

Criopreservación del cartílago fisiario. Un estudio experimental en conejos

Dr. Carlos Eduardo Hernández

Dr. Víctor Gonzalo Vargas R.

Dr. José Ignacio Zapata S.*

RESUMEN

Las lesiones del cartílago de crecimiento han motivado una serie de investigaciones sobre la posibilidad de trasplantar la fisis para el tratamiento de las lesiones parciales de la placa de crecimiento.

Los resultados publicados son contradictorios y la posibilidad de trasplantar el cartílago de crecimiento criopreservado no han sido reportadas en la literatura.

Se han estudiado la interposición de diferentes materiales orgánicos e inorgánicos al igual que el autotrasplante. Pero presenta dificultades técnicas y de utilidad clínica.

El presente trabajo aplica una técnica de obtención de la fisis sin hueso metafisiario y epifisiario para asegurar la nutrición por difusión del cartílago una vez sea trasplantado; utilizamos el microscopio de disección.

Reporta además la viabilidad celular del cartílago de crecimiento del 82% una vez sometido a la técnica de criopreservación con DMSO al 10% en PBS y congelación a -70 grados centígrados. La Viabilidad ha sido evaluada mediante la técnica de exclusión de Azul de Trypano.

Estos resultados son superiores a los reportados para la criopreservación del cartílago articular.

I. INTRODUCCION

El auge de los bancos de tejidos ha despertado el interés por preservar hueso y cartílago para el tratamiento de diferentes entidades nosológicas.

Las lesiones del cartílago de crecimiento han motivado una serie de investigaciones sobre la posibilidad de trasplantar las fisis para su tratamiento. Los resultados, sin embargo, son contradictorios y en ninguna publicación de la literatura científica encontramos referencia a la utilización de aloinjertos de cartílago de crecimiento criopreservado.

Cuando pensamos en las posibilidades de reconstrucción quirúrgica de una lesión del cartílago

de crecimiento, estas serían: Primero: El autoinjerto (34); pero surge la pregunta: ¿existe una fisis en el cuerpo humano con las características biomecánicas que la hagan susceptible de sacrificarla para el trasplante? La respuesta "es tal vez no".

Segundo: Utilizar métodos de interposición en el lugar de la resección del puente fisiario de los cuales el más conocido es la interposición de grasa, sin obtener buenos resultados (26), (27), (28), (29), (35).

* Pontificia Universidad Javeriana. Instituto Colombiano de Ortopedia y Rehabilitación Franklin Delano Roosevelt. Hospital Universitario de San Ignacio. Santafé de Bogotá.

Tercero: el poder colocar un tejido similar en el lugar de la lesión, que no necesite sacrificar la función en otra área del mismo individuo, lo cual sólo se lograría con un aloinjerto. Es una alternativa muy atractiva, para una línea de investigación que últimamente ha estado dormida (9).

El presente trabajo reporta el proceso inicial para realizar trasplantes de banco de cartílago fisiario e incluye una revisión de la historia, embriología, anatomía, histología, fisiología y comportamiento biomecánico de la fisis, lesiones fisiarias y sus métodos de tratamiento, los fundamentos de la preservación de tejidos y la experiencia mundial con los trasplantes de fisis. En lo parte final reportamos nuestra experiencia con la obtención de fisis para injerto y los resultados de viabilidad con la técnica de criopreservación utilizada por nosotros. Haremos además, el estudio inmunológico, para establecer si existe una respuesta inmune contra el cartílago fisiario criopreservado trasplantado.

Todos estos estudios previos encaminados a realizar un estudio experimental "in vivo", en animales, comparando tres métodos de tratamiento para las lesiones fisiarias: interposición de grasa, autoinjertos de fisis de cresta iliaca y aloinjertos de banco criopreservados.

II. MARCO TEORICO

1. Historia

En 1726 Stephen Hales describe el hecho de que los huesos largos sólo crecen en sus extremos y que estos extremos podrían crecer a velocidad y proporciones diferentes sin que se conozca hasta la fecha la razón por la cual esto ocurre. Sus observaciones fueron confirmadas por Duhamel (1742) y Haller (1766) (5).

En 1836 Miescher estudia el crecimiento endocondral de los huesos largos y en 1845 Todd y Bowman publican el primer tratado sobre la fisis. Casi simultáneamente Sharpey, Leidy, Tomes y De Morgan hacen referencia a la fisis (5).

En 1798 Jhon Hunter presenta la teoría válida hasta hoy en día del mecanismo de crecimiento del hueso, sosteniendo que la deposición y resorción ocurre simultáneamente y que el hueso cambia continuamente su materia.

En 1858 Müller publica su trabajo clásico del mecanismo de calcificación del cartílago epifisiario, siendo el primero que trata sobre el proceso básico del crecimiento.

En 1860 Foucher publica la primera clasificación de traumas fisiarios que incluye una extensa revisión de los mecanismos de producción.

En 1867 Ollier publica sus primeros trabajos experimentales sobre lesiones de la placa de crecimiento y Bidder en 1873 prueba histológicamente la presencia de un puente óseo entre la metáfisis y la epífisis luego de la lesión de la fisis.

Nové-Joserrand en 1893 confirma las observaciones anteriores y anota que la deformidad resultante se relaciona con el tamaño de la lesión (5).

En 1898 John Poland publica su libro titulado "Separación Traumática de la Epífisis" que incluye una revisión de los reportes sobre lesiones traumáticas de la fisis de Columbus (1550), Paré (1614), Sandifort (1768), Portal (1814), Champion (1817), Gueretin (1837).

Desde entonces, en el presente siglo, muchos autores han estudiado el crecimiento longitudinal de los huesos a nivel de la placa epifisiaria (Haas 1917, Fell 1925, Harris 1926, Gatewood y Mullen 1927, Payton 1932, Policard 1941, Enlow 1962, Ham 1969).

Joseph Trueta en 1960 publica sus estudios sobre la contribución vascular a la osteogénesis, siendo hoy en día de referencia obligatoria para estudios de la placa de crecimiento (53), (54), (55). Publican también sobre la vascularización Yabsley & Harris en 1965, y Spyra & Farin en 1967 (45).

Desde entonces las investigaciones sobre la placa de crecimiento han recibido atención para mejorar los conocimientos sobre anatomía, su metabolismo, su respuesta al trauma, biomecánica y por supuesto la posibilidad de tratar sus lesiones que es el tema de nuestro trabajo.

Anatomía

A. Embriología

Durante la quinta semana de gestación del primordio de las extremidades es aparente en el embrión; este muñón de la extremidad contiene las células primitivas, las cuales son capaces de diferenciarse en toda la variedad de células mesenquimales. Una condensación de estas células ocurre en el centro del muñón, diferenciándose como precursores cartilaginosos del hueso tubular. A medida que crece, la porción central es invadida por un vaso sanguíneo, el cual trae una concentración elevada de oxí-

geno a las células, iniciándose el proceso de osificación. Este vaso, que será más adelante la arteria nutricia del hueso, envía ramas hacia los extremos proximal y distal del modelo primario de la extremidad, promoviendo la osificación.

La reabsorción de cartílago calcificado y la deposición de hueso en el segmento diafisiario del modelo cartilaginoso, se conocen como el *centro de osificación primario*, y está presente en todos los huesos largos al momento del nacimiento.

Este modelo continúa creciendo en el embrión hasta que la cubierta cartilaginosa en ambos extremos del modelo son invadidas por vasos sanguíneos, para formar los centros de osificación secundarios, denominados epífisis, las cuales a diferencia de los núcleos primarios, pueden aparecer sólo hasta después del nacimiento.

Estos dos centros separados de osificación continúan expandiéndose uno hacia el otro, pero permanecen separados por una capa de remanente cartilaginoso, conocido como la *placa de crecimiento o fisis*. La integridad de esta capa hace que el crecimiento en longitud y anchura del hueso esté garantizado.

Las *fisis* se disponen perpendicularmente al eje longitudinal del hueso y son sometidas normalmente a las cargas de compresión de las contradicciones musculares o del apoyo del cuerpo. Se describen dos grupos: de *Presión* y de *Tracción*.

A su vez las Epífisis de presión se dividen en: *Intrarticulares* como las de fémur proximal y radio proximal y *extrarticulares* como las de fémur distal y tibia proximal.

Las *Epífisis de tracción*, también conocidas como *apófisis*, están localizadas generalmente en la base de prominencias óseas, donde son sometidas a la tracción de las fuerzas musculares. La irrigación ocurre a través de vasos directos que ingresan por los tejidos blandos adyacentes, nunca se encuentran en ambiente intrarticular y su crecimiento en cierto grado está determinado por la magnitud de las fuerzas musculares que la cruzan, más que por el crecimiento de la fisis misma. Sin embargo la cantidad de crecimiento de las epífisis de tracción nunca se aproxima al crecimiento de las de presión (5), (48), (57).

B. Geometría anatómica

La primera observación que nos permite una sección longitudinal del hueso inmaduro es que la

placa fisiaria tiene el doble de diámetro de la diáfisis lo cual parece reducir la fuerza por unidad de área en la placa de crecimiento.

Segundo: La fisis no es simplemente una placa plana de cartílago que se dispone transversalmente al resto del hueso; sino que presenta pequeñas ondulaciones en la unión metafisiopisiaria lo cual representa niveles diferentes de invasión vascular y osificación y produce un aumento en la resistencia al cizallamiento. Estas irregularidades se conocen como los *procesos mamilares*.

La tercera observación tiene que ver con engrosamiento del reborde periférico de la placa fisiaria, en donde forma un fibrocartílago que se denomina el *anillo pericondral*, el cual se continúa con el cartílago articular y a su vez recibe la inserción del periostio por el otro lado (48).

C. Irrigación

La fisis anatómicamente se rodea de tres fuentes de irrigación: los *vasos epifisarios* que penetran al hueso subcondral para dar irrigación a la capa germinal; el anillo pericondral que es una extensión de la vascularización perióstica dando irrigación y aporte de oxígeno a las porciones periféricas de la placa fisiaria y ayudando al crecimiento transversal de la placa. La tercera fuente proviene del lado metafisiario de la fisis a través de los sinusoides terminales, que provienen de la arteria nutricia (45), (53), (54), (55).

Sin embargo, no todas las capas de la fisis se nutren directamente de los vasos sanguíneos, pues además los nutrientes son llevados por difusión a través de la matriz extracelular a los condrocitos, especialmente del lado epifisiario.

Los vasos metafisarios sirven como fuente de células osteoprogenitoras que depositan hueso en la matriz del cartílago calcificado, para completar la secuencia de osificación endondral.

Al parecer la importancia de la irrigación pericondral sólo tiene que ver con el crecimiento en anchura del hueso y se le da menor valor para los trasplantes (18), (32), (34), (41), (59).

3. Histología de la fisis

El examen microscópico de la fisis muestra distintas capas o zonas.

Comenzando en el lado epifisiario de la fisis se aprecia una capa de hueso subcondral a través de la

cual pasan numerosos vasos que dan irrigación a la capa de células más proximal a la epífisis del hueso. Estos vasos se disponen en asas y no entran al cartílago.

El verdadero cartílago de crecimiento ha sido dividido en tres grandes zonas denominadas: Zona de Crecimiento, Zona de Transformación del cartílago y Zona de Osificación o Calcificación Provisional (15).

La Zona de Crecimiento tiene que ver con el crecimiento en longitud y transverso, es la capa más cercana a la epífisis y está caracterizado por el crecimiento intersticial del cartílago y la proliferación de condroblastos por adición celular y mitosis. La división celular en el eje longitudinal del hueso es responsable de la disposición en empalizada de las células para el crecimiento longitudinal. Se divide en varias capas:

a. *Células en reposo, Capa germinal o Zona de reserva:* Las células en esta capa están en íntima relación con los vasos sanguíneos epifisarios. Esta zona contiene material amorfo, principalmente mucopolisacáridos, como el ácido condroitín sulfúrico y algunas proteínas, encontrándose las primeras células dispuestas solas o en parejas.

A medida que profundizamos se encuentra mayor celularidad y comienzan a disponerse en columnas.

Existen células en reposo que son elaboradas en una zona especializada del pericondrio llamada la zona de Ranvier.

Los estudios con radioisótopos demostraron la intensa actividad metabólica de esta zona por lo que el nombre más aceptado hoy día es el *capa germinal*.

b. *Capa de proliferación:* Caracterizada por división celular activa, la cual ocurre en ambas direcciones longitudinal y transversa, predominantemente longitudinal. Las células están dispuestas en un orden estricto y adosadas una contra la otra, tienen poco citoplasma y los núcleos aparecen excéntricos por la presión de las células adyacentes. En una fisis activa esta capa puede formar la mitad de la altura de ésta, siendo reflejado de la actividad de crecimiento.

c. *Capa en empalizada:* Caracterizada porque las fibras colágenas dispersas en las capas previas, se disponen longitudinalmente entre las células las cuales forman verdaderas columnas.

Cada columna tiene entre 10 y 20 células, con excepción de las fisis de la columna vertebral con 6 a 8 células.

La *Zona de transformación del cartílago:* se caracteriza por el incremento en la formación de matriz intercelular, la cual llega a ser metacromática y calcificada. En esta capa se suceden cambios bioquímicos importantes que están encaminados a una eventual osificación. Los condrocitos son hipertróficos (reflejo de su actividad metabólica) pero sin embargo algunos autores piensan que esto es más bien un signo de degeneración celular y/o transformación en osteoblastos, por el influjo del cambio en la tensión del oxígeno dado por la invasión vascular cercana a esta capa.

Puede ser subdividida en tres capas:

a. *Capa Hipertrófica:* Caracterizada por células agrandadas (5 ó 6 veces su tamaño normal) y por esto llamadas células "gigantes". Esta capa es netamente avascular, tiene una baja tensión de oxígeno, por ende su metabolismo es anaerobio, con consumo de glicógeno.

Trueta ha descrito que esta capa contiene de 4 a 12 células de forma esférica o cuboide y núcleo central y la textura de la matriz intercelular se hace más compacta delimitando claramente sus células (54).

b. *Capa de Calcificación:* En esta capa culmina el proceso de evolución de la célula como ciclo vital; la célula nace en la capa de reposo, se desarrolla en las capas intermedias y llega a esta última capa de calcificación para morir.

La expresión histológica de esta fase es el acúmulo de calcio dentro de las mitocondrias.

c. *Capa de Degeneración:* Las células comienzan un proceso de desintegración caracterizado por la deplesi3n de glicógeno intracelular, disgregaci3n de los proteoglicanos, liberaci3n del calcio mitocondrial y acúmulo de vesículas dentro de la matriz con presencia de calcio y f3sforo.

La *Zona de Osificaci3n:* es la más cercana a la diáfisis, encontrándose lagunas dejadas por aquellos condrocitos que murieron y una matriz de cartílago calcificada. Se observa la invasi3n de tejido mesenquimal, vascular, osteogénico, proveniente de la médula ósea.

La microscopía electrónica muestra cómo unos vasos tienen un sistema cerrado, que invade las columnas de células óseas (Osteoblastos) capaces de producir matriz osteoide que rápidamente será mineralizada para crear la esponjosa primaria (53).

En el proceso de remodelación desaparece este hueso inicialmente depositado, siendo reemplazado por una esponjosa secundaria madura que no contiene remanentes cartilagosos (9).

Matriz intercelular fisiaria

En cuanto a la matriz cabe anotar que el colágeno es el principal componente; es del Tipo II conformado por tres cadenas idénticas Alfa 2, tiene menos estriaciones comparado con el colágeno tipo I cuando se examina bajo microscopio electrónico.

El segundo componente es la sustancia intercelular amorfa la cual está compuesta por un grupo heterogéneo de macromoléculas denominados mucoproteínas, glucoproteínas y proteoglicanos. Esta sustancia es gelatinosa y actúa como cemento intercelular flexible que permite la difusión de la nutrición a las células (6), (9).

4. Fisiología de la fisis

Es sorprendente que a pesar de las numerosas publicaciones al respecto, muchos conceptos fundamentales sobre la fisiología del cartilago de crecimiento permanecen aún sin entenderse.

A través de los años muchas observaciones se han hecho en cuanto a la contribución de la fisis al crecimiento longitudinal.

Primero: Se reconocen cambios fisiológicos normales en la rata de crecimiento que ocurren desde el nacimiento hasta el cierre de la placa de crecimiento. El modulador exacto de estos "brotes de crecimiento" no ha sido definido. Se atribuía la regulación a la hormona de crecimiento pero los estudios han demostrado que la producción de esta hormona se mantiene constante a través de la vida (39). Otros factores serían entonces los responsables de esta respuesta.

El mecanismo sugerido actualmente es una variabilidad en cuanto a sensibilidad de los receptores celulares de la fisis a la hormona de crecimiento (5).

Igualmente llama la atención el crecimiento relativamente simétrico de las extremidades a pesar de tratarse de unidades individuales y es llamativo

cómo las extremidades que cuentan con huesos pares tienen crecimiento balanceado de sus componentes. Debe existir entonces un mecanismo local desconocido que monitoriza y regula las respuestas de la fisis.

El índice de crecimiento diferente en cada hueso se ha atribuido al grosor de la placa de crecimiento, lo cual parece ser determinado genéticamente y controlado por algún factor que regule la proliferación celular en la fisis para determinar el crecimiento final de cada una de ellas.

Parece ser que el grosor de la fisis determina además su susceptibilidad al trauma, ya que la mayor celularidad disminuirá su resistencia al trauma, sin embargo los reportes de lesiones de la placa de crecimiento muestran un patrón de mayor frecuencia en radio, peroné, tibia y húmero distales cuyas fisis son menos gruesas que las proximales de los huesos mencionados (5).

Otro aspecto reconocido es que cada fisis tiene índices de crecimiento diferentes. Ejemplo de esto es el genu varo fisiológico en donde la carga cíclica excéntrica estimularía el sobrecrecimiento del lado de la fisis que soporta la mayor compresión autocorrigiendo el varo inicial y llevándolo al genu valgo, observado hacia los tres años y la alineación final obtenida hacia los 5 a 7 años. Este mismo fenómeno ocurre cuando las lesiones fisiarias en la rodilla desarrollan puentes parciales, en donde la lesión es seguida de angulación, se desplaza la línea de carga y la fisis del lado opuesto comienza a sobrecrecer. La naturaleza trata de mantener la fisis perpendicular al eje de la diáfisis o al eje de compresión axial y por este mecanismo las extremidades tratan de realinearse (1).

A. Factores sistémicos que aumentan el crecimiento

El factor genético influye en el tamaño final de un individuo pero se desconoce el mecanismo de acción o la manera como los reguladores genéticos actúan en la placa de crecimiento.

El siguiente factor a analizar es el hormonal:

En los casos de gigantismo secundario a adenoma hipofisiario el sobrecrecimiento se ha documentado.

El exceso de hormonas tiroideas aumenta la velocidad de crecimiento pero igualmente acelera

el proceso de envejecimiento por lo que al final del crecimiento no aumentó el tamaño del individuo.

Las hormonas sexuales son factores que influyen, pues está demostrada la diferencia de estatura entre sexos.

Sin embargo, no están claras las vías de acción de los mecanismos hormonales a pesar de que no se puede negar su importancia.

El otro factor que puede influir es el nutricional, ya que la estatura de los habitantes actuales de países civilizados es mayor, lo cual coincide con la mejoría en la dieta.

Otros factores que influyen son:

- Infección: Que estimularía la irrigación sanguínea de las fisis vecinas.
- La Neurofibromatosis: es reconocida como factor de hipercrecimiento al parecer secundaria a cambios vasculares.
- La Hemihipertrofia produce mayor crecimiento del lado afectado, el factor parece ser de origen nervioso central sin embargo, no se ha identificado (5).

Finalmente la influencia mecánica sobre la fisis por cargas compresiva cíclicas y estáticas mantiene un equilibrio extremo:

La compresión excesiva puede disminuir el crecimiento pero la compresión moderada puede aumentarlo (1).

Las fuerzas musculares parecen ser el modulador más importante en el proceso de crecimiento; los pacientes con polio presentan acortamiento de sus extremidades flácidas a pesar de que realicen apoyo de la extremidad, en el polo opuesto están los pacientes confinados a cama quienes pueden presentar crecimiento a pesar de no realizar carga compresiva de sus extremidades pero que realizan contracción intermitente de su musculatura lo cual sería el factor que determinaría su crecimiento.

B. Factores sistémicos que disminuyen el crecimiento

Son más reconocidos y aún prevenibles. La influencia de una adecuada dieta en el niño en crecimiento indudablemente resulta en un normal desarrollo constitucional y mental.

Los cambios hormonales que pueden retardar el crecimiento están bien reconocidos:

La deficiencia de hormona de crecimiento produce enanismo; a causa de que las células fisiarias se encuentran con menor número de mitosis, la zona proliferativa está disminuida y la placa es muy delgada. Llama la atención el hecho de que en estos pacientes, las fisis permanecen abiertas por mayor tiempo incluso hasta la mitad de la vida adulta.

La deficiencia de hormona tiroidea produce cretinismo y alteración en el metabolismo de los mucopolisacáridos, las placas de crecimiento nunca se cierran, el crecimiento longitudinal se disminuye y los núcleos de osificación secundarios aparecen tardíamente.

La administración de estrógenos puede producir un "brote de crecimiento" inicial pero ocurre un cierre de la fisis tempranamente disminuyendo así el crecimiento final. La testosterona parece tener el mismo efecto inicial aumentando la proliferación de las columnas de células dentro de la fisis pero simultáneamente aumenta la deposición de hueso y produce el cierre de la fisis masculina.

La hormona ACTH indirectamente a través de la cortisona tiene efecto supresivo en la producción de hormona de crecimiento reduciendo así la actividad de la placa de crecimiento.

Adicionalmente las deficiencias o excesos de ciertas vitaminas producen alteración del crecimiento longitudinal del hueso.

Como se mencionó anteriormente las enfermedades neuromusculares como el polio, el trauma raquímedular, etc., tienen efecto deletéreo en el crecimiento local de la fisis del individuo. Esto es más evidente cuando el compromiso no es generalizado.

C. Factores locales que aumentan el crecimiento fisiario

El primer factor reconocido es la presencia de una fractura en las cercanías de la fisis, es por esto que se permite el cabalgamiento de los extremos fracturarios en las fracturas diafisiarias de fémur.

Se han estudiado mecanismos para tratar de estimular localmente el crecimiento fisiario lo cual incluye: Fístulas arteriovenosas, diatermia de onda corta, simpatectomía lumbar, colocación de cuerpos extraños y aparatos metálicos en el hueso además maceración del perióstio metafisiario (5).

Se han publicado además estudios "in vitro" buscando la estimulación del crecimiento, estos incluyen:

Uso de corriente, el cual es crítico ya que ciertos voltajes pueden producir el efecto contrario (6).

La concentración de Oxígeno al 21% puede estimular el crecimiento, pero concentraciones superiores e inferiores pueden incluso ser tóxicas y producir el cierre fisiario (6).

Más recientemente se han intentado las distracciones fisiarias; las cuales no sólo, no estimulan el crecimiento sino que pueden producir el cierre prematuro de la fisis, por lo que su utilidad está reservada para pacientes cercanos a la madurez esquelética (11), (12), (13), (14), (16).

D. Factores locales que disminuyen el crecimiento fisiario

El principal factor estudiado es el trauma, a partir de esta observación se han realizado tratamientos con cerclajes de alambre y grapados a las fisis para alterar su crecimiento y más recientemente se han realizado lesiones selectivas con rayo láser para producir efecto de epifisiodesis (5).

Otro factor estudiado es el referente a las lesiones vasculares, encontrado en la osteomielitis y la enfermedad de Legg-Calve-Perthes que producen destrucción de la placa de crecimiento bien por efecto directo o por lesión de la circulación local y que crea un defecto central de crecimiento y la lesión en "cono" o "tienda" descrita en asociación a estas entidades (4), (45). Este factor vascular ha recibido atención por el grupo de investigaciones en microcirugía para tratar de transplantar fisis microvascularizadas (3), (32).

E. Crecimiento latitudinal de la fisis

Se ha creado controversia acerca de la manera como ocurre el crecimiento en el eje transversal de la fisis. Para algunos el crecimiento ocurre por proliferación aposicional de células cartilaginosa circunferencialmente en la periferia, mientras otros creen que el crecimiento intersticial ocurre en el centro de la placa de crecimiento (23).

Es importante reconocer que la mayoría de los anatomistas están de acuerdo en que el anillo pericondral de Lacroix y el surco de Ranvier están íntimamente involucrados en el aporte de células a la capa germinal, una vez esta capa se ha expandido

en latitud, es capaz de aportar células por debajo para ayudar a la expansión en longitud (23), (44).

F. Detención del crecimiento de la fisis

Se reconoce que la fisis va siempre al cierre en los humanos, este proceso fisiológico es conocido como la "epifisiodesis fisiológica".

El proceso comienza con la formación de pequeños puentes óseos entre el centro de osificación de la epífisis y la metáfisis y termina con el reemplazo completo de la fisis cartilaginosa por tejido óseo.

Cada fisis parece tener su propio patrón de cierre. Muchos cambios ocurren en el proceso y lo que está claro, es que se trata del mismo proceso que ocurre en las fisis lesionadas focalmente.

Histológicamente se aprecia primero un engrosamiento de la placa ósea cribiforme del lado epifisiario de la fisis, a continuación se aprecia el mismo proceso en el hueso metafisiario vecino con la formación de septum óseos transversos en lugar de las trabéculas óseas longitudinales.

La disposición de las células de la fisis no cambia mientras este proceso está iniciando, sin embargo cesa la proliferación celular alterándose la bioquímica de la matriz celular con calcificación y mineralización progresivas que se extienden a la capa germinal y de reposo formando frentes de calcificación.

Las columnas de células son reemplazadas rápidamente a medida que se van calcificando.

La extensión de la osificación desde ambos lados lleva a la perforación de la fisis por múltiples puentes óseos pequeños. La osificación progresa entonces, desde estos puentes, termina por reemplazar el cartilago y deja una cicatriz o fantasma fisiario consistente en una capa densa a los Rx (6), (9).

Generalmente el proceso comienza en el centro de la fisis y se extiende hacia la periferia en forma centrifuga. Sin embargo, en algunas fisis el proceso puede ser diferente como en la tibia distal en donde ocurre primero en las porciones interna y central y luego en la parte externa y la hace susceptible a cierto tipo de lesión durante esta época de la vida. (La fractura de Tillaux).

La epifisiodesis fisiológica inicia más temprano en las mujeres que en los hombres pero en ambos

sigue más o menos el mismo patrón de hueso a hueso. El cierre más temprano en las mujeres parece deberse al efecto de los estrógenos que aceleran el reemplazo del cartílago y la maduración ósea.

5. Biomecánica de la fisis

La fisis está constituida por material no homogéneo cuyo lado epifisiario contiene una matriz intercelular con escasas células en la capa germinal, mientras su matriz es escasa con células hipertróficas en el lado metafisiario de la placa, por lo cual su comportamiento biomecánico debe ser analizado como una estructura "bifásica" o anisotrópica (5), (6).

Se entiende así, la fisis se comporta como un material viscoelástico, es decir un material que responde a una carga constante en forma variable dependiendo del tiempo. Si el material es cargado, éste se deforma inicialmente mediante la salida de líquidos intersticiales hasta alcanzar una meseta en la cual la deformación ocurre en menor grado hasta alcanzar el punto de equilibrio en el cual se suspende la salida de líquidos intersticiales ya que las cargas dentro de la matriz igualan a la carga aplicada. Interviene un factor que no está aún estudiado para la fisis que se conoce como la permeabilidad la cual depende de la viscosidad del líquido intersticial y el tamaño de los poros de la matriz.

Estos factores analizados anteriormente serían de diferente comportamiento en cada capa, con lo cual la fisis se torna muy compleja para el análisis de su biomecánica.

La fisis se ve sometida a fuerzas de: tensión, compresión y cizallamiento. Estas fuerzas se reparten dentro del material de la fisis de una manera que depende de la magnitud de la carga. Así, al aplicar tensión la fisis estaría en tensión en el plazo horizontal mientras recibiría compresión en el plano vertical, además recibiría fuerzas de cizallamiento en un plano a 45 grados del eje de aplicación de la carga.

En un estudio experimental realizado por Harris en 1950 en el que estudia los efectos de las hormonas en el deslizamiento epifisiario, utilizando fisis proximal de tibia, se demuestra que las fisis de los animales tratados con hormona de crecimiento eran más susceptibles a las cargas transversales mientras que los animales tratados con estrógenos resistían cargas mayores, lo cual se relacionó con la anchura de la fisis (18).

En 1968 Bright demostró en un estudio experimental como la fisis requería de altas cargas en tensión para producir el deslizamiento, las fuerzas de "doblamiento" tenían que ser un poco menores para producir la falla y como las fuerzas de torsión necesitaban la menor magnitud para producir el efecto de deslizamiento de la fisis (5).

Los exámenes histológicos de la fisis mostraban cómo las fisis sometidas a tensión se deslizaban por la capa germinal mientras en los otros dos grupos la falla iniciaba a través de la capa de células hipertróficas en la superficie de tensión y luego tomaba una dirección variable a través de la placa de crecimiento para alcanzar nuevamente la capa hipertrófica antes de completar la lesión. Estas observaciones estaban en contra de los reportes previos, según los cuales el deslizamiento ocurría siempre a través de la capa de células hipertróficas (5).

6. Lesiones traumáticas del cartílago de crecimiento

Se han realizado numerosos estudios experimentales sobre el mecanismo de la lesión fisiaria. Ollier en 1867, utilizando modelos animales (conejos y gatos) hizo incisiones lineales a través de la fisis sin producir lesión de las capas más profundas. Volt fue incapaz de producir un daño al separar la epífisis de la metáfisis a través de la línea de clivaje en la fisis (48).

Se explica la debilidad de la placa fisiaria por la cantidad de matriz intersticial que favorece la adhesividad, por ende la capa de células hipertróficas es la más débil en el sistema y es en este sitio donde se producen la mayoría de las lesiones traumáticas agudas de la fisis (33).

La fisis soporta mal las cargas de cizallamiento, angulación y tensión pero no las de compresión.

La zona de calcificación se ve reforzada en su fortaleza por la aparición de la matriz osteoide y por las trabéculas primarias; que se adhieren fuertemente a la metáfisis.

Haas y Harris (18), (48) demostraron que después de retirar el pericondrio la fisis se deslizaba constantemente a través de la capa de células hipertróficas (36).

Dependiendo del nivel de la fractura en la fisis se describen tres patrones de reparación (4):

1. Cuando la lesión es proximal a la capa de células hipertróficas, la reparación se da por un

incremento rápido y continuo del número de células en la capa de células columnares causando un aumento en la altura de la fisis. La cercanía de los vasos epifisarios a la lesión causa resorción del cartílago proximal y debridamiento de la fractura, demorando así la osificación endocondral resultando en una apariencia normal de la fisis. La duración de este proceso es de aproximadamente 3 semanas.

2. Si la fractura es más distal o más profunda a través de la transición entre las células hipertróficas y la esponjosa primaria (la más frecuente de las lesiones) generalmente se produce una marcada separación que es llenada por tejido hemorrágico y fibroblástico, en ocasiones resultando la formación de un callo cartilaginoso desorganizado hacia el lado diafisiario mientras que el proceso de diferenciación celular hacia el lado de la epífisis continua sin ninguna alteración.

Este callo cartilaginoso se ve invadido por vasos metafisarios con la consecuente deposición de hueso y varía de grosor dependiendo de qué tanto desplazamiento longitudinal lateral haya ocurrido.

El callo en la región subperióstica contribuye a la estabilidad temprana; esta región consolida por invasión vascular para formar hueso trabecular entre la corteza metafisaria original y la membrana subperióstica.

Estas regiones progresivamente limitan y remodelan el callo haciéndolo cada vez más fuerte biomecánicamente.

Este proceso toma de 3 a 6 semanas, sin embargo la remodelación podría tomar meses o inclusive años, de aquí la posibilidad siempre esperada de corrección espontánea en el tratamiento de las lesiones traumáticas del cartílago de crecimiento.

3. Si se compromete todo el espesor de la fisis, el proceso de reparación difiere ligeramente. El tejido fibroso inicialmente llena los espacios entre la epífisis metafisis, alterándose de esta manera la arquitectura normal de la fisis; entonces el proceso de reparación se hace incompleto. El tamaño del defecto y la cantidad de tejido fibroso es muy importante en la fisiopatogenia de un puente óseo y el cierre fisiario prematuro.

Si el tejido fibroso es pequeño y se ha formado cerca de la edad de la madurez esquelética la posibi-

lidad de que este tejido sea invadido por neovascularización es poco probable. Por el contrario si el defecto es grande y se produjo lejos, en tiempo del cierre fisiario, la posibilidad de ser invadido por tejido vascular es muy alta; con la consecuente alteración de la tensión de oxígeno y el depósito de sales de calcio en el tejido fibroso; de esta manera se produce un puente óseo que llevaría a un arresto fisiario y los consecuentes desastres en el crecimiento.

Campbell, Grisola y Zanconato (8) estudiaron las consecuencias sobre el crecimiento en las lesiones producidas deliberadamente a las fisis de modelos animales, concluyendo que:

- a. La lesión es directamente proporcional a la cantidad de destrucción fisiaria.
- b. Si el defecto fisiario es muy grande éste es llenado por tejido fibroso o indiferenciado.
- c. El hueso puede continuar su crecimiento en longitud si el puente óseo formado es muy pequeño.
- d. Los clavos lisos y los de bajo calibre no producen un daño mayor de la fisis.
- e. Los clavos roscados y los tornillos sí producen un arresto epifisiario.

7. Tratamiento de los arrestos epifisarios

De toda la gama de lesiones al cartílago de crecimiento, sólo nos referiremos al cierre parcial o total de éste: por ser el interés del presente trabajo.

La más temida complicación de las lesiones fisiarias, es la alteración o cesación permanente del crecimiento longitudinal.

Si el arresto fisiario es completo resulta en una discrepancia de longitud de la extremidad afectada (21). Pero si el arresto del crecimiento es parcial, se desarrolla una deformidad angular progresiva, si el puente óseo es periférico. Por el contrario, si el puente es central un acortamiento progresivo puede ocurrir.

Los cierres parciales han sido clasificados en tres tipos (5):

- Tipo I: Periférico.
- Tipo II: Central.
- Tipo III: Lesión combinada.

El tipo I, compromete el anillo pericondral. El tipo II, en el cual todo el anillo pericondral está intacto además de algunas porciones de la placa fisiaria periférica especialmente en el borde que rodea la metáfisis. El tipo III, corresponde a las secuelas de lesiones tipo Salter-Harris III y IV.

La incidencia es: Tipo I: 60%; Tipo II: 21%; Tipo III: 19%.

Decidir una intervención quirúrgica para arrestos epifisarios es difícil, y deben ser tenidos en cuenta estos criterios (5):

1. *Radiológico*: No es posible predecir las consecuencias de una lesión aguda y si causara o no un arresto fisiario. Se recomienda el estudio prequirúrgico con tomografía lineal.

2. *Tamaño de la lesión*: Las lesiones mayores al 50% son técnicamente difíciles de resear.

3. *Historia de Infección*: La resección del puente debe hacerse cuando se esté seguro de que no hay infección (6 meses).

4. *Cubrimiento de piel*: En caso de lesiones por trauma de alta energía o velocidad con pérdida de la piel, se recomienda practicar primero un buen cubrimiento cutáneo sobre la fisis antes de la resección del puente.

5. *Crecimiento esperado*: Preferiblemente se deben operar pacientes con edad cerca al cierre fisiario o cuando el remanente de crecimiento esperado no sea mayor de dos años.

Con destreza y una técnica depuradas en la resección del puente óseo fisiario, se han obtenido buenos resultados iniciales. Pero el puente puede volverse a formar en especial cuando se está lejos de la madurez esquelética (5).

Se han seleccionado varios materiales para interponerlos en el sitio de la resección para evitar la formación del puente óseo (5), (7), (9), (19), (21), (24), (26), (27), (28), (29), (35), (58). Entre los más usados están: la grasa autógena, silicona con metilmetacrilato (MMA) y el xenoinjerto de cerdo.

Osterman (53) en 1972, obtuvo buenos resultados con injerto de cartilago de cerdo 75%, con grasa 65% y 50% con cera ósea.

El precursor de la técnica de la interposición del autoinjerto de grasa de la región glútea fue Langenskiold (26) en 1967.

En 1979 se unieron los experimentos en humanos de Osterman y Langenskiold (28) con autoinjertos de grasa y se obtuvo 54% de buenos resultados; 18% regulares y pobres en 28% de los pacientes.

Langenskiold (29), observó que la cavidad que queda después de reseado el puente y luego injertado con grasa, aumentaba de tamaño, dejando un gran espacio en la región metafisiaria del hueso durante el crecimiento. Esto ha sido en trabajos experimentales (Langenskiold (29) 1986), que demostraron revascularización de la grasa y su consecuente crecimiento intraóseo.

Bright con la utilización de silicona con MMA (Elastometer Nº 382), obtuvo en 250 casos 70% de buenos a excelentes resultados, 12% de regulares y 18% pobres. Estos pacientes tenían puentes que comprometían sólo hasta el 30% de la fisis y faltaba un año para el cierre fisiario (5).

En los últimos años se han utilizado técnicas de distracción fisiaria con o sin osteotomía redireccional, pero este método hace que la fisis se cierre más rápido, llevando a una discrepancia de longitud de las extremidades al término del tratamiento (9), (11), (12), (13), (14), (16).

Por esto los procedimientos de distracción fisiaria no son recomendaciones sino en pacientes con fisis cerradas o muy cerca de la madurez esquelética, debido a que se retarda el crecimiento en un 40%—70%, después de terminada la distracción (9), (14), (16), (60).

8. Transplantes fisiarios

La posibilidad de restaurar o de aumentar la longitud de un hueso mediante el uso de un trasplante de la fisis ha motivado la investigación en los últimos noventa años.

Helferch en Alemania (1899) trasplanta la totalidad de la epífisis distal del radio junto con un fragmento de metáfisis en un perro y a pesar de que reporta crecimiento luego del trasplante, no reporta un estudio histológico que lo sustente (59).

Rehn y Wakabayasi, en un trabajo en conejos en 1912, concluyen que la fisis trasplantada, mantiene su potencial de crecimiento (59).

Heller en 1914 encuentra que al reimplantar la placa epifisiaria distal del cúbito, ésta fallaba si el implante contenía algún fragmento de hueso adyacente, y que por el contrario los resultados mejoraban cuando se resecaba todo ese hueso. Sugiere que el hueso adyacente interfiere con la nutrición de la fisis transplantada (18), (41).

En 1929 Straub reporta la primera aplicación clínica de un trasplante de fisis en un niño de 6 años quien dos años antes había presentado una lesión fisiaria por osteomielitis en la tibia distal y presentaba un acortamiento de 4.5 cms. El injerto fue tomado del maléolo tibial opuesto y colocado en el defecto. A los 20 años de edad el acortamiento era de 5 cms y se interpretó como un trasplante exitoso. Sin embargo, el resultado pudo deberse o bien a que la lesión era incompleta o a hipercrecimiento de la placa proximal (59).

En 1939 Bisgard coloca una epífisis femoral en la diáfisis de una tibia de cabra encontrando que la epífisis no produjo crecimiento (18).

La supervivencia del cartílago fisiario trasplantado fue valorado en otro tipo de estudios por Lacroix en 1951 (23) y Urist y MacLean (56) quienes trasplantaron fisis a la cámara anterior del ojo y cápsula renal. Los hallazgos fueron similares: Los fragmentos crecían durante las primeras tres semanas al cabo de los cuales cesaba el crecimiento y la razón dada para que esto ocurriera, fue de tipo inmunológico.

En 1955 Ring (41) conduce un estudio experimental en conejos aportando consideraciones interesantes: La placa fisiaria tiene polaridad y siempre debe colocarse en forma anatómica para asegurar el éxito del trasplante, segundo: los trasplantes pueden tener reacción inmunológica que explicaría los fracasos y tercero: La clave de la supervivencia del injerto puede estar en la vascularidad. Sus resultados son pobres y se le critica el hecho de dejar una pequeña capa de hueso adyacente en el fragmento para el trasplante.

En 1959 Freeman reporta un caso de injerto pediculado compuesto de epífisis para la reconstrucción de pulgar con resultado excelente a los seis años de seguimiento (59).

En 1965 Harris, Martin y Tile presentan un estudio experimental en conejos transplantando fisis de cúbito distal y obteniendo resultados satisfactorios en el 50% de los autoinjertos a las doce semanas de

seguimiento; los homoinjertos fueron rechazados hacia la cuarta semana en todos sus casos. El análisis del fracaso incluye: Falla en incluir la capa germinal en el fragmento trasplantado, irrigación inadecuada para el injerto y aflojamiento del mismo en el lecho; todos estos errores son corregibles con mejoría de la técnica quirúrgica.

Los injertos en este estudio son tomados sin dejar ningún tejido diferente a la fisis y es el que mejores resultados reporta (18).

En 1984 Olin, Creasman y Shapiro publican un trabajo en el que transplantan injertos libres de fisis de cresta ilíaca a defectos focales en la fisis del fémur distal en conejos con resultados excelentes en un 70% de los casos en cuanto a prevención de la formación de puentes, retardo de crecimiento y deformidades angulares. Los injertos fueron tomados con énfasis en retirar el anillo pericondral y la capa más externa de fibrocartílago incluyendo solamente una delgada capa de cartílago epifisiario con disecciones bajo microscopio, para evitar que la nutrición por difusión del injerto sufriera interferencia (34).

A partir de entonces los estudios se han enfocado hacia el trasplante de condrocitos aislados y el auge de los injertos microvascularizados sin que se vuelva a hacer referencia en la literatura al trasplante libre.

Mencionamos las publicaciones de Bowen y O'Brien (1988) con investigaciones en injertos microvascularizados con buenos resultados cuando se preservaban tanto la circulación metafisiaria como los vasos epifisarios (3).

En 1990 Lalanandham publica un trabajo experimental sobre la viabilidad y metabolismo del cartílago fisiario trasplantado como injerto libre, demostrando que continúan sintetizando proteoglicanos pero no logra demostrar que continúen creciendo a la velocidad normal (24).

Toda la evolución histórica antes referida nos permite sacar en claro los siguientes: Los injertos de fisis requieren una técnica quirúrgica muy cuidadosa para asegurar la nutrición por difusión cuando se transplantan como injertos libres, ya que los fragmentos de hueso epifisiario y metafisiario dejados con el injerto explicarían los malos resultados en las primeras publicaciones al respecto.

Los injertos microvascularizados, a pesar de reportar buenos resultados en el campo experimen-

tal, no tienen aplicabilidad en la clínica por la implicación de sacrificar una fisis sana.

Resulta entonces muy atractivo combinar la técnica quirúrgica estricta de obtención de la fisis descrita por Olin con injertos de banco, tema sobre el cual no encontramos publicado nada en la literatura. Con esto se obviarían varios problemas del trasplante de fisis: No sacrificaría fisis sana, no implicaría cambios mecánicos y acortaría tiempo quirúrgico.

9. Criopreservación del cartílago fisiario

Se han diseñado múltiples estudios experimentales tratando de conservar las células cartilaginosas de cartílago articular especialmente, con resultados contradictorios.

Sin embargo, avances en la criopreservación se han obtenido con protocolos que utilizan Dimethyl Sulfoxido (DSMO) de 7.5% a 10% como crioprotector, congelación lenta hasta menos 70 grados centígrados y descongelación rápida (42), (43), (50), (51), (52). No obstante, los estudios dirigidos directamente sobre la fisis o células del cartílago de crecimiento son escasas; en especial porque en este tejido es importante conservar la arquitectura normal y esto hace difícil la penetración de sustancias crioprotectantes dentro de la matriz cartilaginosa.

Resultados alentadores han sido publicados para el cultivo de condrocitos aislados tanto de cartílago epifisiario como de la placa de crecimiento.

Cuando se contempla la posibilidad de trasplante alogénico de fisis se hace imperioso el trasplante completo y total de un segmento fisiario sin alteración de su micronatomía.

Pensamos que los protocolos de criopreservación cartílago articular son extrapolables a la fisis. En especial si entendemos las bases de la criopreservación.

Se han utilizado como crioprotectores al glicerol y posteriormente al DSMO (42), (43). La mayoría de los estudios de criopreservación nacieron de observaciones empíricas y de ensayo y error. El hecho de que el cartílago sea un tejido muy rico en agua hace que se comporte de manera especial a muy bajas temperaturas.

Los estudios con glicerol por Polge (37) (1949) y Chesterman (10) y Smith, quienes compararon

diferentes técnicas de crioprotección obtuvieron una mínima viabilidad celular.

Durante el proceso de congelación el problema se plantea por la diferencia de osmolaridad intra y extracelular, cuando los puntos de congelación del agua difiere del de las soluciones ricas en solutos. Se pretende explicar de una manera simplista pero clara el proceso de la criopreservación: Cuando se congela el agua los solutos que están libres aumentan la concentración osmolar extracelularmente exponiendo de esta manera a la célula a una posible deshidratación. Más tarde en el proceso contrario de descongelación la célula se encontraría con una concentración de solutos mayor que el agua extracelular que comienza primero a descongelarse y por ende la célula se hidrataría hasta estallarse (42), (43).

Las observaciones sobre las soluciones salinas, congelaciones y descongelaciones rápidas y lentas han permitido observar que la congelación lenta y la descongelación rápida dan la mayor sobrevida.

La función de los crioprotectantes no está clara, pero parece que estabiliza la membrana celular al paso de solutos y evita la congelación o cristalización del citoplasma.

Los estudios de toxicidad del DMSO y glicerol sobre la célula arrojan resultados a favor de la incubación a 4 grados centígrados con concentraciones de DSMO entre 7.5% y 10% por tiempos de 5 a 105 minutos y congelados a ratas de 5 grados centígrados por minuto y congelación rápida (42), (43).

Sin embargo, el hecho de que los condrocitos estén dentro de una matriz cartilaginosa hace más lenta la difusión del DMSO y por ende el tiempo de exposición debe ser mayor (31). Tomfort demostró que el cartílago intacto soportaba hasta 24 horas de incubación con DMSO sin alteraciones tóxicas para las células (50), (51), (52).

El efecto del DMSO sobre el cartílago fisiario intacto, condrocitos fisiarios aislados y resultados de viabilidad después de criopreservación no han sido publicados en la literatura inglesa hasta el momento del presente trabajo.

En nuestro medio Jiménez, Gutiérrez, Soto y Carrillo (17) publican un estudio de técnicas de criopreservación de cartílago articular intacto con un 25% de recuperabilidad de condrocitos; más estudios de viabilidad funcional no han sido reali-

zados sobre los condrocitos aislados de cartílago articular intacto criopreservado.

Los estudios en condrocitos aislados criopreservados muestran una recuperabilidad del 86% confirmada por el test de exclusión celular de azul de trypano (Tavakol y cols, datos no publicados, citado por Friedlaender y Goldberg en Bone and Cartilage Allograft). Tomford y Mankin (50), (51), (52) reportan 70% al 80% de viabilidad. La recuperabilidad de condrocitos de cartílago criopreservado intacto congelado y descongelado, se observó una viabilidad de 38.7% y funcional del 94.5% (Tavakol y cols) (49).

Los análisis de trasplantes criopreservados de cartílago articular en modelos animales "in vivo", parecen mostrar una respuesta inmune que va en deterioro del éxito del cartílago trasplantado (25), (30), (42), (43).

10. Inmunología del trasplante fisiario

Los avances en el conocimiento del comportamiento inmunológico de las células trasplantadas, logrado mediante cultivos celulares, ha dirigido la atención de los investigadores como la explicación de los malos resultados a largo plazo en la práctica clínica de los aloinjertos osteocondrales (61).

Se acepta que el cartílago intacto no produce inmunogenicidad, debido a que la matriz en que se encuentran embebidos enmascara los antígenos celulares (46), (47).

Se ha demostrado que el condrocito porta los mismos antígenos de histocompatibilidad Clase I a los cuales el organismo receptor desarrolla anticuerpos al entrar en contacto con las células óseas o de la médula ósea (20), (22), (25), (30).

Además el condrocito articular de conejo porta antígenos Clase II de Histocompatibilidad y pueden actuar como "presentadoras" de antígenos in vitro (25), (30).

Los aloinjertos osteocondrales congelados, son inmunogénicos en humanos, desarrollando anticuerpos contra antígenos de histocompatibilidad según lo demuestran los trabajos de Mankin, Rodrigo, Lee y Vriesendorp (40), (46).

Evans demostró cómo, una vez desarrollada la respuesta inmune, el cartílago se hace vulnerable a la lesión directa por anticuerpos citotóxicos, por

linfocitos o por mediadores de la inflamación (40), (46).

La congelación disminuye la respuesta inmunológica. No se ha logrado probar el mecanismo por el cual se logra pero se propone que la congelación altera las propiedades de los antígenos disminuyendo su poder. Por otra parte, aparece el problema de la viabilidad celular que se ha discutido anteriormente (50), (51), (52).

Igualmente estudios "in vitro" han probado que el DMSO tiene efecto directo en los procesos inmunológicos (42), (43).

Recientemente se ha sugerido que la matriz y sus componentes desarrollan inmunogenicidad, lo cual sería de tanta o más importancia que la inmunogenicidad celular (30).

Los trabajos han conducido al uso de inhibidores de la respuesta inmune en estudios "in vitro" y esto disminuye la respuesta inmune y mejora la supervivencia de los trasplantes pero las implicaciones tóxicas en un modelo "in vivo" limita la aplicación de los alotrasplantes (30).

Nuestra intención al concluir la primera fase de este trabajo es profundizar en el estudio inmunológico del cartílago fisiario y el comportamiento de segmentos en bloque en su matriz como pensamos que deben trasplantarse.

III. JUSTIFICACION

Los buenos resultados obtenidos por Tomford y Mankin con la utilización de Dimetilsulfóxido (DMSO) con crioprotectivo con métodos de congelación lenta y descongelación rápida en aloinjertos osteocondrales, nos da pie para extrapolar esto al cartílago fisiario.

Por esto quisimos realizar un trabajo que permitiera demostrar que el cartílago de crecimiento es susceptible de ser preservado y trasplantado con éxito, buscando indicación terapéutica en las lesiones de la placa fisiaria para corregir o prevenir deformidades angulares y acortamientos.

Como parte inicial del estudio quisimos realizar una valoración de la viabilidad "in vitro" del cartílago de crecimiento previo al trabajo "in vivo" en modelos animales. Simultáneamente se estandarizó una técnica de obtención de las fisis para trasplante de fácil utilización en nuestro medio.

La segunda fase incluirá un estudio del comportamiento inmunológico del cartílago fisiario del injerto en bloque criopreservado.

En la fase final se realizará un estudio comparativo con autoinjertos frescos, aloinjertos de banco e interposición de grasa para el tratamiento de las lesiones fisiarias.

IV. HIPOTESIS

"La placa de crecimiento puede ser sometida a procedimientos de criopreservación con Dimetilsulfóxido con resultados de viabilidad iguales a los reportados por la literatura para cartílago articular".

V. PROPOSITOS

Demostrar el efecto de la criopreservación celular en el cartílago fisiario para utilizarlo en un modelo experimental "in vivo" en animales a la manera de aloinjertos.

VI. OBJETIVOS

1. Utilizar la técnica de criopreservación con DMSO y congelación lenta en cartílago fisiario.
2. Demostrar el porcentaje de viabilidad celular de la fisis con la técnica de criopreservación, utilizando coloraciones específicas para este propósito.
3. Estandarizar una técnica de obtención de la fisis que permita la criopreservación y almacenamiento.

VII. POBLACION BLANCO

Conejos blancos Nueva Zelanda.

VIII. POBLACION A ESTUDIO

Conejos blancos Nueva Zelanda en edades comprendidas entre los 45 y 90 días.

IX. VARIABLES DEPENDIENTES

1. Técnica de obtención de la fisis para trasplante.
2. Técnica de criopreservación con DMSO.
3. Proceso de congelación lenta de las fisis hasta -70 grados centígrados.
4. Descongelación rápida de las fisis.

X. VARIABLES INDEPENDIENTES

1. Edad
2. Sexo

3. Peso
4. Raza de los conejos

XI. MATERIALES Y METODOS

Se trata de un trabajo experimental "in vitro" para reproducir, comprobar y estandarizar la técnica de obtención de injertos de fisis para ser sometidos a criopreservación mediante congelación lenta y comprobar su viabilidad antes de proceder a la aplicación "in vivo" en un modelo animal experimental comparativo.

Se tomarán conejos blancos Nueva Zelanda en edades entre 45 y 90 días a quienes se les extraerán las fisis de cresta ilíaca posterior, radio y cúbito distales y fémur distal.

XII. PROCEDIMIENTO

A. Técnica de obtención de las fisis

Se extrajeron las fisis de cadáver fresco de conejo (menor de 1 hora de muerto), con técnica estricta de asepsia y antisepsia.

Para la cresta ilíaca se practicó un abordaje posterior siguiendo el reborde de la cresta ilíaca posterior, se liberan las inserciones musculares, preservando el periostio. Con cizalla se extrae la cresta con la fisis, la epífisis y un fragmento óseo metafisiario.

Para el cúbito y radio distal se hizo un abordaje lateral en el extremo distal del antebrazo y se reseca el extremo distal de ambos huesos.

El fémur distal es extraído mediante abordaje lateral, liberación de los ligamentos de la articulación de la rodilla y de los músculos insertos; finalmente con cizalla se extrae el extremo distal del fémur.

B. Técnica de preservación

Los fragmentos son mantenidos en suero fisiológico con altas concentraciones de antibiótico (Cefalotina).

Mediante el uso de microscopio de disección se comprueba la extracción de la placa de crecimiento. Deslizándose por la unión de la capa de células hipertroficas y la capa de cartílago calcificado; y retirando el total del hueso epifisiario o modelo cartilaginoso en el caso de conejos muy inmaduros o en la cresta ilíaca.

Estas placas de crecimiento son fragmentadas en 2-3 mm cuadrados y colocadas en DMSO al 10% en PBS previamente llevado a 4 grados centígrados; y son mantenidas en nevera corriente durante 12 horas, a continuación son congeladas embebidas en el DMSO al 10% lentamente en nevera vertical a una tasa de 1 grado centígrado por minuto; para este fin se colocan las muestras en una caja de icopor dentro del congelador vertical (17).

La descongelación debe ser rápida, con PBS calentado a 37 grados centígrados.

A las 4 semanas se toma una muestra de la fisis para evaluar viabilidad y recuento celular.

Para este fin adoptamos un modelo modificado de Aston, Jiménez, Gutiérrez (2), (17), (38) para digerir la matriz cartilaginosa y obtener una suspensión celular que se colorea con Azul de Trypano.

El método utilizado para la digestión de la matriz celular consiste en lavar los fragmentos de fisis en PBS precalentado a 37 grados centígrados, centrifugando en 2 ocasiones con cada lavado con el fin de extraer el DMSO que a temperatura ambiente es tóxico para célula.

A continuación son mantenidas en medio de cultivo celular (MEM) enriquecido con suero fetal bovino y antibiótico, durante 5 minutos, para ayudar al bienestar celular que se ha visto alterado con el anterior procedimiento.

Se incuban a 37 grados centígrados con Trypsina al 0.25% por treinta minutos.

Se centrifuga, se retira el sobrenadante y se lavan con el medio enriquecido nuevamente.

Se incuban con Colagenasa de Clostridium al 0.2% en MEM enriquecido a 37 grados centígrados durante 3 horas, y dado el caso que la matriz no se haya digerido, se aumenta el tiempo de incubación que según nuestra observación puede ser hasta de 12 horas sin alterar significativamente la viabilidad celular.

Se centrifuga a 1200 RPM por 10 min y el sedimento obtenido se suspende en MEM con antibiótico. Se centrifuga nuevamente y se hace una suspensión celular en 0.5 ml de MEM.

Se toman 12 microlambdas de suspensión celular y de azul de trypano (1:1), se mezclan y se montan en la cámara de recuento celular.

Se hace el recuento celular expresándolo en porcentaje de células viables.

XIII. RESULTADOS

1. Obtención de la fisis

El primero de nuestros objetivos era, el poder obtener la placa de crecimiento mediante una técnica sencilla y reproducible en nuestro medio.

La extracción de la fisis en el cadáver fresco de conejo, mediante la ayuda del microscopio de disección, nos permitió obtener un cartílago fisiario, libre de hueso metafisiario y/o epifisiario; así como libre del cartílago hialino epifisiario.

Para comprobar esto realizamos cortes histológicos al material obtenido, demostrado en el microscopio de luz que no existían en las muestras, remanentes de hueso o cartílago diferentes a la placa de crecimiento.

Nuestra experiencia nos permitió lograr estas fisis y la destreza adquirida nos permite afirmar que es posible obtenerlas en la práctica clínica sin dificultad.

2. Preservación de la fisis

Siguiendo estrictamente los pasos del protocolo de criopreservación diseñado. Encontramos que era posible llevar las fisis a congelaciones de -70 grados centígrados, descongelarlas y recuperar un porcentaje de células vivas del 82% en promedio, variables interobservador entre el 75% a 85% (recuentos realizados por los autores y la colaboración de 2 personas entrenadas en cultivos celulares).

XIV. ANALISIS Y CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos nos sentimos muy alentados a continuar nuestro plan de trabajo ya que los objetivos planteados para esta fase fueron cumplidos en su totalidad.

Primero: Hemos logrado aplicar una técnica de obtención de las fisis utilizando el microscopio de disección, con éxito y pensamos que el entrenamiento en la toma de la fisis mejorará aún más y nos permitirá asegurar que estos injertos reciban la nutrición por difusión de la circulación metafisiaria y epifisiaria necesaria para que continúen creciendo a una tasa muy cercana a la normal una vez sean transplantados al modelo "in vivo".

Segundo: Conseguimos aplicar la técnica de criopreservación al cartílago de crecimiento agre-

gando algunas pequeñas variaciones a la técnica: Dejamos los fragmentos embebidos en el DMSO 10% durante la congelación para asegurar que las células estén protegidas dentro de su matriz, de esta manera están disponibles en fragmentos para trasplante inmediato sin que sea necesario agregar ningún tratamiento adicional.

Tercero: Los excelentes resultados encontrados en cuanto a viabilidad de las células una vez fueron descongeladas y aisladas para valoración 82% en promedio, los cuales son superiores a los reportados previamente para cartilago articular; hasta la fecha no se han publicado estudios similares sobre criopreservación de cartilago de crecimiento.

Consideramos que estos resultados se deben a una estricta técnica de asepsia para la manipulación de los injertos, el uso de medios enriquecidos (gracias al conocimiento en aumento de las técnicas de cultivo celulares), la utilización racional de las sustancias para degradar la matriz cartilaginosa y la posible bondad del cartilago de crecimiento ya que a diferencia del cartilago articular sus células tienen un potencial en cuanto a crecimiento, actividad metabólica y adaptabilidad según lo revisado en el marco teórico.

La viabilidad encontrada si bien nos tranquiliza en cuanto a la aplicación en el modelo "in vivo", nos despierta gran inquietud en cuanto al comportamiento inmunológico de estos injertos, ya que la gran viabilidad celular iría de la mano con una gran respuesta inmunológica.

En ese momento se encuentra en curso la fase de estudio del comportamiento inmunológico de estos trasplantes, para lo cual estamos utilizando un modelo de cultivo mixto de cartilago de crecimiento criopreservado en bloque, con linfocitos de los animales receptores del injerto; resultados que presentaremos en un próximo reporte preliminar de este estudio.

Por ahora nos sentimos satisfechos con lo obtenido y recordando lo anotado por J. Cañadel en su obra "Lesiones del cartilago de crecimiento", cuando se refiere a trasplantes fisiarios: "Queremos destacar el camino que ofrece como modalidad terapéutica en un futuro, una vez se hayan ampliado y profundizando los conocimientos actuales". Pensamos que el futuro es ahora y lo que intentamos es contribuir al conocimiento para tratar las lesiones fisiarias de la forma más racional posible.

BIBLIOGRAFIA

1. Arkin, A. M., Katz, J.F.: The effects of pressure on epiphyseal growth. *J.B.J.S.*, 38A: 1056-1076, 1956.
2. Aston, J.E., Bentley, G.: Repair of articular surfaces by allografts of articular and growth-plate cartilage. *J.B.J.S.*, 68B: 29-34, 1986.
3. Bowen, C.V.A., O'Brien, McC., Gumley, G.J.: Experimental microvascular growth plate transfers. Part I and II investigation of vascularity. *J.B.J.S.*, 70B: 305-314, 1988.
4. Brashear, H.R. Jr.: Epiphyseal avascular necrosis and its relation to longitudinal bone growth, *J.B.J.S.*, 45A: 1.423, 1963.
5. Brighr R.W.: Physeal injuries. In Rockwood. C., Wilkins, K., King, R.: Fractures in children. Lippincott, 1984.
6. Brighton, C.: Structure and function of the growth plate. *Clin Orthop.*, 136: 22-32, 1978.
7. Bueche, M.J., Phillips, W.A., Jeffrey, G., Best, R., and Goldstein, S.A.: Effect of interposition material on mechanical Behavior in partial physeal resection. A canine model. *J. Ped. Orthop.*, 10(4): 459-462, 1990.
8. Campbell, C.J., Grisolia, A., Zanconato, O.: Effects produced in the cartilaginous epiphyseal plate of immature dogs by experimental surgical traumata. *J.B.J.S.*, 41a: 1.221, 1959.
9. Cañadel, J., DePablos, J.: Lesiones del cartilago de crecimiento. 2a. Ed. Salvat 1988.
10. Chesterman, P.J., Smith, A.U.: Homotransplantation of articular cartilage and isolate chondrocytes: An experimental study in rabbits. *J.B.J.S.*, 50B: 184-197. 1968.
11. Connolly, J.F., Huurman, W., Lippiello, L., Pankaj, R.: Epiphyseal traction to correct acquired growth deformities: An animal and clinical investigation. *Clin. Orthop.* 202: 258-268. 1986.
12. De Bastiani, G., Aldegheri, R., Brivio, L.R., Trivella, G.: Limb lenthening by distraction of the epiphyseal plate. *J.B.S.J.*, 68B: 545-549. 1986.
13. De Batiani, G., Aldegheri, R., Brivio, L.R., Trivella, G.: Chondrodiatasis-controlled symmetrical distraction of the epiphyseal plate. *J.B.J.S.*, 68B: 550-556. 1986.

14. De Pablos, J., Cañadell, J.: Correction of angular deformities of the long bones by physeal distraction: Presented at Annual Fifty-Eight Meeting. A.O.O.S. 1991.
15. Ehrlich, M.C.: Epiphyseal Plate. In Basic science in Orthopaedics. Harvard Medical School, 1985.
16. Fjeld, T.O., Steen, H.: Growth retardation after experimental limb lengthening by epiphyseal distraction. *J. Ped. Orthop.* 10 (4): 463-466. 1990.
17. Gutiérrez, M., Jiménez, P., Carrillo, G., Soto, C.: Aloinjertos osteocondrales: comparación de diferentes métodos de preservación en un modelo animal. *Rev. Col. Ortop. Traumat.*, 4 (3): 75-284. 1990.
18. Harris, W.R., Martin, R. and Tilde, M.: Transplantation of epiphyseal plate. An experimental study. *J.B.J.S.*, 47A: 897, 1965.
19. Iannotti, J.P.: Growth plate physiology and pathology. *Clin Orthop North Am.* 1: 1. 1990.
20. Itay, S., Abramovici, A., and Nevo, Z.: Use of culture chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop.*, 220: 284-303, 1987.
21. Johnson, J.T.H., Southwick, W.O.: Growth following transepiphyseal bone grafts. An experimental study to explain continued growth following certain fusion operations. *J.B.J.S.*, 42A: 1.381-1.395, 1960.
22. Kawabe, N., Erlich, M.G., Mankin, H.J.: In vivo degradation systems of the epiphyseal cartilage. *Clin. Orthop.* 211: 244-251, 1986.
23. LaCroix, P., Verbrugge, J.: Slipping of the upper femoral epiphysis. A pathological study. *J.B.J.S.*, 33A: 371-378. 1951.
24. Lalanandham, T., Ehrlich, M., Zaleske, D., Deeney, B., Mankin, H.J.: Viability and metabolism of cartilage transplantation to physeal regions. *J. Ped. Orthop.*, 10(4): 450-458. 1990.
25. Langer, F., Gross, A.E.: Immunogenicity of allograft articular cartilage. *J.B.J.S.* 56A: 297. 1974.
26. Langeskiold, A.: the possibilities of eliminating premature partial closure of an epiphyseal plate caused by trauma or disease. *Acta Orthop Scand.* 38: 267-279. 1967.
27. Langeskiold, A.: An operation for partial closure of an epiphyseal plate in children, and its experimental basis. *J.B.J.S.*, 57 B: 325-330. 1975.
28. Langeskiold, A.: Surgical treatment of partial closure of the growth plate. *J. Ped. Orthop.* 1: 3-11. 1981.
29. Langeskiold, A., Videman, T., Nevalainen, T.: The fate of fat transplants in operations for partial closure of the growth plate: Clinical examples and an experimental study. *J.B.J.S.*, 68B: 234-238. 1986.
30. Malejczyk, J., Moskalewski, S.: Effect of immunoppression on survival and growth of cartilage produced by transplanted allogeneic epiphyseal chondrocytes. *Clin. Orthop.*, 232: 292-303, 1988.
31. McGann, L.E., McAllister, D., Muldrew, K. et al.: Permeability of isolated chondrocytes to dimethyl sulfoxide. Presented at the 22nd Annual Meeting of the Canadian Orthopaedic Research Society, Ottawa, June 1988.
32. Nettelblad, H., Randolph, M.A., Weiland, A.J.: Free microvascular epiphyseal plate transplantation. An experimental study in dogs. *J.B.J.S.*, 66(A): 1.421-1.430. 1984.
33. O'Driscoll, S.W., Keeley, F.W., and Salter, R.B.: Durability of Regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. *J.B.J.S.*, 70A: 595-606. 1088.
34. Olin, A., Creasman, C., and Shapiro, F.: Free physeal transplantation in the rabbit. An experimental approach to focal lesions. *J.B.J.S.*, 66(A): 7-20. 1984.
35. Osterman, K.: Operative elimination of partial premature epiphyseal closure. An experimental study. *Act. Orthop. Scandinav. Supplem.* 147. 1972.
36. Poland, J.: Traumatic separation of the epiphyses in general. *Clin. Orthop.* 41: 7-17, 1965.
37. Polge, C., Smith, A. U., Parkes, A.S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.*, 164: 666. 1949.
38. Quiñones, A., Sanguino, G., Rico, A.: Cultivo "in vitro" de condrocitos y reparo de superficies articulares en animales. *Rev. Col. Ortop. Traumat.*, 4(3): 253-273. 1990.
39. Razzano, C.D., Nelson, C., Evensman, J.: Growth hormone levels in slipped capital femoral epiphysis. *J.B.J.S.* 54A: 1.224, 1972.
40. Rodrigo, J., Savich, L., Travis, C., Smith, G.: Osteo-cartilaginous allografts as compared with autografts in the treatment of Kenee joints. *Clin. Orthop.* 218: 268. 1987.
41. Ring, P.A.: Transplantation of epiphyseal cartilage. *J.B.J.S.* 37B: 642-657, 1955.
42. Schachar, N.S., McGann, L.E.: Cryopreservation of articular cartilage. In *Bone and cartilage allografts: Friedlaender, G. and Goldberg V.M.: A.A.O.S.*, 1991.
43. Schachar, N.S., McGann, L.E.: Investigations of low-temperature storage of articular cartilage for transplantation. *Clin. Orthop.*, 208: 146-150. 1986.
44. Shapiro, F., Holtrop, M.E., Glincher, M.J.: Organization and cellular biology of the perichondrial ossification groove of Ranvier. *J.B.J.S.*, 59A: 703-723. 1977.
45. Spira, E., and Farin, I.: Devascular supply to the epiphyseal plate under normal and pathological conditions. *Act. Orthop. Scandinav.*, 38: 1-22, 1967.
46. Stevenson, S., Dannucci, G.A., Sharkey, N.A., Pool, R.R.: The fate of cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J.B.J.S.*, 71A: 1297-1307, 1989.

47. Stevenson, S.: Experimental Issues in histocompatibility of bone Grafts. In Bone and cartilage allografts: Friedlaender, G. and Goldberg V.M.; A.A.O.S., 1991.
48. Tadchjian, M.: Pediatric Orthopaedics. 2a. Ed. Saunders. Co. 1190.
49. Tavakol, K.: Proteoglycan and collagen-degrading activities of neutral proteases from fresh an cryopreserved articular cartilage explants and the chondrocytes. An in vitro biochemical study, thesis. University of Calgary, 1989. G. and Goldberg V.M.; A.A.O.S., 1991.
50. Tomford, W.W., Mankin, H.J.: Investigational approaches to articular cartilage preservation. Clin. Orthop., 174: 22-27. 1983.
51. Tomford, W.W., Fredericks, G.R., Mankin, H.J.: Studies on cryopreservation or articular cartilage chondrocytes. J.B.J.S., 66A: 253-259. 1984.
52. Tomford, W.W., Duff, G., Mankin, H.J.: Experimental freeze preservation of chondrocytes. Clin Orthop. 197: 11, 1985.
53. Trueta, J., Morgan, J.: The vascular contribution to osteogenesis. Part I. Studies by the injection method. J.B.J.S., 42B: 97-109. 1960.
54. Trueta, J., Little, K.: The vascular contribution to osteogenesis. Part II. Studies with electron microscope. J.B.J.S., 42B: 367-376. 1960.
55. Trueta, J.U., Amato, B.: The vascular contribution to osteogenesis. Part III. Changes in the growth plate cartilage caused by experimentally induced ischaemia. J.B.J.S., 42B: 571-587. 1960.
56. Urist, M.R., McLean, F.C.: Osteogenesis potency and newbone formation by induction in physeal implants to the anterior chamber of the eye. J.B.J.S. 34A: 443-454. 1952.
57. Weiss, A.P., Sponseller, P.D.: Iliac crest growth plate analysis in slipped capital femoral epiphysis. J. Ped. Orthop. 10(5): 629-632. 1990.
58. Wilianson, R.V., Staheli, L.T.: Partial physeal growth arrest: Treatment by bridge resection and fat interposition. J. Ped. Orthop. 10(6): 769-776. 1990.
59. Wilson, J.N.: Epiphyseal transplantation. J.B.J.S., 48A: 245-256, 1966.
60. Wilson-MacDonald, J., Houghton, G.R., Bradley, J., Morsher, E.: The relationship between periosteal division and compression or distraction of the growth plate. An experimental study in the rabbit. J.B.J.S. 72B; 303-307, 1990.
61. Zaleske, D.J.: Biology of epiphyseal transplantation. In bone and cartilage allografts: Friedlaender, G. and Goldberg V.M.; A.A.O.S., 1991.