

ESTUDI AMB MICROSCOPI
ELECTRÒNIC DE RASTREIG
AMBIENTAL DE LA MORFOLOGIA
DE LA SUPERFÍCIE ARTICULAR
D'EMPELTS OSTEOCONDRAIS.
VALORACIÓ DE DOS MÈTODES
DE CRIOPRESERVACIÓ.

INTRODUCCIÓ

A. CARTÍLAG

1.-ESTRUCTURA I FUNCIO DEL CARTÍLAG ARTICULAR

El cartílag hialí (també anomenat cartílag articular), és un teixit elàstic avascular, aneural i alimfàtic, que recobreix la superfície articular dels ossos en les articulacions diartrodials i que té com a funció suportar les càrregues, proporcionar una excel·lent fricció, lubricació i les característiques de desgast requerides pel continu moviment de lliscament. També funciona absorbint les forces de xoc mecànic i distribuint la força aplicada sobre les estructures òssies de suport. En condicions fisiològiques, el cartílag articular pot desenvolupar les seves funcions biomecàniques essencials durant cinc o sis dècades experimentant poc desgast (fig.1).

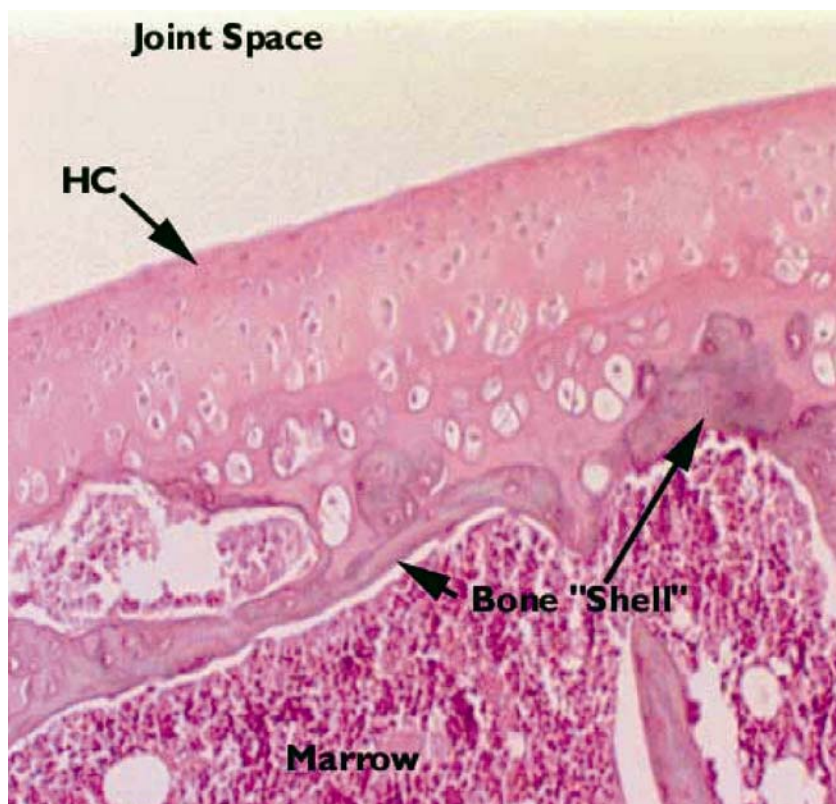


Fig.1 Tinció Hematoxilina-Eosina de cartílag hialí (HC) i os subcondral.

A l'igual que altres teixits connectius de l'organisme, incloent tendons, lligaments i meniscos, el cartílag hialí està constituït per una matriu rica en aigua, una estructura de fibres macromoleculares i per un número relativament petit de cèl·lules que s'anomenen condrocits (fig.2).

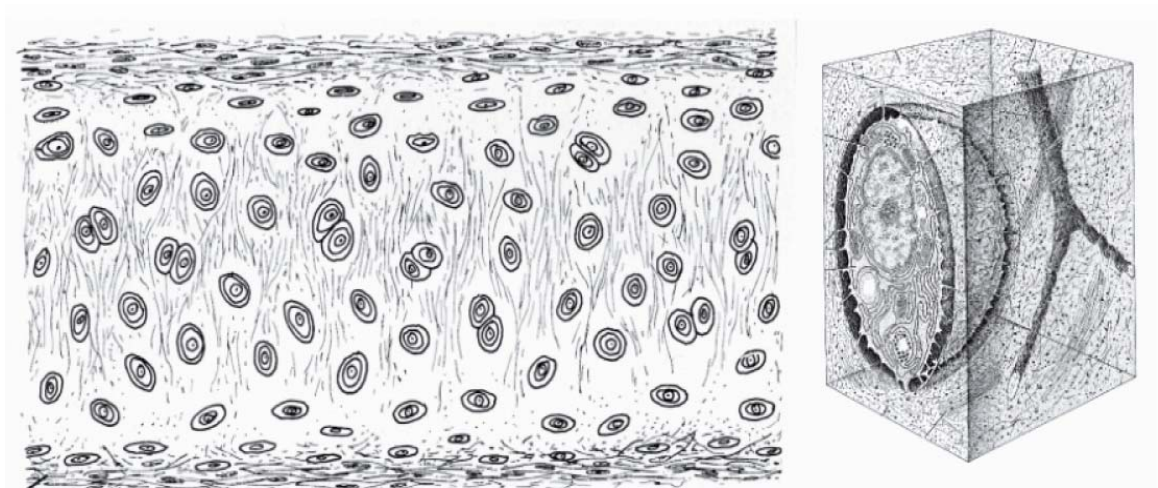


Fig.2 Esquema de l'estructura del cartílag hialí. A la dreta esquema d'un condrocit

1.1.- ELS CONDRÒCITS

Els condrocits (fig.3) són cèl·lules altament especialitzades que produeixen i mantenen la matriu extracel·lular del cartílag. Ocupen menys del 10 % del volum tissular total, amb variacions d'unes articulacions a altres .

A semblança de la majoria de les cèl·lules mesenquimals, el condrocit es rodeja de la seva matriu extracel·lular i no forma contacte intercel·lular. La síntesis de la matriu es realitza en el reticle endoplasmàtic rugós i l'aparell de Golgi.

La funció dels condrocits està influenciada pels canvis que es produeixen en la matriu, i així la pèrdua de proteoglicans o altres constituents determina l'actuació del condrocit. El mecanisme desencadenant pot ser la transmissió mecànica dels canvis de pressió en la membrana cel·lular i això podria explicar la necessitat d'aplicació de càrregues com element regulador de la qualitat del cartílag reparat. Un altre factor és l'edat i s'observa que amb la maduració decreix la síntesi de matriu i disminueix la cel·lularitat, pel que existeix una menor capacitat de reparació.

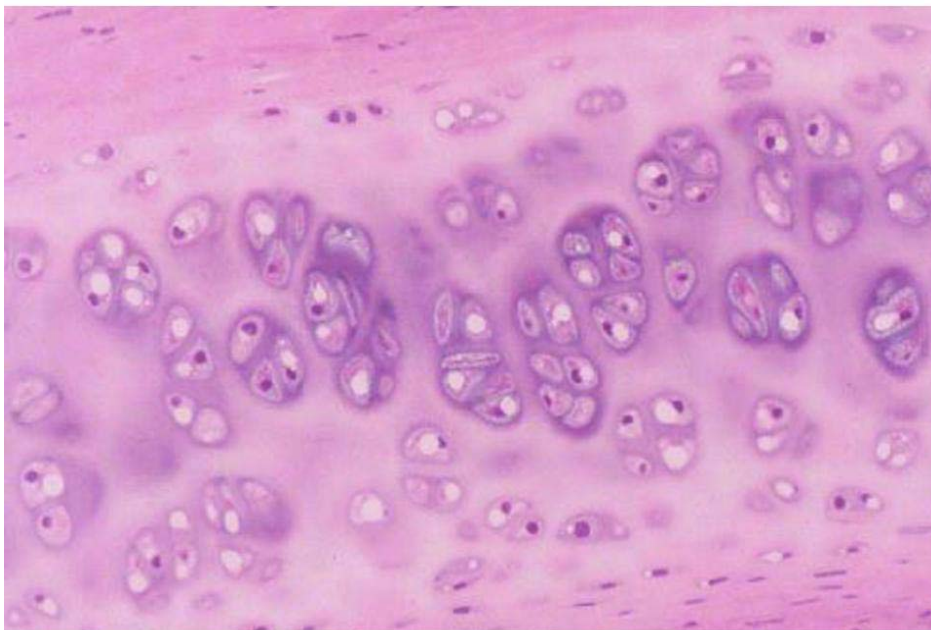


Fig.3. Grup de condrocits suspesos en la matriu extracel·lular. Tinció H-E.

1.2.-MATRIU EXTRACEL·LULAR

Constituïda per aigua, col·lagen, proteoglicans i les denominades proteïnes no col·làgenes.

El percentatge d'aigua està al voltant del 70 % de la mitja del pes del cartílag. La seva disposició és variable en els diferents estrats del mateix i en ella es troben dissoltes petites proteïnes i metabòlits. La major quantitat es troba en l'espai extracel·lular i forma part del gel que forma l'esquelet amb el col·lagen i els proteoglicans. Una poca quantitat es troba dins la cèl·lula i participa en la difusió de nutrients.

1.2.a.-EL COLLAGEN representa el 20 % del pes total del cartílag i li confereix estructura i rigidesa. En altres teixits hi ha diversos tipus de col·lagen, sent el principal el tipus II amb un percentatge del 95 %. El 5 % restant està format pels tipus V, VI, VII, IX i XI. Les molècules de col·lagen estan constituïdes per tres cadenes de polipèptids, l'estructura primària de la qual és simple i repetitiva per a formar una hèlix tancada.

1.2.b.-ELS PROTEOGLICANS són complexos proteïno-sacàrids formats per cadenes de glicosaminglicans lligats a un filament central proteic. Els glicosaminglicans contribueixen amb el 95 % i són dos: Condroitinsulfat i queratinsulfat. El primer està constituït per una repetició d'unitats d'àcid glucurònic i de N-acetil-galactosamina; el segon està format per la repetició d'unitats de galactosa i N-acetil-glucosamina.

El filament proteic central contribueix amb el 5 % i presenta tres regions, la d'unió amb l'àcid hialurònic, una rica en queratansulfat i un altre en condroitinsulfat.

Aquest complex constitueix el monòmer de la macromolècula dels proteoglicans, però poden unir-se mitjançant proteïnes d'enllaç a un filament central d'àcid hialurònic per formar els agregats de proteoglicans. El procés de síntesi dels proteoglicans està controlat per l'acció de determinats enzims, situats alguns en els condrocits i d'altres en el líquid sinovial. La concentració de glicosaminoglicans en el cartílag és del 6 % i estan associats a una densitat de càrrega fixa elevada, per la qual cosa es crea en l'interior una important pressió, resultant a l'hora de la pressió osmòtica i de la concentració iònica. Aquesta pressió està contrarestada per la resistència elàstica de l'estructura del col·lagen

i l'equilibri entre ambdues regirà les propietats físiques del cartílag en la seva funció mecànica. Amb l'edat apareixen canvis en la estructura i composició dels agregats de proteoglicans ¹⁹ que poden ser atribuïts a l'alteració en el metabolisme del condrocit, a la major degradació d'ells o bé a la suma de les dues.

1.2.c.-PROTEÏNES NO COLLÀGENES

Constitueixen l'esquelet de les macromolècules i si bé la seva funció és poc coneguda, sembla que organitzen i mantenen les macromolècules de la matriu i la seva interrelació amb el condrocit. Les proteïnes d'enllaç dels monòmers amb l'àcid hialurònic, la fibronectina, elastina i l'ancorina C-II són les denominades proteïnes no col·làgenes (fig. 4).

1.3.- REGIONS DEL CARTÍLAG ARTICULAR.

Per a formar el cartílag articular, els condrocits organitzen les molècules de col·lagen, proteoglicans i proteïnes no col·làgenes en una estructura altament organitzada, canviant la composició, distribució i distribució segons la profunditat en el teixit i la proximitat al condrocit. ¹⁷

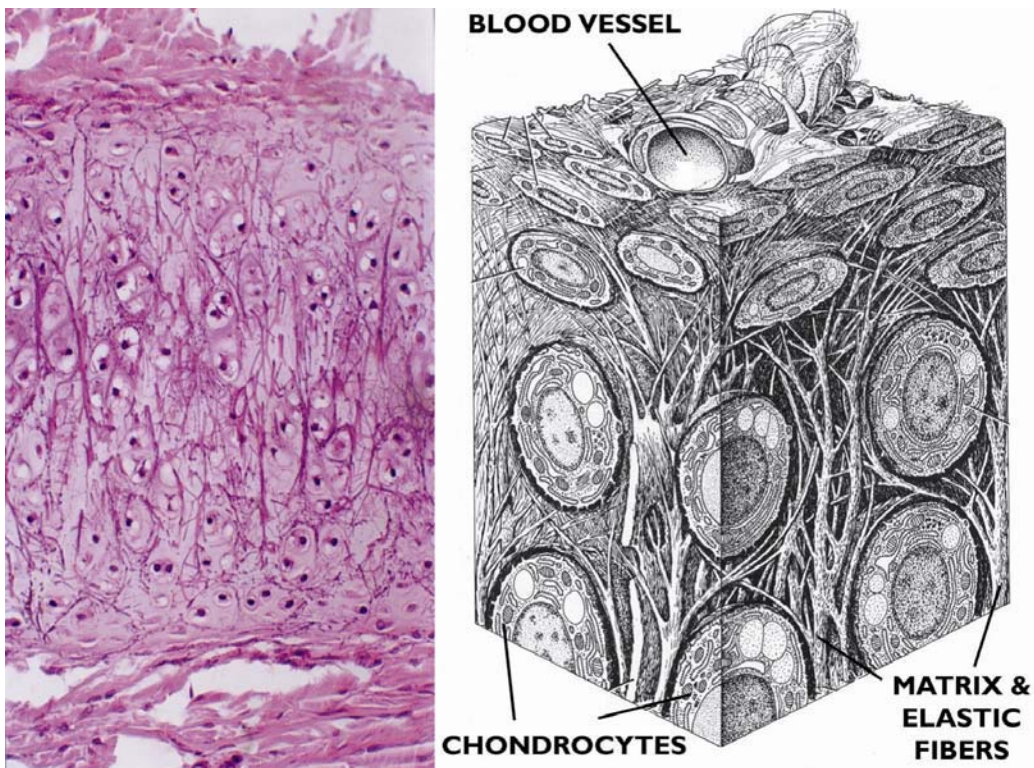


Fig.4. Tinció H-E on s'observen les fibres d'elastina de la matriu extracel·lular

Les zones del cartílag articular

Els canvis morfològics dels condrocits i de la matriu extracel·lular des de la superfície articular fins l'os subcondral, fan possible identificar en el cartílag articular 4 capes o zones: la zona superficial, la zona transaccional, la zona mitja (també anomenada radial o profunda) i la zona de cartílag calcificat⁸³ (fig.5). El tamany relatiu i aspecte d'aquestes zones varia segons l'espècie de l'individu, i inclòs entre les articulacions d'una mateixa espècie, per la qual cosa és important no extrapolar directament els resultats d'experiments de cartílag d'una espècie a una altra^{18, 20}. Encara que cada zona té aspectes morfològics diferents, no sempre és fàcil trobar els límits entre elles. Tot i que estudis biològics i mecànics han demostrat que l'organització zonal té importància funcional.^{4, 17}

Segons la zona, la matriu extracel·lular difereix en concentració d'aigua, proteoglicans i en el tamany dels agregats. ¹⁷ Les cèl·lules, d'acord amb la regió on es trobin, varien de forma, tamany, orientació relativa respecte a la superfície articular i en activitat metabòlica. ⁴ Elles responen diferentment a la càrrega mecànica, suggerint que el desenvolupament i manteniment del cartílag articular normal depèn, en part, de les diverses poblacions fenotípiques dels condrocits.

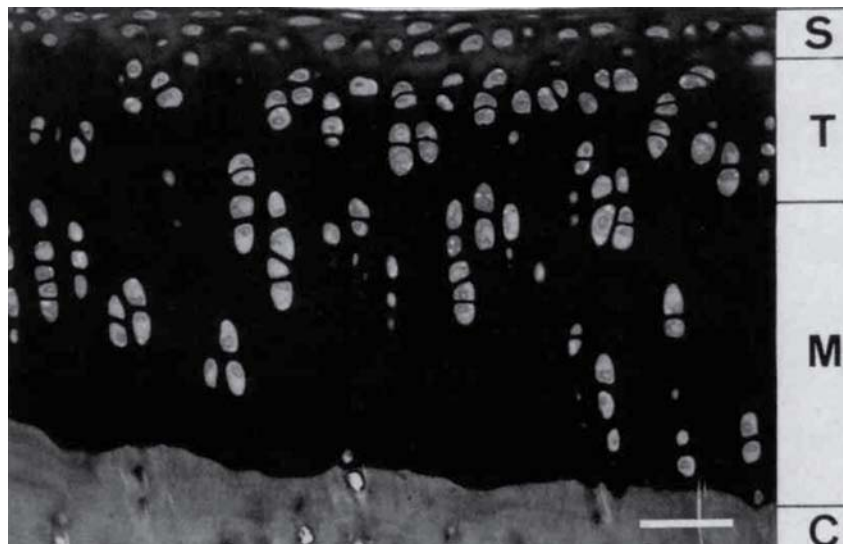


Fig. 5. Estructura del cartílag articular de còndil femoral intern de conill New Zealand de vuit mesos d'edat. El teixit està organitzat en quatre capes: S: Superficial; T:transicional; M:medial o radial; C: calcificat. (Buckwalter y Mankin, 1998).

1.3.a.- LA ZONA SUPERFICIAL

L'estructura i composició d'aquesta zona li confereixen propietats mecàniques i biològiques especials per a suportar el lliscament articular. Aquesta regió està composta per dues capes, una superficial i una altre de profunda. La capa superficial rep el nom de lamina splendens i està formada per fines fibres, amb pocs polisacàrids i sense cèl·lules.

En la segona capa, més profunda que l'anterior, els condrocits tenen una forma el·lipsoïdal i es disposen de tal manera que el seu eix major és paral·lel a la superfície articular. Aquests condrocits sintetitzen una matriu que, en relació a les altres zones del cartílag, tenen una baixa concentració de proteoglicans i una alta concentració de col·lagen. Igualment, les concentracions de fibronectina i d'aigua són altes en aquestes zones. Els cultius cel·lulars de condrocits de la zona superficial han demostrat que degraden més ràpidament als proteoglicans i sintetitzen menys col·lagen i proteoglicans que els seus homòlegs de capes més profundes.⁴

La densa matriu de fibril·les col·làgenes disposades paral·lelament a la superfície articular en la zona superficial, ajuda a determinar les propietats mecàniques del teixit i afecta el moviment de molècules cap i des del cartílag. Aquestes fibril·les confereixen a aquesta zona una gran resistència en comparació a les zones més profundes.^{36 16. 51} Experiments in vitro han demostrat que la zona superficial contribueix considerablement al comportament dels cartílag quan aquest és comprimit.⁸³ Si s'elimina aquesta zona augmenta la permeabilitat del teixit i possiblement augmenta la càrrega física de la xarxa de macromolècules durant la compressió, La disrupció o alteració de la matriu col·làgena densa de la zona superficial és un dels primers canvis en la degeneració experimental induïda del cartílag articular⁵², la qual cosa suggereix que les alteracions en aquesta zona poden contribuir al desenvolupament d'artrosi per canvis del comportament mecànic del teixit.

Les fibretes de col·lagen, densament empaquetades, formen una fina capa que limita l'ingrés i sortida de grans molècules a la matriu cel·lular, tal i com passa amb els anticossos i altres proteïnes. Per aquest motiu es diu que el cartílag compta amb una barrera efectiva contra el sistema immunològic. Aquestes propietats han fet sospitar que si es produís la desestructuració de la capa superficial, a més a més d'alterar l'estructura i

propietats mecàniques del cartílag, es podria produir una resposta inflamatòria o immunològica patològica.⁴⁰

1.3.B.- LA ZONA TRANSICIONAL.

Com el seu nom indica, la morfologia i composició de la matriu d'aquesta regió és intermitja entre la zona superficial i la matriu. Les cèl·lules presenten una forma esferoïdal i una major concentració d'òrganes destinades a sintetitzar una matriu que es caracteritza per tenir un conjunt desorganitzat de fibres col·làgenes de major diàmetre, de major concentració de proteoglicans i de menor concentració d'aigua i col·lagen, en comparació amb la matriu de la zona superficial.

1.3.C.- LA ZONA MEDIAL (RADIAL O PROFUNDA)

Els condrocits en la zona mitja posseeixen una forma esferoïdal i tenen tendència a alinear-se en columnes perpendiculars a la superfície articular. Aquesta zona té les fibres col·làgenes de major diàmetre en el cartílag, així com la major concentració de proteoglicans i la menor concentració d'aigua. Les fibres col·làgenes passen a través de la marca d'aigua, que és una fina línia basòfila visible al microscopi de llum. La naturalesa de la marca d'aigua encara no està del tot aclarida. Pot ser que resulti de la concentració de material basòfil calcificat en la interfase entre la matriu calcificada i la no calcificada. Una altra alternativa és que es tracti d'una estructura matricial ben definida i composta d'una banda de fibres fines.

1.3.D.- LA ZONA DE CARTÍLAG CALCIFICAT

Una fina zona de cartílag calcificat separa la zona mitja de la zona d'ós subcondral. Les cèl·lules d'aquesta zona tenen un menor volum que les de la zona radial i

contenen només petites quantitats de reticle endoplasmàtic rugós i de membrana de Golgi. En algunes regions aquestes cèl·lules semblen estar rodejades completament de cartílag calcificat, la qual cosa suggereix que tenen una taxa metabòlica molt baixa. Oegema i Thompson ⁹⁵ (1996) van suggerir que aquestes cèl·lules podrien jugar algun paper en el desenvolupament i progressió de l'artrosi.

1.4.-LES REGIONS DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR

Les variacions en la matriu extracel·lular dins de les zones del cartílag articular permeten distingir tres compartiments o regions: una regió pericel·lular, una territorial i una regió interterritorial.

Les regions pericel·lular i territorials contenen les molècules que uneixen les membranes cel·lulars dels condrocits a les macromolècules de la matriu. A l'hora protegeixen a les cèl·lules del dany que poden patir durant la càrrega i deformació del teixit. Aquestes regions també poden ajudar a transmetre senyals mecàniques del teixit quan la matriu es deforma durant la càrrega articular. Per altra banda, la funció primària de la matriu interterritorial és proveir propietats mecàniques al teixit, les quals es mencionaran més endavant.

1.4.A.- LA REGIÓ PERICEL·LULAR

Les membranes cel·lulars dels condrocits, aparentment, s'uneixen a la fina vora de la matriu pericel·lular que cobreix la superfície cel·lular. Aquesta regió és rica en proteoglicans, proteïnes no col·làgenes, tals com la Ancorina C-II ^{90, 99} i col·làgens no fibril·lars (amorfs) tals com el col·lagen tipus VI. ⁵⁴ En aquesta regió és molt escàs el col·lagen fibril·lar.

1.4.B.- LA REGIÓ TERRITORIAL

En aquesta regió es troben fibres col·làgenes primes que semblen adherir-se a la matriu pericel·lular rodejant als condrocits, proporcionant-los protecció mecànica durant la càrrega i la deformació del teixit. És precisament aquesta xarxa col·làgena la que marca la frontera entre les matrius territorials i interterritorial. Encara que, moltes fibres col·làgenes interconnecten a les dues regions, fent difícil, en ocasions, identificar els límits entre elles.

1.4.C.- LA REGIÓ INTERTERRITORIAL

La matriu interterritorial constitueix la major part del volum del cartílag articular madur i contenen les fibretes col·làgenes de diàmetre més gran. A diferència de les fibres col·làgenes de la matriu territorial, aquestes fibres no envolten al condrocit i canvien noranta graus d'orientació en relació a la superfície articular, des de la zona superficial fins la radial. En la zona superficial les fibres tenen un diàmetre relativament petit i generalment es troben paral·leles a la superfície articular. En la zona transicional les fibres assumeixen angles més oblics que en la zona superficial i en la zona radial es disposen, en la seva majoria, perpendicularment a la superfície articular.

1.5.-INTERACCIONS ENTRE ELS CONDRÒCITS I LA Matriu

La relació entre els condrocits i la matriu fa possible el manteniment del cartílag al llarg de la vida. La matriu protegeix als condrocits del dany mecànic durant l'ús normal de l'articulació, ajudant a mantenir la seva forma i fenotip. Nutrients, substrat per a la síntesi de les molècules de la matriu, molècules recentment sintetitzades, molècules matricialment degradades, productes metabolitzats i molècules que ajuden a regular el

funcionalisme cel·lular, tals com citoquines, i factors de creixement, passen a través de la matriu extracel·lular i en alguns casos poden ser emmagatzemades allà. Els tipus de molècules que poden passar a través de la matriu, així com el percentatge que passen, depenen de la composició i organització de la matriu, principalment per la concentració, composició i organització dels grans proteoglicans.

Al llarg del cicle vital, els condrocits degraden i sintetitzen les macromolècules de la matriu. Els mecanismes que controlen l'equilibri entre aquestes activitats són desconeguts, però es creu que hi ha citoquines amb efectes anabòlics i catabòlics que regulen aquest mecanisme.¹²⁴ Per exemple la Interleuquina-1 induïx la síntesi de proteases capaces de degradar les macromolècules de la matriu i interferir amb la síntesi de proteoglicans a nivell transcripcional. Altres citoquines s'oposen a activitats catabòliques estimulant la síntesi de matriu i proliferació cel·lular. En resposta a una varietat d'estímuls, els condrocits sintetitzen i alliberen aquestes citoquines a la matriu, on s'uneixen a receptors de la superfície cel·lular (de la mateixa cèl·lula o veïna) o simplement resten a la matriu.

La matriu extracel·lular també actua com un transductor de senyal pels condrocits. Aquesta transmet les senyals que resulten de la càrrega mecànica de la superfície articular als condrocits i aquests responen alterant la composició de la matriu.³⁷

Els detalls de com la càrrega articular influeix en la funció dels condrocits resta encara desconeguda, però se sap que la deformació de la matriu produeix efectes físics, químics i elèctrics que poden influenciar a aquestes cèl·lules, produint la circulació de flux tissular que induïx canvis en els fluxes de nutrients, metabòlits i ions a través de la matriu. De la mateixa manera, la càrrega també pot causar canvis persistents en l'organització molecular de la matriu, alterant la resposta dels condrocits. Per tant, la matriu no només tradueix i transmet senyals, també pot registrar la història de la càrrega

física del teixit i alterar la resposta de les cèl·lules sobre la base de la història d'aquesta càrrega.¹⁸

2.-REPARACIÓ FISIOLÒGICA DEL CARTÍLAG ARTICULAR

La escassa capacitat regenerativa del cartílag articular es coneix des dels temps d'Hipòcrates⁴⁶, però va ser Hunter al 1743 qui va descriure explícitament que les lesions en el cartílag articular no es curaven espontàniament (fig. 6). Segons Shortkroff i col.¹¹¹, els factors relacionats amb la ineficient reparació del cartílag articular són múltiples i poden classificar-se en tres grups: factors vinculats a l'anatomia del teixit, factors inherents als condrocits i factors relacionats amb la matriu extracel·lular.

2.1.- FACTORS VINCULATS A L'ANATOMIA DEL CARTÍLAG ARTICULAR

El cartílag articular no disposa de nervis, vasos sanguinis ni limfàtics, amb la qual cosa el situen en una verdadera condició d'aïllament amb el resta de l'organisme. En cas de produir-se una lesió no hi ha forma de comunicar la seva presència als altres organismes, fins que es produeixi una irritació sinovial.

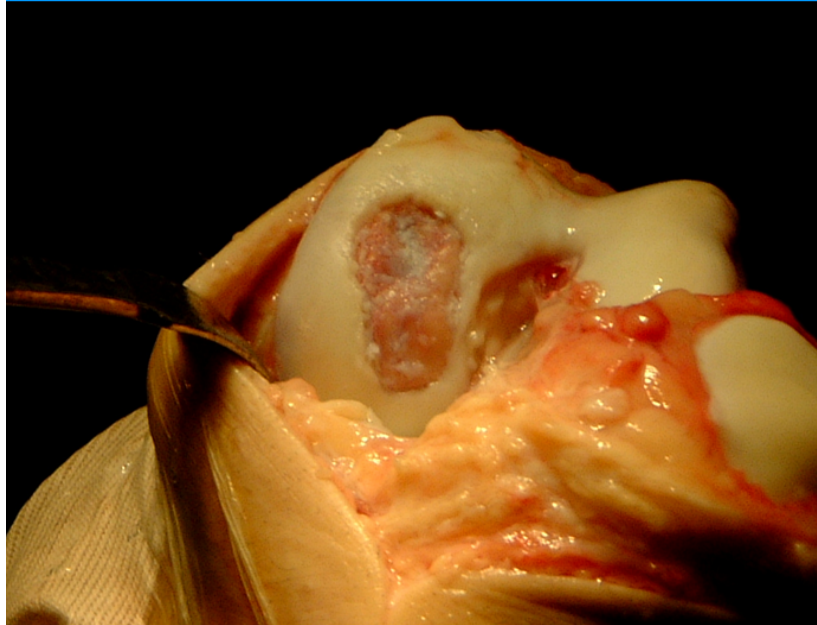


Fig.6. Lesió condral ampla al còndil intern del genoll, amb afectació de l'os subcondral.

Agents químics injectats dins d'una articulació, com els utilitzats per al tractament de malalties sinovials, poden tenir efectes adversos sobre el cartílag, però la absència de terminacions nervioses prevenen el reconeixement de la lesió. De la mateixa manera, la absència d'elements vasculars impedeixen que s'estableixi una reacció inflamatòria en front d'un traumatisme, per la qual cosa en aquests casos no estarà present aquesta fase imprescindible del procés de reparació.

L'aïllament del cartílag s'agreuja encara més si recordem que els nutrients dels condrocits han de superar la doble barrera fisiològica abans d'arribar a aquestes cèl·lules.

2.2.-FACTORS VINCULATS ALS CONDRÒCITS

La baixa densitat de cèl·lules en el cartílag articular en comparació amb altres teixits, influeix directament en la seva capacitat de regeneració, doncs són aquestes les encarregades de mantenir les propietats de la xarxa de macromolècules de la matriu extracel·lular. La limitada activitat mitòtica dels condrocits del cartílag adult i el seu baix nombre de cèl·lules precursors en la medul·la òssia, són altres dels factors que incideixen desfavorablement

2.3.-FACTORS VINCULATS A LA Matriu EXTRACEL·LULAR

Degut a les descàrregues elèctriques de la xarxa de macromolècules i a la presència de fibres de col·lagen en els aspectes més superficials de la matriu extracel·lular, s'obstaculitza la migració de molècules i enzims que podrien afavorir el remodelament intern del cartílag.

3.-RESPOSTA DEL CARTÍLAG ARTICULAR A LES LESIONS MECÀNIQUES

En lesions mecàniques limitades a la substància del teixit cartilaginós (lesions condrials), la resposta del teixit no disposa d'un component inflamatori per falta de la xarxa de capil·lars. La reacció, independentment de la seva extensió, es caracteritza per un augment de l'activitat metabòlica dels condrocits pròxims als marges de la lesió i a un relatiu augment del comportament mitòtic dels mateixos. Aquesta activitat, està vinculada amb modificacions en la taxa de síntesis de components de la matriu, tal i com Schachar i col. (1986) ¹⁰⁵ van demostrar en els experiments de captació de SO₄ (com indicador de la síntesi de glicosaminglicans) i de H-glicina (com indicador de la síntesi de proteïnes).

Aquest procés reparatiu és molt limitat, poc eficient i a la setmana els nivells de captació dels marcadors radioactius són equivalents als trobats en teixits no lesionats.

En lesions més profundes, on s'afecta la placa subjacent al teixit cartilaginós (lesions osteocondrals), la resposta inflamatòria és major i està mediata per la xarxa vascular de l'ós. L'efecte d'aquesta resposta de l'organisme, és similar a la que es produeix en altres teixits vascularitzats. Inicialment, el defecte es ocupat per sang que s'organitza en un coàgul fibrós englobant eritròcits, plaquetes i elements cel·lulars de la medul·la òssia. Les cèl·lules indiferenciades es transformen en fibroblasts que juntament a la xarxa capil·lar creixent van produint, dins del coàgul de fibrina, un teixit granulós reparatiu. Amb la fibrosis progressiva, el defecte queda ocupat amb una cicatriu laxa en aproximadament 10 dies, la qual es va fent paulatinament menys vascularitzada i més escleròtica. Finalment es produeix una massa fibrocartilaginosa que omple i uneix els límits de la lesió original (fig. 7-8).



Fig.7. Lesió exofítica a la faceta interna de la ròtula.

4.-HISTÒRIA NATURAL DE LES LESIONS DEL CARTÍLAG ARTICULAR

Debut a la falta d'innervació del cartílag, una lesió aïllada del cartílag en aquest teixit no produeix dolor. Per tant, els pacients desconeixen aquesta situació, no van al metge i no es documenta la història natural de les lesions condrials.

Encara que existeixen poques evidències científiques en la literatura mèdica sobre la relació entre el dany del cartílag articular i el desenvolupament d'artrosi, molts investigadors han assumit que les lesions del cartílag s'originen durant l'activitat física quotidiana o esportiva i progressen precoçment fins a l'artrosi pels efectes de sobrecàrrega i fricció que es generen en les superfícies articulars.⁸⁹

El coneixement actual de la història natural de les lesions del cartílag articular es deuen en gran part als estudis experimentals i en humans de la artrosi femoropatellars, Així com al seguiment de pacients en osteocondritis dissecant.⁶⁵

Els treballs de Ficat³⁹, amb microscopia electrònica de rastreig, sobre la condropatia post-contusiva en patelles de conill i d'humans, li va permetre concloure que existien varies fases de la malaltia, reflexada en fenòmens macro i microscòpics. A nivell macroscòpic Ficat va descriure que passava: 1º edema: fenomen pràcticament immediat i constant a la contusió i que l'autor pensava que disminuïa espontàniament després del sisè mes. 2º Fissura: és immediata en molts dels casos, i no es cura espontàniament. 3º Ulceració; es conseqüència de la degeneració de la fissura. A nivell microscòpic va descriure: 1º fissura: pot ser parcial o total depenent de la profunditat. 2º Els condrocits de la capa superficial tendeixen a desaparèixer i tenen aspecte degeneratiu. 3º Deteriorament de les fibres de la matriu.

Altres estudis que han aportat coneixement sobre l'artrosi són els de l'osteocondritis dissecant. Segons Insall^{63, 69} la osteocondritis dissecant és un procés en el qual un segment de cartílag, juntament amb os subcondral, es separa de la superfície

articular. El lloc més freqüent és el còndil femoral medial de persones joves, de preferència atletes. El seu origen es debat entre els que pensen que pot ser vascular amb necrosi òssia ⁶⁵ i els que sostenen, a més a més d'aquesta hipòtesi, l'antecedent traumàtic com a event inicial. ⁶³

Linden va trobar que el 55 % dels adults que patien osteocondritis dissecant, als 33 anys de seguiment, presentaven artrosi. Però cap dels nens d'aquesta sèrie va presentar artrosi al mateix temps de seguiment. Això va fer concloure que la reparació de la lesió de la osteocondritis dissecant era més eficient en els nens que en els adults ^{23, 65}.

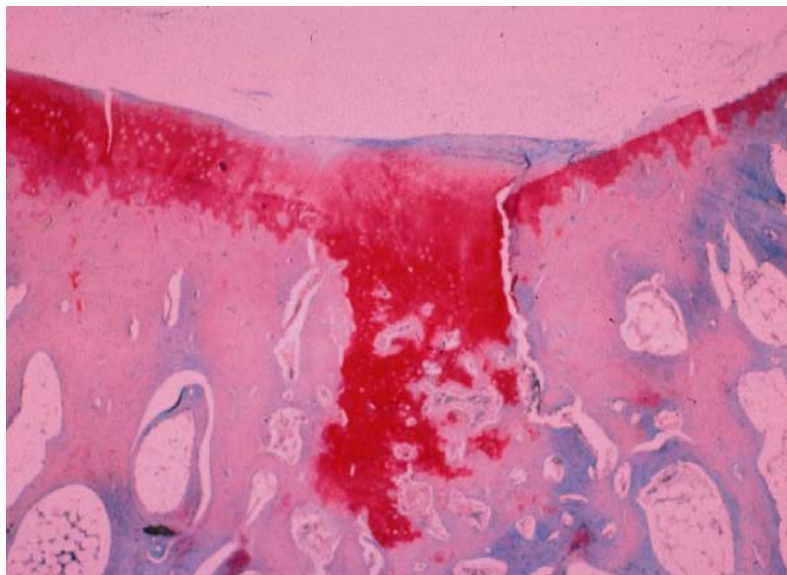


Fig.8. Imatge histològica del coàgul que posteriorment originarà el fibrocartílag de reparació

5.-DIAGNÒSTIC DE LES LESIONS CONDRALS

La història clínica és fonamental per al diagnòstic d'una lesió en una articulació. Els símptomes associats amb lesions del cartílag que completen tota la seva amplada

són similars als produïts en una lesió meniscal.⁶⁵ Els pacients poden presentar dolor per inflamació d'estructures pròximes i bloqueig i inestabilitat de l'articulació afecta.

La majoria de vegades el diagnòstic de les lesions de cartílag es fan per Ressonància Nuclear Magnètica (RNM) (fig. 9), i fins i tot amb radiografies simples si es tracta d'una fractura osteocondral, depenent del tamany del component ossi del cos lliure.⁷⁵

Jobanputra i col⁶⁵, plantegen que hi ha molts autors que utilitzen indistintament els termes de fractura osteocondral i osteocondritis dissecant, la qual cosa a portat a moltes confusions. Aquests autors proposen que les lesions de les osteocondritis dissecans són concèntriques, solen afectar en la segona dècada de la vida i no precedeixen de cap antecedent traumàtic. En canvi, en les fractures osteocondrals hi ha un antecedent traumàtic i el defecte es pot produir en qualsevol part de la superfície articular.



Fig.9. Imatge de RNM on es veu una lesió osteocondritis dissecant còndil intern genoll en un pacient amb les fisis de creixement obertes

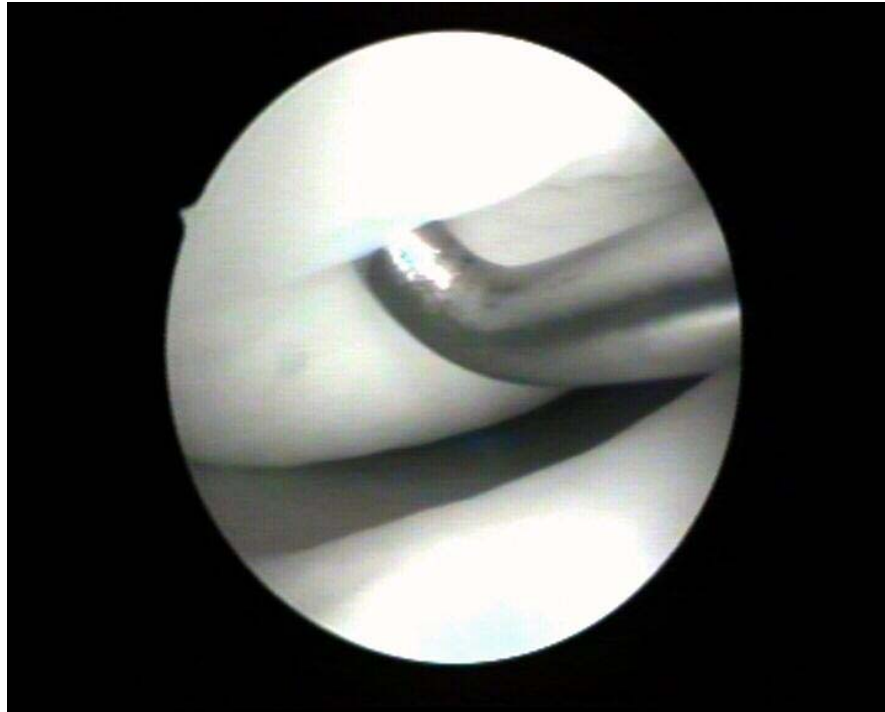


Fig.10. Imatge artroscòpica del cas anterior. S'observa l'estovament del cartílag.

6.-CLASSIFICACIONS DE LES LESIONS DE CARTÍLAG.

Les lesions del cartílag articular poden ser classificades en varies formes. Hi ha dos sistemes molt utilitzats actualment per classificar la severitat de les lesions articulars pel seu aspecte artroscòpic: la classificació d'Outerbridge⁹⁶ i la de Bauer.¹⁰

El sistema de classificació d'Outerbridge va ser dissenyat per avaluar el grau de condromalàcia patel·lar d'un pacient i es sol utilitzar també per avaluar les lesions d'altres parts del genoll. Aquesta classificació permet documentar, d'acord amb les dimensions, la teòrica progressió dels defectes del cartílag. El grau 0 representa el cartílag articular normal. El grau I es refereix als defectes d'estovament del cartílag. El grau II es refereix a les lesions de la substància cartilaginosa sense afectar l'os subcondral ni un tamany superior a 2'5 cm². Hi ha fissures a la superfície. En el grau III hi ha fissures de la

superfície que arriben a l'os subcondral en una àrea d'un diàmetre més gran de 2'5 cm². L'os no està exposat visiblement. En lesions de grau IV l'os està exposat. En la pràctica clínica aquesta classificació és àmpliament adoptada especificant per separat el tamany del defecte.

En un sistema de classificació alternatiu,¹⁰ van descriure sis categories diferents de lesions en funció del tipus de fractura de la superfície. Aquesta classificació és útil per detallar la morfologia inicial de la lesió i la seva causa probable. Per exemple, els graus I al IV estan associats freqüentment a un traumatisme recent. Els graus V i VI, solen ser lesions antigues que han progressat d'un grau anterior o poden representar una malaltia degenerativa articular. La classificació d'Outerbridge està dirigida a un procés degeneratiu. Minas i Nehrer⁸⁹ consideren que la classificació d'Outerbridge està més acceptada pels procediments referents a la reparació del cartílag, ja que es pot determinar una àrea focal simptomàtica candidata a reparació (graus III-IV d'Outerbridge) i classificar la resta de superfície per grau de degeneració. Això és important al moment d'establir comparacions de resultats clínics entre genolls de igual grau degeneratiu tractades per tècniques diferents.

En l'any 2000, la International Cartilage Research Society (ICRS) va acordar un conjunt de qüestionaris aplicables al pacient i al cirurgià per a la valuació de les lesions de cartílag, combinant d'aquesta manera les troballes clíniques i anatòmiques amb una inspecció artroscòpica. En aquests qüestionaris s'adapta un sistema de classificació propi de 5 graus (graus ICRS del 0 al 4). Aquesta classificació reconeix bàsicament com lesions a les fenedures superficials, fenedures profundes i prominències. Cada grau pot comptar amb un o més subgraus. Addicionalment, en aquests qüestionaris, s'inclou una escala pròpia dissenyada per la ICRS per a la osteocondritis dissecant.

7.-PREVALÈNCIA I INCIDÈNCIA DE LES LESIONS CONDRALS

Per ser asimptomàtiques, no existeixen estimacions precises de la prevalença de incidència de les lesions condrials en la població general. Se sap que les lesions del cartílag poden originar-se directament per traumatismes articulars que no es registren, però a més, poden passar secundàriament a un altre tipus de lesions articulars que causen inestabilitat o una distribució anormal de les forces.⁶⁵

Els pacients amb símptomes articulars solen ser investigats, diagnosticats i tractats segons la lesió. Curl i col.³⁰ Van presentar una revisió en més de 30.000 artroscòpies evidenciant més de 53.000 lesions del cartílag en gairebé 20.000 pacients amb una mitja de 2'7 lesions per genoll. En aquest grup, el 9'7 % dels pacients presentava estovament del cartílag en alguna zona, la qual cosa dóna idea del número de lesions de diagnòstic causal que poden estar presents en pacients amb altres símptomes al genoll.

La incidència d'osteocondritis dissecant, en comparació amb les lesions de cartílag per causes traumàtiques, és baixa, i es troba a l'ordre de 6 a 14 pacients per 100.000 habitants⁶³ (fig. 10).

8.-TRACTAMENT DE LES LESIONS CONDRALS

Segons Minas i Nehrer⁸⁹ els objectius de la reparació del cartílag articular han de ser el de restaurar la integritat de la superfície de l'articulació, restablir el balanç complet articular sense dolor i prevenir el deteriorament futur del teixit. No existeix una guia clínica única en el tractament d'aquestes lesions, per tant, sol haver-hi algunes diferències entre els diferents centres en funció de la experiència del seu equip mèdic i dels recursos econòmics disponibles.

Per assolir els objectius comentats, LaPrade i col ⁷³ suggereixen considerar primer els següents factors: tamany de la lesió, localització, alineació dels components articulars i les lesions concomitants.

8.1.-TAMANY DE LA LESIÓ

El tamany té una influència significativa en els símptomes que pot presentar el pacient i en les seves activitats funcionals. Degut a que el tamany de la lesió és important per estimar un pronòstic, s'objectiva en funció de les tècniques d'imatge disponibles (Rx o RNM). ⁷⁶

8.2.-LOCALITZACIÓ DE LA LESIÓ

És important reconèixer si hi ha una lesió única o si són varies. En cas de ser varies lesions s'ha de reconèixer si s'oposen (disposició especular o bipolar) o estan separades, i en quina zona del còndil femoral es troben. Les lesions de la patel·la i del platet tibial solen tenir pitjor pronòstic que les ubicades en el fèmur.

8.3.-ALINEACIÓ DELS COMPONENTS ARTICULARS.

Minas⁸⁸ planteja que els pacients simptomàtics que presenten una mala alineació de la articulació i un defecte subjacent o lesions en mirall, han de ser sotmesos a una osteotomia correctiva prèvia al tractament de les lesions condrials.

8.4.-LESIONS CONCOMITANTS

Lesions que poden causar inestabilitat de l'articulació, per exemple les lesions del lligament encreuat anterior (LEA) del genoll han de ser separades abans del tractament del defecte articular.

9.-ALTERNATIVES QUIRÚRGIQUES PER A LA REPARACIÓ DE LES LESIONS DEL CARTÍLAG ARTICULAR

9.1.-DESBRIDAMENT ARTROSCÒPIC.

Està indicat generalment en pacients amb lesions articulars de $<1 \text{ cm}^2$ o que presentin disposició en mirall. Els malalts que amb un desbridament simple per artroscòpia no responen satisfactòriament al procediment, són candidats a una nova valoració i ser sotmesos a una nova tècnica.³⁰

9.2.-PERFORACIONS SUBCONDRAIS I TÈCNICA DE MICROFRACTURA

Ambdues són tècniques artroscòpiques que poden ser utilitzades, en alguns casos, per a estimular la formació de fibrocartílag sobre un defecte localitzat en els còndils femorals. ⁸⁸ Aquests procediments solen tenir èxit en pacients de menys de 30 anys, amb lesions de menys de 2 cm² (fig. 11). És important controlar a la pacient al llarg el temps, doncs al principi poden respondre molt bé al tractament i als pocs anys recidivar en els símptomes pel desgast o pèrdua del fibrocartílag de reparació. ⁴⁶

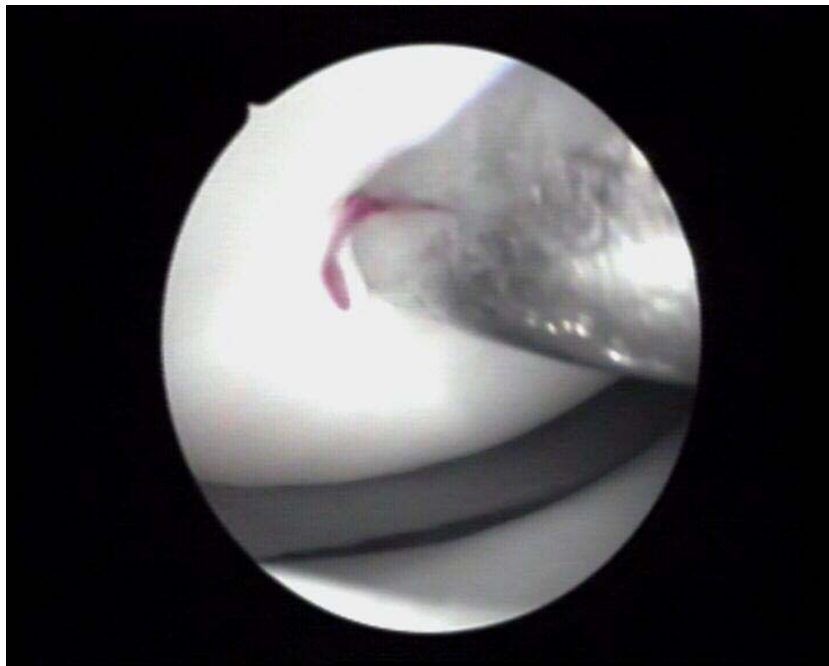


Fig.11. Perforacions artroscòpiques on es veu el sagnat de l'os subcondral.

9.3.-AUTOEMPELTS OSTEOCONDRAIS (TÈCNICA DE MOSAICOPLASTIA)

Consisteix en obtenir fragments d'os i cartílag sa d'àrees de menys càrrega de la mateixa articulació de l'individu, i transferir-lo a l'àrea del defecte de cartílag. El procediment sol ser adequat en lesions de menys de 2 cm² ^{74, 88} (fig. 12). Les àrees

donants i els espais entre els empelts són ocupats amb el temps per fibrocartílag de reparació.



Fig.12. Mosaicoplàstia, on s'observa un fragment osteocondral implantat i l'altre en procés.

9.4.-IMPLANT DE CONDRÒCITS AUTÒLEGS CULTIVATS (TRASPLANTAMENT DE CONDRÒCITS)

És un procés que utilitza els condrocits del mateix pacient per a estimular el creixement i formació d'un nou cartílag que s'aproximi molt al fisiològic. La tècnica quirúrgica es va dissenyar a Suècia a la dècada dels vuitanta. ¹⁴ Les indicacions

generalment acceptades són defectes de $1,5 \text{ cm}^2$ a 4 cm^2 en pacients de < 50 anys d'edat.⁸⁸

Els resultats clínics són molt esperançadors (fig. 13). Les grans sèries de pacients presentades en els últims anys han demostrat que en un seguiment de 2 a 10 anys s'arriba a un 90 % de bons o excel·lents resultats en la reparació de defectes aïllats de cartílag articular, 84 % d'èxit en la reparació d'osteocondritis dissecant i 74 % en la reparació de lesions de cartílag i del LEA.⁸⁸



Fig. 13. Lesió anterior on ja s'ha suturat el periosti i s'estan implantant els condrocits cultivats.

L'alt cost i la llarga rehabilitació del pacient són els principals factors que han impedit que aquest procediment hagi beneficiat a un major nombre de pacients.

9.5.-NOVES EXPECTATIVES

9.5.A.-MATRIUS PER A LA REPARACIÓ DE CARTÍLAG

El futur de la reparació de cartílag ²⁷ està orientat a matrius cel·lulars dissenyades per enginyeria de teixits que serveixen per a sostenir cèl·lules progenitores de condrocits i factors de creixement dins del defecte tissular.

La idea d'una matriu com suport de cèl·lules condroprogenitores sorgeix amb la intenció de mantenir a les cèl·lules implantades efectivament en el lloc de la lesió. Hi ha hagut treballs d'investigació considerables en relació a l'ús de cèl·lules condroprogenitores. ^{35, 80, 81} No queda dubte que aquestes cèl·lules poden diferenciar-se cap una línia cel·lular de condrocits si s'exposa als estímuls adequats. El que no queda determinat encara és la existència d'aquest tipus de cèl·lules en individus d'edat avançada, ja que el seu número i resposta a factors cel·lulars decreix amb l'edat. ^{32, 61}

9.5.B.- IMPLANTS D'AL·LOEMPELT OSTEOCONDRALE

En cas de lesions condrales d'una àrea igual o major de 4 cm², la implantació d'al·loempelts osteocondrales és una alternativa a la mosaicoplàstia o a l'implant de condrocits autòlegs cultivats. ⁸⁸

La reparació de defectes del cartílag articular emprant segments osteocondrales frescos de donant, va ser introduïda per primer cop per Lexer al 1908. ⁷⁷ Mc Dermott ⁸⁶ en els seus estudis sobre l'ús d'al·loempelts per grans defectes articulars traumàtics, va publicar una sèrie de 100 pacients amb bons o excel·lents resultats en el 75 % dels casos als 5 anys i 64 % als 10 anys. Convery i col. ²⁶, emprant al·loempelts per a reparar petits defectes, van trobar 76 % de milloria general en els pacients i van demostrar que en les lesions bipolars, el 86 % dels defectes en còndils femorals medials tenien bons o excel·lents resultats i els seus homòlegs laterals només arribaven a un 56 %.

Aubin i col ³, en una sèrie de 72 pacients van evidenciar la supervivència de l'aloempelt osteocondral en un 85 % dels casos als 10 anys i 74 % als 15 anys, concloent que l'ús d'aloempelts osteocondrals és un procediment valuós en la reparació de grans defectes condrals de la superfície femoral distal.

Gross i col ⁵⁰, en els últims 20 anys han desenvolupat i perfeccionat aquest procediment amb el suport del Sistema de salut de Canadà, obtenint grans sèries de pacients amb un 95 % d'èxit als 5 anys, 71 % d'èxit als 10 anys i 66 % als 20 anys.

Al comparar la tècnica d'implant d'aloempelt osteocondrals amb les tècniques d'enginyeria de teixits s'observa que, a més a més que s'obtenen bons resultats clínics, és un procediment competitiu des del punt de vista econòmic en aquells centres amb programes de donació de teixits.

Els implants d'aloempelts osteocondrals podrien estar al abast d'un major nombre de pacients amb lesions de les superfícies articulars, però el temor a reaccions immunològiques, transmissió de malalties infeccioses i l'alt cost de coordinació administrativa del trasplant, han limitat la extensió d'aquest procediment en la pràctica clínica.

B.-CRIOPRESERVACIÓ

1.-INTRODUCCIÓ

La criopreservació de teixits vius per al seu trasplantament ha adquirit aviat importància pel seu interès clínic; l'èxit obtingut amb sang, semen, còrnies, vàlvules cardíaques, pell, etc., ha fet que en cirurgia de l'aparell locomotor s'investigués i preservació del cartílag articular.^{108, 123} Els condrocits viables són imprescindibles per al manteniment del cartílag hialí, sent substituït aquest per fibrocartílag quan el cartílag articular no és viable, tenint el fibrocartílag una capacitat funcional limitada per a articulacions de càrrega.⁴⁰

La criopreservació, a diferència de la refrigeració i la congelació, es basa en la manipulació del fenomen criogènic amb la finalitat d'evitar la formació de cristalls de gel intracel·lulars i poder, així, assegurar un refredament progressiu i reproduïble segons les característiques del teixit a preservar .



Fig. 14. Càmera de congelació programable.

Amb el descens de la temperatura, les glicoproteïnes de membrana cel·lular pateixen una agregació que permet el pas dels cristalls de gel a l'interior de la cèl·lula. Per tal que això no passi, l'aigua intracel·lular ha de fluir a l'espai intercel·lular. Si la congelació es realitza de manera ràpida, les proteïnes de membrana pateixen una agregació abans que la cèl·lula s'hagi deshidratat i els cristalls de gel, que es formen per continuïtat, penetren a l'interior de la cèl·lula. D'altra banda, la concentració de soluts en el medi extracel·lular és considerablement major que en el citoplasma, i això en principi afavoriria la deshidratació cel·lular, però si s'inicia l'agregació de les glicoproteïnes amb una concentració de soluts extracel·lulars elevada, l'aigua flueix a l'exterior de manera molt ràpida i es produeix la mort cel·lular.

Les cèl·lules dels mamífers contenen molècules de baix pes molecular dissoltes a una concentració aproximada de 0,15 M NaCl, amb un punt de congelació pròxim a 267,15 °K (-6°C). De totes maneres, la matriu extracel·lular no es congela fins els 263,15 °K (-10°C).

La congelació ha de seguir una sèrie de principis generals per a la preservació criogènica dels teixits biològics. La taxa de canvi de la temperatura ambient a 1 o 2 graus (°K o °C) per sota del punt de congelació, pot tenir efectes importants en la viabilitat si les cèl·lules són sensibles al shock tèrmic (fig. 14). Entre 269,65 °K i 278,15 °K (-3,5°C i 5°C) la mostra es pot congelar introduint-la en gel, al posar-la en contacte amb una superfície d'una sonda freda, per vibració mecànica o per descens ràpid de la temperatura del mitjà. Donat que la congelació és un procés exotèrmic, el calor que va perdent la mostra ha de ser extret de la solució congeladora. El gel es forma inicialment en el medi extracel·lular, per ho que en la fase de congelació es produeixen quantitats creixents d'aigua lliure. Les membranes cel·lulars, hidròfobes, actuen com una barrera per la nucleació del gel intracel·lular i per tant les cèl·lules no congelades són exposades a una solució creixentment hipertònica (resultat del segrest d'aigua pel gel i del augment de la

concentració de sals extracel·lulars). Les cèl·lules no congelades s'encongeixen degut al transport d'aigua fora d'elles en resposta al balanç osmòtic entre els fluids extra i intracel·lulars. Aquest punt exotèrmic es coneix també com punt crític de la congelació. Per tant, les mostres han de ser refredades a una taxa que ha de ser determinada per cada tipus de cèl·lula. Per la majoria de les cèl·lules nucleades dels mamífers mantingudes en DMSO o glicerol, la taxa òptima de congelació es troba entre 0,3 i 10 graus (°K o °C) per minut.

El cartílag intacte tractat amb criopreservant i congelat a -80 °C només obté un 10 % de supervivència després de la congelació i descongelació; si la congelació es realitza amb un programa de velocitat establert, la viabilitat pot arribar al 40-50 %¹²³. Donat que la criopreservació en si produeix una destrucció de part dels condrocits, produeix també una disminució parcial de la immunogenicitat de l'empelt.^{108, 117}

2.-HISTÒRIA

Els primers treballs es deuen a Spallanzani a finals del s. XVIII va investigar l'efecte de "El fred i de la neu hivernal" en els espermatozous i en la morfologia dels ous dels cucs de seda .

La criopreservació en sentit estricte s'inicia a mitjans del s. XX, desenvolupat per Luyet et al i pels equips de Chang i Polgue.⁷⁹ Va ser precisament Polgue i Smith els qui van descobrir accidentalment les propietats crioprotectores del glicerol al intentar millorar l'eficàcia de congelació dels espermatozous.

La investigació sobre les possibilitats de criopreservació aplicada a l'àmbit hospitalari va rebre un fort impuls arran de l'interès de l'"American Red Cross" en la congelació d'alguns teixits humans. D'aquests estudis, es varen obtenir dades que no

estaven directament relacionades amb els processos de milloria dels protocols de congelació i dels danys cel·lulars que això es derivava .

Posteriorment, el 1959, Lovelock i Bishop van trobar un altre crioprotector, en general més eficaç, el dimetilsulfòxid (DMSO).¹²⁶ L'any 1963 Mazur va publicar, sobre la base d'estudis de congelació de cèl·lules sanguínies, les primeres equacions de cinètica de deshidratació cel·lular intrínseca de la congelació.

2.1.-CRIOPRESERVACIÓ DE TEIXIT CARTILAGINÓS

Curran i Gibson³¹ realitzaren estudis històrics sobre la criopreservació de condrocits, els quals van valorar l'efecte de la congelació en fragments de cartílag, congelant-lo ràpidament, amb la qual cosa no varen obtenir cèl·lules viables, indicant que la matriu del cartílag impedia la difusió del crioprotector.

Heyner⁵⁸ va observar que els teixits cartilaginosa tractats amb tripsina semblaven sobreviure a la congelació. A l'any 1965 Smith¹¹² va comunicar que les cèl·lules cartilaginosa són viables després de la congelació si es sotmeten a una velocitat de congelació lenta i primerament han estat tractades amb enzims proteolítics.

Tomford¹²² en el seu treball valora la toxicitat dels diferents crioprotectors, els mètodes de congelació i l'activitat dels condrocits després de la congelació. Els resultats mostraven que la toxicitat dels criopreservants dependrà del temps i la temperatura d'exposició, així com de la concentració. La màxima viabilitat es va obtenir mitjançant dues fases de refredament, usant una disminució inicialment lenta fins a -40 °C i després un refredament ràpid fins -80°C. Després de 72 hores en cultius, els condrocits mostraven una segregació abundant de proteoglicans.

Marco ⁸⁴ ha determinat els protocols òptims de criopreservació per alloempelts osteocondrals, conclouent que els millors resultats s'obtenen amb l'emmagatzematge en refrigeració a 4 °C i amb la congelació prèvia exposició amb glicerol, amb un període ideal de conservació refrigerada de 48 h; catalogant com a imprescindible el refredament lent de les peces i la crioprotecció. Establint com la pauta més idònia el pretractament amb glicerol o DMSO al 15 % durant 60 minuts i el descens controlat de la temperatura.

Schachar ¹⁰⁵ va descriure que la conservació dels empelts osteocondrals a baixes temperatures podia ser una solució als problemes organitzatius del procés de trasplantament a fresc dels empelts osteocondrals, doncs permet aplicar un sistema d'esterilitat en l'empelt, possibilita determinar la millor peça anatòmica pel pacient en funció de les seves dimensions, indueix una probable disminució de la immunogenicitat i facilita el transport de l'empelt, fomentant així l'intercanvi de teixits entre institucions.

Quan Schachar ¹⁰⁵ es refereix a l'emmagatzemament a baixes temperatures, des del punt de vista criobiològic, fa menció a l'emmagatzemament en ambients, les temperatures dels quals, es troben per sota del punt de congelació en els éssers vius (generalment es troben per sota del zero graus Centígrads). En referència a la preservació a baixes temperatures del cartílag articular, s'han investigat extensament dues metodologies: la congelació i la criopreservació.

La congelació va ser el primer mètode que es va intentar per a la preservació a baixes temperatures d'empelts osteocondrals. Heyner ⁵⁸ va publicar diversos experiments de congelació del cartílag emprant embrions de pollastre, rata i ratolí. Va trobar que el cartílag hialí exposat directament a -40 °C, per períodes variables, no era metabòlicament viable; però no hi havia diferències clínicament significatives amb el cartílag fresc si prèviament a la congelació el teixit es submergia en solucions de glicerol. El glicerol actuava prevenint la formació de cristalls de gel dins la cèl·lula, evitant així els

efectes letals d'aquests. Múltiples autors han estudiat el temps de viabilitat dels empelts congelats, variant entre 7 i 40 dies, disminuint la viabilitat dels condrocits amb el temps d'emmagatzematge en congelació.^{91, 130, 131}

Smith A. (1965) va aplicar els seus coneixements de criopreservació de gamets bovins a la conservació a baixes temperatures del cartílag hialí, publicant amplis experiments on mantenia actiu el metabolisme de condrocits humans aïllats que havien estat guardats en Dimetil Sulfòxid (DMSO) a -79°C durant una setmana.

Des d'aleshores s'han assajat múltiples tècniques de criopreservació pel cartílag articular, demostrant que la viabilitat del condrocit és superior quan es criopreserva aïllat que en el teixit intacte, quan s'utilitza DMSO en lloc de glicerol i que quan s'intenta criopreservar en DMSO el cartílag hialí intacte en forma d'empelt osteocondral la supervivència dels condrocits està limitada a la capa superficial del teixit^{1, 8, 22, 29, 47, 47, 66, 67, 72, 72, 91, 92, 115}

Altres autors han avaluat altres mètodes de criopreservació, com el glicerol al 15 %⁴⁷ on obtenien millors resultats en zones de càrrega que en les de no-càrrega.

A pesar de que les tècniques de preservació d'alloempelts osteocondrals no permet mantenir en un 100 % la viabilitat dels condrocits, clínicament s'han obtingut resultats rellevants¹⁰⁶, possiblement per les característiques biomecàniques del teixit com una totalitat.^{6, 47, 91, 92, 102}

Schachar i col.¹⁰⁶ van avaluar les dues tècniques de conservació d'empelts osteocondrals, demostrant experimentalment que els alloempelts osteocondrals criopreservats donen millors resultats en la integració a 3, 6 i 12 mesos que els seus homòlegs congelats. A més, van concloure que la integritat de la membrana del condrocit era l'indicador més vàlid per estimar els resultats de l'empelt a l'individu. La

criopreservació també modifica la antigenicitat dels al·loempelts, podent alterar així la resposta immune contra el mateix.¹⁰⁴

3.-PRINCIPIS DE LA CRIOPRESERVACIÓ

3.1.-EFECTES DIRECTES DE LA DISMINUCIÓ DE LA TEMPERATURA

Al refredar cèl·lules i teixits cel·lulars molt per sota del punt de congelació dels medis que els mantenen es produeixen una sèrie de canvis biològics i físicoquímics a nivell de l'aigua, l'activitat enzimàtica, la membrana plasmàtica i l'esquelet cel·lular.

a) A nivell dels canvis en el aigua, podem considerar aquesta a temperatura ambient, com una mescla de molècules estructurades de manera tetraèdrica i molècules lliures, a mesura que disminueix la temperatura s'incrementa la proporció de formes estructurades, d'aquesta manera respon al refredament augmentant el volum i per tant reduint la densitat, aquest augment de volum es una de les principals causes de mort cel·lular, tant per l'estrès osmòtic com mecànic, per la formació de gel dins la cèl·lula. És per això que l'èxit de la criopreservació depèn de l'adequada deshidratació cel·lular, prevenint, d'aquesta manera, la formació de gel intracel·lular. El procés de solidificació té clarament dues etapes, la fase de nucleació o de generació de punts de cristallització i la fase d'extensió dels fronts de solidificació, això es produeix a temperatures entre -5°C i -10°C . Els centres de cristallització apareixen aleatòriament en cas de líquid completament homogeni, no complint-se en el medi de congelació a conseqüència de partícules en suspensió, cèl·lules, imperfeccions dels contenidors i de la superfície per si mateixa. La nucleació s'inicia principalment en el medi extracel·lular expandint-se a través del mateix. A partir d'aquesta situació, les cèl·lules han de perdre aigua, es deshidraten a fi de mantenir un equilibri osmòtic en un medi cada cop més hipertònic degut a la creixent

formació de gel. Si la taxa de refredament és massa ràpida no es pot assolir l'equilibri, formant-se gel intracel·lular, si la taxa de refrigeració és massa lenta, s'allarga la deshidratació fins el col·lapse cel·lular que també és letal. Existeixen paràmetres que influeixen marcadament aquest flux d'aigua intra-extracel·lular:

- La permeabilitat de la membrana plasmàtica a l'aigua. (L_p)
- La proporció entre superfície i entorn cel·lular (A/V)
- L'energia d'activació (E)

En conseqüència la taxa màxima de refredament varia en funció de la composició de la membrana de cada tipus cel·lular i de la relació A/V . Les cèl·lules amb membranes molt permeables presenten corrents de sortida d'aigua més ràpides i per tant refredaments més ràpids, mentre que les cèl·lules més voluminoses tot ho contrari.

b) Respecte a l'activitat enzimàtica existeix una notable disminució de la mateixa (disminueix 8 vegades quan la temperatura decreix de 37°C a 7°C), i en això recau l'interès de la criopreservació, ja que a temperatures inferiors a -60°C pràcticament no hi ha cap tipus d'activitat, i a temperatures de nitrogen líquid (-196°C) totes les formes d'activitat bioquímica es paren, de manera que no pot existir modificació de l'ADN, per tant la criopreservació és capaç de mantenir el material biològic congelat invariable infinitament, les úniques alteracions que el podrien afectar serien les provinents de l'exterior, com per exemple les ionitzacions per reaccions fotofísiques rebudes durant un temps d'emmagatzematge considerable, les quals en absència de mecanismes de reparació s'acumularien.

c) La naturalesa dels àcids grassos i el seu grau d'insaturació defineixen, per les membranes plasmàtiques, punts de fusió relativament baixos, així el pas de lípids fluids a sòlids es presenta a temperatures entre 10 i 16°C ; a més, el pas de mosaic fluid a una disposició sòlida confereix a la membrana un alt grau de fragilitat, perdent la capacitat

d'adaptar-se a canvis de volum. Les alteracions de la fase lipídica en la membrana plasmàtica intervenen en el fenomen de "xoc tèrmic".

d) Una part important del citoesquelet està composta per microtúbuls, altament termosensibles, per sota de 4 ° C es desestructuren i per tant les cèl·lules un cop descongelades, han de reconstruir aquesta part de la seva arquitectura.

3.2.-EFECTES INDIRECTES DE LA DISMINUCIÓ DE LA TEMPERATURA

- a) Les molècules adopten la seva forma en funció de les relacions que estableixen amb l'aigua líquida (proteïnes, lípids de membrana, etc...). Al congelar cada cop hi ha menys aigua líquida per mantenir les interrelacions amb les molècules biològiques, ja que cada cop hi ha més gel i a més les relacions queden debilitades.
- b) La solubilitat dels gasos en l'aigua també es veu afectada, descrita per la llei de Henry:

$$\text{Concentració de gas dissolt} = \text{Pressió} \times \text{Coeficient de solubilitat}$$

Per tant, a grans trets, la solubilitat augmenta al refredar-se la solució dissolvent. En criobiologia té importància la solubilitat pel CO₂, de manera que en un medi refredat pot arribar a contenir dissolt més del doble de CO₂ del que inicialment contenia a 25 ° C. Aquest increment és molt superior als valors corresponents als coeficients del O₂ i el N₂. La importància radica en que la majoria dels medis basen la seva estabilitat en l'acció tamponadora del sistema HCO₃⁻ - H⁺, desplaçant el rang de pH cap a valors àcids.

3.3.-SOBREREFREDAMENT

En un procés de refredament molt lent i estàtic de manera programada, degut a la falta de nuclis de cristallització, apareix el fenomen de sobrefredament, per aquesta raó podem trobar que als $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ encara no s'hagi format gel, quan s'inicia la formació de gel, l'aigua congelada allibera el calor latent de fusió o de solidificació, provocant un escalfament momentani del medi que pot arribar als 0°C , independentment de la taxa programada (fig. 15). Com que el programa manté la taxa de refredament, ràpidament la mostra es refreda. Aquest refredament descontrolat de la mostra es du a terme a una velocitat molt més alta de la prevista i tolerada per les cèl·lules, per això s'ha d'evitar.

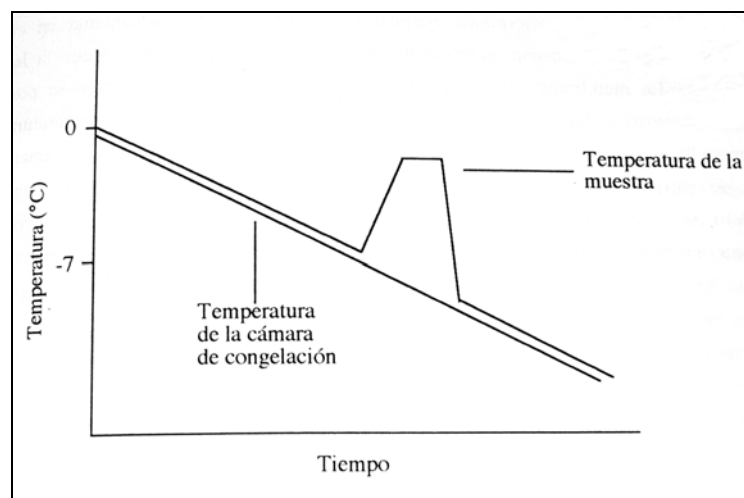


Fig. 15. Sobrefredament i alliberament de calor latent de fusió

3.4.-INDUCCIÓ DE LA FORMACIÓ DE GEL (SEEDING)

La inducció de la formació de gel a temperatures al voltant de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ evita el fenomen del sobrefredament. Aquesta inducció es realitza al voltant dels $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Després d'iniciar-se el "seeding", el front de gel format progressa fins assolir tot el volum del contenidor.

4.-CARACTERÍSTIQUES DELS FACTORS DE LA CRIOPRESERVACIÓ.

L'AGENT REFRIGERANT O CRIOGEN.

4.1.- L'AGENT REFRIGERANT

L'agent refrigerant comunament utilitzat és el nitrogen líquid, el qual permet assolir temperatures de 77,15°K (-196°C), on no existeix energia tèrmica suficient per a reaccions metabòliques intracel·lulars ⁸⁷ (fig. 16).



Fig. 16. Cubes de nitrogen líquid on poden estar les mostres per llargs períodes de temps.

Un agent criogen ideal te que tenir una alta conductivitat tèrmica, elevada capacitat calòrica, un baix punt de pressió atmosfèrica, un alt coeficient de calor específic i un alt rang de temperatures entre el punt de congelació i d'ebullició .⁵⁶

Altres agents refrigerants que poden ser utilitzats són el Freon 22 o el propà líquid. Si es desitgen arribar a temperatures molt baixes, és possible realitzar un super-refredament. Per exemple, el propà líquid es pot refredar amb nitrogen líquid i així arribar a temperatures molt baixes. També és possible crear una barreja refrigerant de dos agents criògens com propà i isopentà.

4.2.-L'AGENT CRIOPROTECTOR

Al 1949 Polgue i Smith, de manera accidental, van descobrir les propietats crioprotectors del glicerol quan intentaven millorar l'eficàcia de congelació dels espermatozous ²¹. Posteriorment, al 1959, Lovelock i Bishop van descobrir un altre crioprotector, el dimetilsulfòxid (DMSO). Actualment es classifiquen en crioprotectors permeables i no permeables a la membrana cel·lular. Els permeables són molt solubles i de baix pes molecular, en general a concentracions multimolars protegissin de les lesions produïdes per congelacions lentes. Els més utilitzats són el DMSO, glicerol i propilenglicol.

El seu mecanisme d'acció es basa en les seves propietats coligatives (disminució del punt de fusió), així són més eficaços els que mostren una elevada afinitat per l'aigua i no tenen toxicitat a altes concentracions. No es coneix exactament el mecanisme d'acció dels crioprotectors, empíricament es diu que produeixen una disminució del punt de fusió i del punt eutèctic. Això implica que la concentració de sals a una determinada temperatura sigui menor, o dit d'una altra manera, que una concentració determinada es aconsegueixi a una menor temperatura, de manera que hi així un menor gradient osmòtic.

Les funcions dels crioprotectors són ⁸⁵:

- Evitar que la cèl·lula arribi al volum mínim crític, mitjançant la reducció del xoc osmòtic de la cristal·lització. El crioprotector, en unir-se a les molècules d'aigua provoca que part d'elles siguin incongelables.
- Reduir els riscos de cristal·lització intracel·lular disminuint el volum cel·lular i augmentant la viscositat del citoplasma.
- Modificar la naturalesa del gel, fer que la seva estructura sigui menys espinosa i reduir les lesions mecàniques sobre la membrana cel·lular.
- Evitar les hiperconcentracions salines intracel·lulars.

Els crioprotectors permeables sempre presenten una permeabilitat inferior que la del aigua. Això implica que quan s'introdueixen o retiren de la cèl·lula, es produeixen diferències transitòries en la seva concentració entre els espais intra i extracel·lular, establint-se un gradient osmòtic que poden provocar un flux d'aigua cap a l'interior o exterior de la cèl·lula.

La velocitat de penetració dels diferents crioprotectors depèn de la naturalesa d'aquests, del tipus cel·lular i de la temperatura a la que es realitza el procés. De tota manera els canvis de volum que es produeixen a la cèl·lula durant la introducció o sortida de l'agent són suficients per a produir la lisi de la mateixa, per això és d'extremada importància aquest pas. A part dels riscos en quant a la variació de volum els crioprotectors són tòxics en exposicions prolongades i sobre tot a altes concentracions. La toxicitat (i la cinètica de penetració) del DMSO també depèn de la temperatura a la que es realitza la exposició i del temps d'exposició.

Encara que han estat descrits varis agents crioprotectors, els millors protocols de congelació utilitzen tant DMSO com glicerol a concentracions de 0,5 a 3 M. El DMSO és altament permeable a les membranes cel·lulars i normalment pot ser barrejat directament amb les mostres a concentracions adequades. La majoria d'investigadors afegeixen els

agents crioprotectors tant a temperatura ambient com a 277,15 °K (4°C). El temps requerit per l'equilibri osmòtic a aquesta temperatura és substancialment més llarg que a 310,15 °K (37 °C), però això pot donar com a resultat un menor estrés per a la cèl·lula i per tant una major viabilitat.

La permeabilitat del glicerol a través de la membrana cel·lular és més lenta que la del DMSO. Per això és necessari un temps més llarg per aconseguir l'equilibri osmòtic abans de la congelació. Per minimitzar els problemes osmòtics causats per la lenta taxa d'equilibri, s'utilitza la tècnica d'adició de glicerol en múltiples seqüències.

Per últim dir que els crioprotectors no permeables solen ser d'alt pes molecular, que en concentracions molars reduïdes, també confereixen cert grau de crioprotecció. Generalment demostren la seva eficàcia a altes velocitats de congelació i per si soles són efectives en escasses espècies cel·lulars (eritròcits). Els més utilitzats són: polivinilpirrolidona, dextrà, polietilenglicol, hidroxietilmidó i glucosa.

Els agents crioprotectors com la polivinilpirrolidona o l'hidroxi-etil-almidó, són més efectius en la protecció de sistemes biològics congelats a taxes ràpides. Tals agents són grans macromolècules que afecten les propietats de la solució en major mesura que la que caldria esperar per la seva pressió osmòtica i aparentment actuen directament sobre la membrana cel·lular. La protecció es deguda a les forces oncòtiques (pressió osmòtica col·loïdal) exercida per grans molècules, així com per alteracions de l'activitat de l'aigua no congelada produïda per l'encadenament a aquesta de les macromolècules dels agents. Sota determinades condicions, es produeix un efecte sinèrgic entre els agents crioprotectors permeants i no permeants.

Els crioprotectors, especialment el DMSO, són potencialment citotòxic, per ho que és important reduir el seu contacte directe amb les cèl·lules (fig. 17). No obstant, en el cas

de teixits densos com el cartílag, és necessari deixar l'agent crioprotector dissolt en el medi nutritiu durant la congelació.

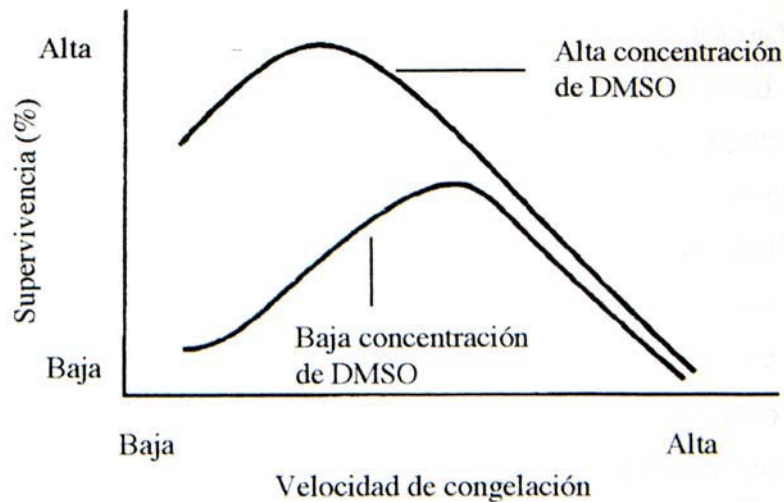


Fig. 17. Relació entre la supervivència cel·lular, velocitat de congelació i concentració de l'agent crioprotector.

4.3.-SOLUCIONS CRIOPROTECTORES

Es solen utilitzar mescles d'agents crioprotectors creant així les solucions crioprotectors que tenen l'avantatge de que la concentració total de solut és incrementada en la mostra sense augmentar excessivament la concentració de qualsevol agent crioprotector, evitant així l'efecte tòxic del mateix.^{9, 42, 102}

Existeixen multitud de solucions crioprotectors amb petites variacions entre elles, utilitzant-se unes o altres depenent del teixit a criopreservar i de l'experiència del grup amb aquella solució.^{13, 62, 82, 104, 114}

No existeix en la literatura un medi criopreservant pel teixit cartilaginós de manera estàndard, sent una de les solucions més utilitzades en el teixit cartilaginós el RPMI

(Roswell Park Memorial Institute, RPMI) (composició més endavant) amb una concentració de DMSO entre el 5 i 15 %.

Carbonell i Suso ^{21, 118} va obtenir bons resultats amb la utilització de RPMI i DMSO al 10 % en la criopreservació de teixit cartilaginós, demostrant també la gran diferència observada amb el grup d'empelts congelats.

El grup de criopreservació que ha col·laborat en la nostra investigació ha obtingut molt bons resultats, tant experimentals com clínics, amb la criopreservació de vasos de petit calibre en medi Krebs-Henseleit modificat (composició explicada més endavant) ^{103, 104, 114}, demostrant la integritat dels empelts criopreservats fins a 6 mesos. Aquest medi de criopreservació no ha estat utilitzat fins la data d'avui en la criopreservació de teixit cartilaginós.

4.4.-ALTRES SOLUTS AFEGITS AL MEDI DE CONGELACIÓ

La sucrosa o sacarosa és un disacàrid impermeable a la membrana plasmàtica, que es sol incloure per forçar el gradient osmòtic i aconseguir velocitats més altes d'entrada del crioprotector durant la congelació, i també velocitats més ràpides de sortida durant la dilució (així s'extrau abans el crioprotector i es minimitzen els efectes tòxics que puguin ocasionar). S'utilitza àmpliament l'albumina sèrica a diferents concentracions, ja que se li atribueix un efecte estabilitzador de membranes, i la congelació/descongelació en gran part es tradueix en processos d'estrès sobre les mateixes.

La preferència de una solució sense L-Glutamina es deu a l'efecte sobre la pressió oncòtica que s'obté amb l'aminoàcid pot obtenir-se igualment amb l'albumina humana. ²¹

L'albumina s'agrega a la solució crioprotectora per a mantenir la pressió oncòtica i reduir la fuga de soluts de la cèl·lula a la matriu extracel·lular i d'aquí a la solució

criopreservant durant el procés de descens de la temperatura. A més exerceix, per mecanismes no del tot coneguts, una influència protectora contra la desnaturalització de les proteïnes a baixes temperatures. Aparentment comparteixen aquestes propietats altres agents de la solució criopreservant.²

4.5.-ELS AGENTS ANTIMICROBIANTS

S'han utilitzat antimicrobians per evitar la proliferació bacteriana en els medis de cultiu destinats a la criopreservació de cèl·lules i teixits. Encara que no s'han investigat amb exactitud, es sospita que addicionalment tenen un efecte osmòtic dins les solucions.

5.-LA VIABILITAT POST-CRIOPRESERVACIÓ.

El terme viabilitat pot ser definit com l'habilitat d'una cèl·lula o teixit a mantenir-se a si mateix i a interactuar de manera normal amb el seu ambient. Per cada teixit hi ha una viabilitat cel·lular llindar per sota de la qual queda compromesa el funcionalisme i la vitalitat del teixit.¹⁵

El procés de criopreservació compren diverses fases, cada una amb els seus riscos per la viabilitat cel·lular. El primer risc que enfronta el teixit és la isquèmia durant el procés comprés entre l'aturada del batec cardíac del donant fins la seva extracció. Igualment el mètode de recol·lecció ha de ser controlat, ja que el traumatisme durant la manipulació pot resultar en una pèrdua de la viabilitat. Un cop extrets, els teixits han de ser transportats a un laboratori de criopreservació en el menor temps possible. Les variables que han de ser considerades pel seu emmagatzemament són la temperatura, el temps i la composició de les solucions. Durant el procés de criopreservació i

descongelació, la taxa de refredament, la taxa de calentament, el dany per cristalls de gel i els efectes osmòtics poden afectar potencialment la viabilitat.

Brockbank i col. ¹⁵ van avaluar els procediments freqüentment utilitzats per a estimular la viabilitat de teixits que han estat sotmesos a criopreservació. Contemplen quatre grans grups:

- 1.-Procediments morfològics: inclouen estudis histològics rutinaris, localització d'antígens de superfície, microscopia electrònica de transmissió i de rastreig. Aquests dos últims s'utilitzen per una ràpida valoració d'assajos de viabilitat de desenvolupament.
- 2.-Estudis de proliferació: per cultiu cel·lular.
- 3.-Assajos metabòlics: per captació de substàncies marcades radioactivament.
- 4.-Assajos mecànics.

Els procediments morfològics s'utilitzen per a avaluar l'estructura i determinar si les cèl·lules o els teixits mostren signes d'anormalitats patològiques.

Els assajos tincionals tradicionals d'exclusió que medeixen la integritat de membrana cel·lular poden correlacionar-se poc amb la viabilitat de cèl·lules congelades i descongelades, ja que pot obtenir-se una sobreestimació de la fracció de viabilitat cel·lular en presència d'agents crioprotectors extracel·lulars d'alt pes molecular, tals com la polivinilpirrolidona o l'hidroxi-etil midó. ¹⁵

L'ús de tècniques de tinció immunològiques també tenen problemes potencials. La presència d'antígens cel·lulars específics no implica necessàriament que la cèl·lula estigui viva, perquè els antígens poden ser encara detectats en cèl·lules mortes. De la mateixa manera, l'absència d'un antigen no implica la mort d'un tipus cel·lular, ja que la cèl·lula pot perdre antígens i sintetitzar-los novament.

Els estudis amb microscopia electrònica, a pesar de que no aconsegueixen determinar directament la viabilitat, si permeten intuir-la inicialment segons l'estructura

externa o ultraestructura de la cèl·lula o teixit. Per exemple, en cas d'existir lesions a nivell de la membrana cel·lular dels condrocits de les capes més externes del cartílag després de la seva preservació, es podria estimar que no tindran millors resultats que aquells teixits on la morfologia del condrocit és similar a la que presenta en estat fresc.¹⁰⁶

A pesar de totes aquestes limitacions, les tècniques morfològiques són excel·lents per una primera valoració de procediments experimentals, en especial quan els assajos més específics són més costosos i consumeixen més temps.

Els assajos metabòlics i de proliferació poden ser utilitzats per mesurar els efectes de la obtenció de teixits i de les tècniques de preservació tant a nivell tissular com cel·lular. La majoria dels assajos bioquímics i enzimàtics són realitzats en poblacions cel·lulars. Així mateix, un altre tipus de procediment com és el cultiu cel·lular permet determinar el potencial reproductiu de la població. Per a que aquests assajos siguin quantitius, la capacitat funcional de les mostres congelades i descongelades han de relacionar-se amb la població cel·lular inicial (estat fresc), i els resultats expressats en relació a la proporció de teixit original que podrien donar una activitat comparable. Un problema amb aquest tipus d'assaig és la dificultat de diferenciar entre la meitat de la població cel·lular que perd el 100% de capacitat funcional, o la pèrdua d'un 50 % de la capacitat funcional de tota la població cel·lular.

En els assajos cel·lulars, cèl·lules individuals són observades o examinades en relació a la seva habilitat de mantenir funcions específiques tals com divisió cel·lular, quimiotaxi i fagocitosi.

Amb l'aparició de les tècniques d'anticossos monoclonals, es poden reconèixer agents bioquímics i enzims en cèl·lules individuals. Aquests assajos poden detectar només el percentatge de cèl·lules morfològicament intactes que estan presents després

del cicle de congelació i descongelació. Per tant, és de gran importància determinar la població cel·lular després d'un procediment experimental.^{67, 113}

L'elecció dels assajos de viabilitat varien segons el tipus de cèl·lula i teixit, i han de reflexar el funcionalisme biològic normal de la cèl·lula.

Basat en la seva capacitat regenerativa, Brockbank i col¹⁵ classifiquen a les cèl·lules de l'organisme en làbils, estables i permanents. Les làbils es reproduïxen constantment, les estables mantenen la seva capacita, però usualment no és multipliquen, i les permanents no es poden dividir.

Sota condicions fisiològiques, les cèl·lules làbils (limfòcits, per exemple) proliferen al llarg de la seva vida, reemplaçant a les cèl·lules que contínuament estan sent destruïdes. Els assajos de proliferació són els millors per medir la viabilitat d'aquests tipus de cèl·lules i estudiar si el seu funcionalisme biològic és normal. Aquests assajos determinen la capacitat de la cèl·lula per entrar en el seu cicle de divisió o amb precursors de ADN marcats radioactivament o amb cultius in vitro.

La viabilitat de les cèl·lules estables també pot ser determinada pels assajos de proliferació, ja que mantenen la seva capacitat de multiplicar-se en front d'un agent lesionant. En aquells teixits com el cartílag, que és el que més s'adapta a aquesta descripció, convé combinar assajos de proliferació amb assajos de funcionalisme com la captació d'aminoàcids marcats, amb la finalitat de demostrar la activitat biosintètica.

En el cas de les cèl·lules permanents, com les neurones o les cèl·lules dels illots de Langerhans, els assajos de divisió cel·lular no són rellevants.

En conclusió, els assajos de viabilitat postcriopreservació depenen del tipus de cèl·lula i de les funcions que elles compleixen en l'organisme.

6.-IMPORTANCIA DE LA SUPERFÍCIE DE L'EMPELT OSTEOCONDRALE.

Schachar ¹⁰⁶ va demostrar que el cartílag criopreservat implantat en animals d'experimentació, podia presentar canvis degeneratius, a pesar de mantenir-se adequadament el funcionalisme de l'articulació. Aquests resultats van portar els autors a suggerir que la congelació o la criopreservació del cartílag per les tècniques actuals no perjudiquen significativament les propietats biomecàniques del teixit.

Es creu que els canvis degeneratius en els alloempelts osteocondrals comencen per la capa més externa del cartílag, la qual és abordable amb tècniques d'estudi morfològic com la microscopia electrònica de rastreig. L'estudi del cartílag articular a aquest nivell, també ha estat objecte de múltiples publicacions pel fet de la seva possible relació amb l'artrosi. ^{25, 33, 72, 78, 98, 119}

Per altra part, la disrupció de la capa superficial d'un al·loempelt osteocondral pot facilitar la resposta immunològica del receptor cap als components del teixit cartilaginós. Friedlaender i col ⁴⁰ han estudiat aquest tipus de resposta immunològica i han arribat a la conclusió que, aparentment, no afecta els resultats de l'implant en el pacient, encara que es requereixen estudis més profunds sobre el tema.

7.-ESCALES PER L'ESTUDI DE LA MORFOLOGIA DE LA SUPERFÍCIE

Juverlin i col ^{57, 68} van desenvolupar una escala per l'estudi de la morfologia de la superfície articular amb microscopia electrònica de rastreig. Per això van utilitzar patelles de conill New Zealand pertanyents a tres grups: un grup de conills amb genolls immobilitzats, un altre sotmesos a exercicis diaris i l'últim de control. A partir dels registres fotogràfics van plantejar una escala de tres categories (irregularitat, rugositat i fenèdres de superfície), cada una amb múltiples subcategories, entre les que es troba la de

“superfície no classificable”. Aquest grup proposa la seva escala per l'estudi experimental dels canvis que puguin presentar-se en la superfície articular. De totes maneres, ells no van validar l'escala, doncs no van quantificar la variabilitat inter i intraobservador. Per altra part, aquesta escala no va ser dissenyada per valorar canvis en la superfície com a producte de diferents mètodes de preservació de la mostra. Tampoc s'inclouen en aquesta escala diferències en relació als artefactes que potencialment es podien generar per la metodologia de fixació de mostra que requereix el microscopi electrònic de rastreig.

Hong i Henderson ⁶⁰ es van basar en l'escala proposada per Juverlin i la van modificar amb la finalitat d'estudiar els canvis en la superfície del cartílag patel·lar després de la immobilització en genolls de rates. A pesar de que els autors van fer crítiques importants a l'escala, particularment en referència a la possibilitat de que ocasionalment s'estiguessin classificant artefactes en lloc d'accidents topogràfics, els investigadors es van basar en la metodologia original de Juverlin emprant microscopia electrònica de rastreig, però tampoc van validar la seva escala per variabilitat intra o interobservador.

La importància de conèixer si una nova escala és vàlida, no és sinònim de dir si és útil. En moltes ocasions és pràcticament impossible conèixer totes les alteracions probables que podem trobar en una situació experimental, però si coneixem els límits de l'escala o sistema de classificació usat, l'investigador coneix fins quin punt poden ser fiables les seves observacions.

O'Connor i col ⁹⁴ van realitzar descripcions de còndils femorals de gossos posteriors a la secció del lligament encreuat anterior, usant tècniques de microscopia electrònica de rastreig convencional i de baixa temperatura. En aquests treballs es descriuen canvis probablement de tipus degeneratiu precoç, però no s'utilitza un sistema de classificació validat, motiu pel qual les descripcions podrien ser jutjades dins del camp

de la subjectivitat. En aquesta oportunitat, tampoc es menciona el probable efecte de les tècniques de fixació a baixes temperatures o convencionals dins l'obtenció d'imatges per microscopia electrònica.

C.-MICROSCOPIA ELECTRONICA

1.-EL MICROSCOPI ELECTRONIC DE RASTREIG (MER)

Basat en principis de teoria atòmica, per a que un espècimen pugui ser estudiat amb microscopia electrònica de rastreig és necessari que la mostra passi prèviament per un procés de fixació per mecanismes físics i químics, ja que les condicions extremes a les que es sotmet, podrien alterar significativament la seva morfologia.^{113, 127}

Encara que es posin les condicions de més cura, és possible que s'introdueixin artefactes durant els processos de fixació, particularment a nivell de la superfície de la mostra. Això comporta conseqüències com que es modifica la morfologia de l'objecte a estudi.

Les mostres biològiques que tenen una alta proporció d'humitat (per exemple el cartílag que pot tenir fins un 80 % d'aigua) han de ser sotmeses a un procés de deshidratació programada amb alcohols i en equips electrònics per tractar de no modificar la seva estructura.^{49, 78, 116, 127}

Un cop passat per tots aquests processos, la exposició prolongada a un raig d'electrons que incideix directament sobre la mostra (especialment si és d'alt voltatge) i la ubicació de la mostra en una càmera de buit, també són fonts potencials d'artefactes. El cartílag articular és un teixit molt delicat per ser examinat amb MER. És molt fàcil alterar la mostra amb la qual cosa en un estudi de superfície podria persistir el dubte si algunes modificacions han estat produïdes per les condicions experimentals o per la càmera de buit del microscopi.^{25, 72, 98}

2.-EL MICROSCOPI ELECTRONIC DE RASTREIG AMBIENTAL (MERA)

Aquest equip representa l'adaptació de millories tecnològiques a l'equip de MER.

⁹⁷ Mentre que el MERA requereix d'una càmera d'alt buit per prevenir les interferències atmosfèriques amb els electrons primaris o secundaris generats en l'equip, el MERA utilitza un detector d'electrons secundaris capaç de treballar en ambients de baix buit (per exemple en atmosferes saturades de vapor d'aigua de fins a 10 Torr). El generador de raig d'electrons presenta un dispositiu tèrmic que li permet treballar en camps d'emissions de major temperatura al convencional, generant un feix d'electrons , estable i finament col·limat. El generador del raig produeix imatges més brillants que els seus homòlegs de Tungstè o de Hexaborida de Lantà, motiu pel qual el voltatge d'acceleració dels electrons pot ser disminuït significativament, resultant un efecte menys perjudicial sobre les mostres que el produït pel MER. Els beneficis combinats del detector d'electrons secundaris i el baix voltatge d'acceleració, permeten obtenir imatges d'espècimens no conductius com el cartílag, sense necessitat que sigui recobert d'or o d'una aleació d'or-paladi, disminuint així el risc d'artefactes. ¹¹⁸