup>.

## RESULTADOS

### Estudio "In vitro"

Tanto en los grupos de congelación sin criopreservación como en los de almacenamiento a 4°C tras una semana no se encontraron células viables luego de la digestión del cartílago con colagenasa y del estudio para viabilidad con azul de tripano. El grupo de muestras tratadas con Dimetilsulfóxido y congeladas lentamente se encontró una viabilidad del 25%.

### Estudio "In vivo"

Se tienen 6 animales por grupo, algunos de los cuales han sido descartados por infección o muerte antes del tiempo propuesto de seguimiento, los cuales han sido reemplazados. Luego de un período de seguimiento de 3 meses los resultados funcionales muestran en general buenos puntajes en los animales del grupo de criopreservación con DMSO y congelación lenta y algunos puntajes regulares en los

receptores de injertos refrigerados a 4°C y de injertos frescos. Tras 6 meses de seguimiento los resultados funcionales no muestran cambios. En el futuro se presentarán los resultados tanto funcionales como morfológicos a largo plazo (un año).

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos de la experimentación "in vitro" podemos concluir que desde el punto de vista de viabilidad celular, la criopreservación con dimetilsulfóxido previa a congelación lenta ofrece mejores resultados que el almacenamiento a 4°C y que la congelación simple.

No hemos podido alcanzar los niveles de viabilidad celular reportados por Tomford y Mankin<sup>33A</sup> a pesar del rigor técnico empleado en la reproducción de la técnica. Observamos durante la serie de experimentos realizados una mejoría en los resultados conforme se perfeccionaba la técnica. Factores que puedan influir en las diferencias con los datos encontrados en la literatura son la imposibilidad de regular con mayor precisión la velocidad de congelación y el deterioro que puede sufrir el tejido en el intervalo entre su recolección y su procesamiento, especialmente por la ausencia de un medio nutriente.

Puesto que se desconoce con certeza el grado de viabilidad celular necesario para obtener en la práctica "in vivo" buen resultado funcional y estructural, está plenamente justificado emprender un ensayo "in vivo" a largo plazo en busca de la evolución final del tejido cartilaginoso transplantado. En un futuro presentaremos los hallazgos de este experimento actualmente en curso. Las observaciones preliminares sugieren que por lo menos desde el punto de vista funcional y a corto plazo, se obtienen mejores resultados cuando se utilizan aloinjertos criopreservativos y congelados lentamente con injertos frescos o refrigerados.

## SUMMARY

Unlike other connective tissues, articular cartilage does not heal easily and completely following pathologic or traumatic afflictions. Total joint replacement offers an improvement in the quality of life of older individuals with osteoarthritis, avascular necrosis, etc but problems of loosening, breakage, infection,

preclude their general use. For the reasons just described, there has been a recent resurgence in the use of osteochondral allografts.

We used osteochondral allografts of femoral condyles in rabbits. Two different types of experiments were conducted. In the first, allografts maintained in vitro under various conditions of storage were examined. The best results with cell viability averaging 25% were found with pretreatment using 10% dimethylsulfoxide (DMSO), slow freezing and storage at -76°C. In the second type, in vivo, three groups were used (six animals in each group): in the first group we used a fresh allograft, in the second the osteochondral allograft was stored at 4°C for 1 week, after which it was transplanted, in the third the allografts were exposed to 10% DMSO, slowly cooled and stored at -76°C for one week before operation.

The most favorable results (functional evaluation) at a six month follow-up were found in the third group. We must wait at least one year, in order to obtain definitive conclusions.

Tabla 1

Conejo	Injerto	Resultado Funcional
1	R	6
2	F	6
4	R	6
5	F	6
8	F	6
9	C	6
10	C	6
13	C	6
14	F	6
17	R	4
18	F	4
19	F	4

R: refrigerado a 4°C

F: fresco

C: Criopreservado en DMSO y congelado

Se incluyen únicamente los animales que completaron 3 meses de seguimiento en el momento de la publicación.

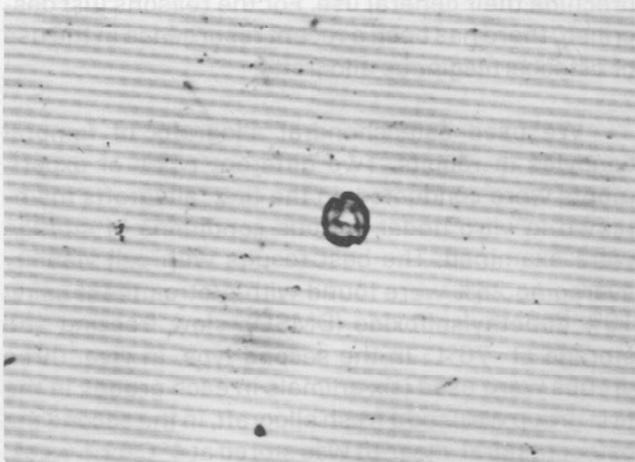


Figura 3 Microfotografía de un condrocito aislado que no capta el colorante (azul de Tripano) considerándose viable por la prueba de exclusión del colorante.

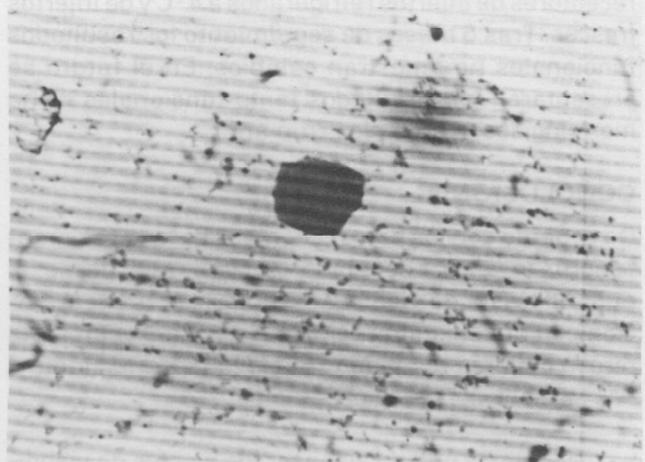


Figura 4 Condrocito aislado que capta el colorante y se considera no viable.

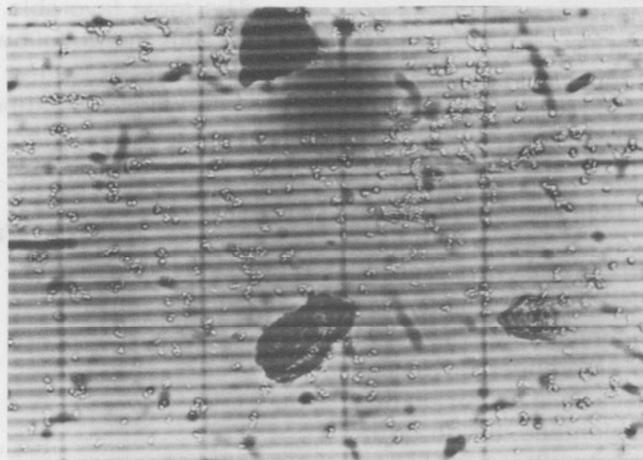


Figura 5 Microfotografía en la cual se aprecian dos condrocitos superpuestos uno de los cuales (a la izquierda) capta el colorante —no viable— y el otro no lo capta (derecha).

#### REFERENCIAS

1. BROWN K. L., and CRUESS, R.L.: Bone and Cartilage Transplantation in Orthopaedic Surgery. J. Bone and Joint Surg. 64 A: 270, 1982.
2. MANKIN, H.J., and FRIEDLAENDER H.J.: Perspectives on Bone Allograft Biology. En: FRIEDLAENDER, G.E., MANKIN, H.J., and SELL, K.W.: Osteochondral Allografts: Biology, Banking and Clinical Applications. Boston, Little Brown, 3, 1984.
3. CHESTERMAN, P.J., and SMITH, A.U.: Homotransplantation of Articular Cartilage and Isolated Chondrocytes. An Experimental Study in Rabbits J. Bone and Joint Surg. 50 B: 184, 1988.
4. MANKIN, H.J., DOPPETS, S.H., SULLIVAN, T.R., TOMFORD, W.: Osteoarticular and Intercalary Allograft Transplantation in the Management of Malignant Tumors of Bone. Cancer 50: 613, 1982.

5. MANKIN, H.J., DOPPELTS, S., TOMFORD, W.: Clinical Experience With Allograft Implantation. The First Ten Years. *Clin. Orthop.*: 174: 69, 1983.
6. MEYERS, M.H., AKESON, A., CONVERY, F.R.: Resurfacing of the Knee With Fresh Osteochondral Allograft. *J. Bone and Joint Surg.* 71A: 704, 1989.
7. CAMPBELL, C.J., ISHIDA HIROTOMO, TAKAHASHI IDEAKI and KELLY, F.: The Transplantation of Articular Cartilage. An Experimental Study in Dogs. *J. Bone and Joint Surg.* 45A: 1579, 1963.
8. CAMPBELL, C.J.: Homotransplantation of A Half or Whole Joint. *Clin. Orthop.* 87: 146, 1972.
9. DEPALMA, A.F., TSALTAS, T.T., and MAULER, G.G.: Viability of Osteochondral Grafts as Determined by Uptake of S 35. *J. Bone and Joint Surg.* 45A: 1565, 1963.
10. GOLDBERG, V.M., HEIPLE, K.G.: Experimental Hemi-joint and Whole Joint Transplantation. *Clin. Orthop.* 174: 43, 1983.
11. LANGER, F. and GROSS, A.: Immunogenicity of Allograft Articular Cartilage. *J. Bone and Joint Surg.* 56A: 297, 1974.
12. RODRIGO, J., THOMPSON, B. and TRAVIS, B.: Deep Freezing versus 4 Preservation of Avascular Osteocartilaginous shell Allograft in Rats. *Clin. Orthop.* 218: 268, 1987.
13. SELIGMAN, G.M., GEORGE, E., YABLON, I., LUTIK, G. and CRUESS, R.L.: Transplantation of Whole Knee Joints in the Dog. *Clin. Orthop.* 78: 332, 1972.
14. SEGUPTA, S. The Fate of Articular Cartilage in the Rabbit. *J. Bone and Joint surg.* 56B: 167, 1974.
15. KANDEL, R.A., et al.: Histopathology of Failed Osteoarticular Shell Allografts. *Clin. Orthop.* 197: 103, 1985.
16. BRIGHT, R.W. and BURCHARDT H.: The Biomechanical Properties of Preserved Bone Grafts. En: Fiedlaender G., Mankin H and Sell K.: *Osteochondral Allografts: Biology, Banking and Clinical Applications.* Boston, Little Brown, p. 241, 1984.
17. YABLON, I. G.: Inmune Response to Matrix Components. *Ibid*, p. 165.
18. ASTON J.E. an BENTLEY G: Repair of Articular Surfaces by Allografts of Articular and Grow Plate Cartilage. *J. Bone and Joint Surg.* 68B: 29, 1986.
19. WAKITANI S., KIMURA T., HIROOKA A., et al.: Repair of Rabbit Articular Surfaces With Allograft Chondrocytes Embedded in Collagen Gel. *J. Bone and Joint Surg.* 71B: 74, 1989.
20. RODRIGO J., and PROLO D.: Allografts. In *Operative Orthopaedics*, Edited by Chapman M.W., St. Louis, C. V. Mosby Co. p. 911, 1989.
21. ELVES M. W. A Study of The Transplantation Antigens on Chondrocytes form Articular Cartilage. *J. Bone and Joint Surg.* 56B: 178, 1974.
22. HEYNER, S.: The Antigenicity of Cartilage Grafts. *Surg. Gynec. and Obstet.* 136: 298, 1973.
23. RODRIGO J.: The Problem of Fit in Osteocartilaginous Allografts. En Eriedlaender G., Mankin H. and Sell K.: *Osteochondral Allografts: Biology, Banking and Clinical Applications.* Boston, Little Brown, p. 249, 1984.
24. HAGERTY R., BRAID H., BONNER W., HENNIGAR G. and LEE W.: Viable and Nonviable Human Cartilage Homografts. *Surg. Gynec. Obstet.* 125: 485, 1967.
25. SIMON W., RICHARDSON S., HERMAN W., PARSONS J. and LANE J.: Long Term Effects of Chondrocyte Death on Rabbit Articular Cartilage in Vivo. *J. Bone and Joint Surg.* 58A: 517, 1976.
26. RODRIGO J., SAVICH L., TRAVIS C., SMITH G.: Osteocartilaginous Allografts as Compared with Autografts in the Treatment of Knee Joints. *Clin. Orthop.* 218: 268, 1987.
27. FRIEDLAENDER G.E.: Guidelines for Banking Osteochondral Allografts. En: Fiedlaender G., Mankin H., Sell K. *Osteochondral Allografts; Biology, Banking and Clinical Applications.* Boston, Little Brown, p. 177, 1984.
28. FRIEDLAENDER G.E.: Guidelines for Banking Osteochondral Allografts. En: Fiedlaender G., Mankin H., Sell H., *Osteochondral Allografts; Biology, Banking and Clinical Applications.* Boston, Little Brown, p. 177, 1984.
29. BLACK J., SHADLE C., PARSON J. and BRIGHTON C.: Articular Cartilage Preservation and Storage. *Arthritis Rheum.* 22: 1102, 1979.
30. BONFIGLIO M.: Transplantation of Massive Bone Allografts. *New Engl. J. Med.* 294: 1285, 1976.
31. PELKER R., FRIEDLAENDER G. and MARKHAM T.: Biomechanical Properties of Bone Allografts. *Clin. Orthop.* 174: 54, 1983.
32. MALININ T., WAGNER J., PITA J., and LONH: Hypothermic Storage adn Cryopreservation of Cartilage. *Clin. Orthop.* 197: 15, 1985.
33. TOMFORD W. and MANKIN H. Investigational Approaches to Articular Cartilage Preservation. *Clin. Orthop.* 174: 22, 1983.

33. TOMFORD W., HUNG H. and MANKIN H.: Cryopreservation of Articular Cartilages Slices. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 14: 146, 1989.
34. SMITH A.: Survival of Frozen Chondrocytes Isolated from Cartilage of Adult Mammals. *Nature* 205: 782, 1965.
35. BRIGHTON C., SHADLE C., JIMENEZ S., IRWIN J., LANE J. and LIPTON M.: Articular Cartilage Preservation and Storage. *Arthritis Rheum.* 22: 1093, 1979.
36. TOMFORD W., FREDERICKS G. and MANKIN H.: Studies on Cryopreservation of Articular Cartilage Chondrocytes. *J. Bone and Joint Surg.* 66A: 253, 1984.
37. JIMENEZ S., and BRIGHTON C.: Storage and Preservation of Viable Articular Cartilage. En Friedlaender G., Mankin H. and Sell K.: *Osteochondral Allografts: Biology, Banking and Clinical Applications*, Boston, Little Brown, p. 203, 1984.
38. KWAN M., FIERER A., WAYNE J., AMIEL D., MEYERS M. and WOO S.: The Effect of Prolonged in vitro Storage on Osteochondral Shell Allografts. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 15: 227, 1990.
39. SCHACHAR N., HENRY W., WADSWORTH P., CASTRONOVO F. and MANKIN H.: Fate of Massive Osteochondral Allografts in a Feline Model. En: Friedlaender G., Mankin H., Sell K.: *Osteochondral Allografts: Biology, Banking and Clinical Applications*. Boston, Little Brown, p. 81, 1984.
40. GROSS A., SILVERSTEIN E., FALK J. and LANGER F. The Allotransplantation of Partial Joints in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee. *Clin. Ortho.* 108: 7, 1975.
41. MANKIN H., FOGELSON F., THRASHER A. and JAFFER E.: Massive Resections and Allograft Replacement in the Treatment of Malignant Bone Tumors. *N. Engl. J. Med.* 294: 1247, 1972.
42. PARRISH F.: Allograft Replacement of Whole or Part of the Ende of a Long Bone Following Excision of a Tumor. *J. Bone and Joint Surg.* 55A: 1, 1973.
43. JOFFE M., GEBHARDT M., TOMFORD W., and MANKIN H.: Reconstruction for Deffects of the Proximal Part of The Femur Using Allograft Arthroplasty. *J. Bone and Joint Surg.* 70A: 507, 1986.
44. McDERMOTT A., LANGER F., PRITZKER K. and GROSS A.: Fresh Small Fragments Osteochondral Allografts. *Clin. Orthop.* 197: 96, 1985.
45. OAKESHOTT R., FARINE I., PRITZKER K., LANGER F. and GROSS A. Clinical and Histologic Analysis of Failed Fresh Osteochondral Allografts. *Clin. Orthop.* 233: 283, 1988.
46. TOMFORD W., DUFF G., MANKIN H. Experimental Freeze Preservation of Chondrocytes. *Clin. Orthop.* 197: 11, 1985.
47. AMOS D., BASHIR H., BOYLE W., McQUEEN M. and TILLIKAINEN A.: A simple Microcytotoxicity Test. *Transplantation* 7: 220, 1969.
48. LANE J., BRIGHTON C., OTTENS H., LIPTONM: Joint Resurfacing in the Rabbit Using An Autologous Osteochondral Graft. *J. Bone and Joint Surg.* 59A: 218, 1977.
49. ROSEMBERG L. Chemical Bases for the Histological Use of Safranin O. in The Study of Articular Cartilage. *J. Bone and Joint Surg.* 53A: 69, 1971.
50. STEVENSON S., DANUSHI G., SHARKEY N., and POOL R.: The Fate of Articular Cartilage After Transplantation of Fresh and Cryopreserved Tissue Antigen Matched and Mismatched Osteochondral Allografts in Dogs. *J. Bone and Joint Surg.* 71A: 1297, 1989.
51. O'DRISCOLL S., KEELEY F., and SALTER R. The Chondrogenic Potential of Free Autogenous Periosteal Grafts For Major Full Thickness Defects in Joints Surfaces Under the Influence of Continuous Passive Motion. *J. Bone and Joint Surg.* 70A: 595, 1988.
52. DANIEL W. *Bioestadística*. México DF., Ed. Limusa, 1984.
53. DENIS R. Cómo estimar el tamaño de la muestra en investigaciones con humanos. *Acta Médica Colombiana.* 14: 92, 1989.