

2. OBJETIVOS

El potencial condrogénico de las células de la capa profunda del periostio y la posibilidad de reparación de defectos condrales articulares mediante injertos libres de periostio son hechos ya demostrados. Sin embargo, no existen trabajos en la literatura acerca del comportamiento mecánico a corto plazo de este tejido de reparación. Los objetivos de este estudio son:

1. Analizar las propiedades viscoelásticas del tejido de reparación obtenido a partir de injertos libres de periostio invertido sobre defectos osteocondrales de espesor completo.
2. Determinar si la similitud de las características histológicas del tejido de reparación a partir de los mencionados injertos con el cartílago sano se corresponde con una semejanza en el comportamiento biomecánico.

3. Determinar la influencia de la movilización continua pasiva sobre la naturaleza y propiedades mecánicas del tejido de reparación.
4. Evaluar la durabilidad del tejido de reparación a largo plazo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se han empleado conejos albinos adolescentes machos de la raza New Zealand, de tres meses de edad y con un peso comprendido entre los 2.3 y 2.9 Kg.

Los animales fueron examinados en el momento de su recepción registrándose el peso inicial, estado general y arco de movilidad de ambas extremidades traseras, descartándose procesos infecciosos, rigideces articulares, posibles fracturas y luxaciones rotulianas.

Durante el periodo de estabulación permanecieron en jaulas metálicas standard de dimensiones 60cm x 60 cm x 50cm en grupos de dos separados por una lámina metálica donde recibieron alimento y bebida ad libitum. La temperatura ambiental se mantuvo constante entre 22º y 24º, con una humedad relativa del 40 - 50%. Tras la intervención se procedió a revisión diaria de la herida quirúrgica y control semanal del peso, que también fue registrado en el momento del sacrificio. Todos los animales experimentaron un incremento de peso cuyo valor medio fue de 1529 gramos.

3.1.2 DISPOSITIVO DE MOVILIZACIÓN CONTINUA PASIVA

El aparato de MCP es una modificación del diseño de Salter³¹² realizada por Cebamanos (Figura 14).



Figura 14: Dispositivo de movilización continua pasiva

Consta de tres movilizadores que pueden hacerse funcionar de forma simultánea o independiente. Cada movilizador se compone de un motor-reductor Kelvin® que desarrolla un ciclo por minuto. Este transmite el movimiento circular a una barra vertical transformándolo en un movimiento ascendente-descendente. A esta barra está solidarizado un soporte tubular para introducir el pie del conejo. Mediante una biela es posible modificar el arco de movimiento impreso a las rodillas del animal, habiéndose prefijado para esta experiencia unos límites de entre 40° y 110°, al igual que en los trabajos de Salter. Los conejos, en número de tres, permanecen suspendidos del techo de la estructura mediante soportes de tela, pudiendo alcanzar fácilmente su comida y bebida. La pata derecha de cada animal es introducida en el soporte tubular fijándose a éste mediante esparadrapo. La pata izquierda se deja suspendida sin ninguna inmovilización (Figura 15).



Figura 15: Especimen situado en el dispositivo de MCP

3.1.3 DISPOSITIVO DE INDENTACIÓN

El aparato para el estudio mecánico del cartílago, diseñado por Bader y Kempson¹⁵ es un sistema de compresión monoaxial abierto. Consta de una barra horizontal que pivota sobre un eje central a modo de balanza con un indentador semiesférico de metacrilato de 3 milímetros de diámetro dispuesto para deslizarse verticalmente en una cámara de aire de baja fricción bajo la cual se ha colocado la cubeta con el espécimen. El indentador está conectado a un transductor lineal (Schaevitz L.V.D.T. modelo 100 MS-LT) que es capaz de medir el desplazamiento vertical del indentador y por tanto la compresión del cartílago. La barra horizontal incorpora dos masas laterales m_1 y m_2 , una en cada extremo de la misma, para aumentar el momento de inercia de la masa y asegurar el balanceo del sistema mecánico. La posición de las masas laterales m_1 y m_2 está regulada de manera que el indentador está balanceado con una masa cero (Figuras 16 y 17).

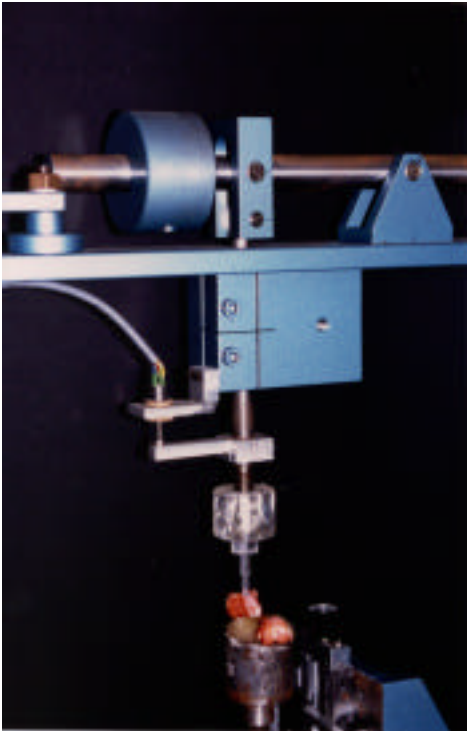


Figura 16: Aparato de indentación.

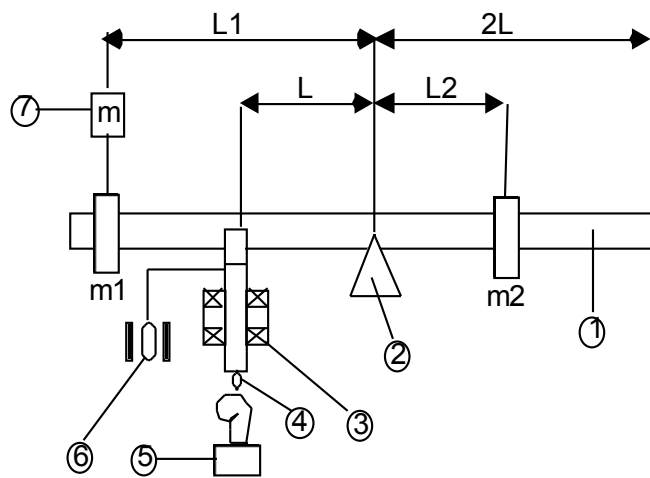


Figura 17: Representación esquemática. 1: Barra horizontal balanceada; 2: Pivot central; 3: Cámara de aire de baja fricción; 4: Indentador semiesférico de 3 mm; 5: Cubeta y espécimen; 6: Transductor lineal; 7: Masa m .

3.2 MÉTODO

3.2.1 TÉCNICA QUIRÚRGICA

Anestesia

Siguiendo las indicaciones dictadas por el Consejo Canadiense de Cuidados en animales (Guía de uso y cuidados en animales de experimentación), la anestesia se realizó mediante inyección intramuscular de una mezcla de Ketamina (Ketolar[®]) (80 mg/Kg) y Xylacine (Rom-pum[®]) (3 mg/Kg).

Acto quirúrgico

Una vez rasurada y preparada con alcohol yodado, la rodilla derecha de cada animal fue abordada mediante una incisión pararrotuliana interna desde polo rotuliano proximal hasta tuberosidad tibial anterior (Figura 18). La rótula fue luxada externamente accediéndose al surco patelar femoral, en cuyo centro se creó un defecto osteocondral de 4 milímetros de diámetro y 4 milímetros de profundidad mediante la utilización de una trefina hueca dentada acoplada a un motor Stryker[®] (Figura 19). El defecto fue realizado en una zona de deslizamiento patelar que no sufre la compresión directa y mantenida del cartílago rotuliano en la posición de reposo de la rodilla. A continuación se procedió a eliminar con bisturí el cartílago y hueso cortical del cilindro osteocondral obtenido. El cilindro óseo resultante fue colocado de nuevo en el defecto invirtiéndolo, con objeto de evitar la presencia de restos cartilaginosos en la superficie del defecto. Seguidamente, a través del mismo abordaje, se procedió a la obtención de una lámina circular de periostio de la cara interna de la metáfisis proximal de la tibia mediante cuidadosa disección con periostotomo para asegurar la integridad de su capa profunda en el injerto. Esta lámina era de un diámetro superior al del defecto osteocondral en un 20% con el fin de que el injerto no quedase hundido en la profundidad del defecto. Una vez resecado el periostio se implantó sobre el defecto con su capa profunda dirigida hacia la superficie articular de modo que el in-

jerto quedase a nivel del cartílago circundante, sin sobresalir por encima de él, para evitar su desprendimiento, ni quedar enterrado en el fondo del defecto. (Figura 20) Una vez colocado el injerto libre de periostio invertido se redujo la rótula, moviéndose pasivamente la rodilla a lo largo de todo su arco de flexoextensión para comprobar la permanencia del injerto sobre el defecto. Tras lavar la articulación con suero fisiológico se procedió al cierre en dos planos de la artrotomía y de la piel mediante sutura continua de Vicryl 5/0. Una vez limpia la piel con povidona yodada se colocó un vendaje compresivo. Tras finalizar la intervención se anotaron las incidencias quirúrgicas en la hoja de recogida de datos y cada animal fue depositado en su jaula.



Figura 18: Abordaje quirúrgico.



Figura 19: Defecto creado en surco patelar.



Figura 20: Relleno del defecto con el injerto de periostio invertido.

Postoperatorio

El vendaje compresivo fue retirado 24 horas después de la intervención. Los animales pertenecientes al grupo de movilidad activa intermitente se mantuvieron en su jaula hasta el momento del sacrificio. Los pertenecientes al grupo de movilidad continua pasiva fueron colocados en el dispositivo de MCP siguiendo un régimen de ocho horas diarias durante dos semanas. A partir de este momento fueron depositados en las jaulas hasta el sacrificio.

Sacrificio

Se realizó a las 36 semanas en el grupo preliminar y a las ocho semanas en el grupo definitivo, mediante inyección intracardíaca de una sobredosis de Ketamina.

De cada uno de los conejos se obtuvieron mediante sección con sierra mecánica dos especímenes, experimental y control, constituidos por los dos tercios distales del fémur derecho intervenido y del izquierdo no operado respectivamente.

Almacenamiento

Cada espécimen fue depositado en un recipiente estéril y almacenado en un congelador a -20° centígrados, temperatura a la cual las propiedades físicas no se afectan¹⁵. Una vez recolectadas todas las muestras fueron enviadas en un contenedor de polispán con nieve carbónica para su estudio mecánico.

3.2.2 DISEÑO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

En un estudio preliminar para evaluar la factibilidad del estudio mecánico, fueron intervenidos siete conejos, que fueron sacrificados, debido a un retraso por problemas técnicos, a las treinta y seis semanas. En el grupo de estudio definitivo, un total de cincuenta conejos fueron intervenidos. Se creó un defecto osteocondral cilíndrico en el surco patelar femoral, en una zona donde la rótula no estuviese en contacto con el fémur en situación de reposo. Este defecto fue rellenado con el fragmento esponjoso del cilindro osteocondral y recubierto por un injerto libre de periostio invertido colocado directamente sobre el lecho cruento sin adhesivo ni sutura. El sacrificio de los animales se realizó a las ocho semanas.

El total de la muestra fue dividida aleatoriamente en dos grupos atendiendo al tipo de movilización postoperatoria. En cada uno de ellos se intervino la rodilla derecha, utilizándose la izquierda, no operada, como control.

Grupo MCP

Al día siguiente de la intervención quirúrgica fueron sometidos a movilización continua pasiva ocho horas diarias durante dos semanas. Tras este periodo fueron mantenidos dentro de sus jaulas en régimen de movilidad activa intermitente hasta el momento del sacrificio.

Grupo MAI

Desde la intervención hasta el sacrificio se mantuvieron estabulados permitiéndose movilidad libre dentro de la jaula (movilidad activa intermitente).

Siete de los conejos fueron desechados para el estudio. Dos por muerte, a los dos días y a las siete semanas del postoperatorio respectivamente, uno por parálisis ciática del miembro intervenido y fractura del fémur contralateral, dos por rigidez articular completa, uno por artritis séptica y uno por malposición del defecto en el surco rotuliano. Cuarenta y tres conejos (86 patas) fueron considerados aptos para el estudio definitivo, de los cuales 22 correspondían al grupo de MAI y 21 al de MCP. Dentro del grupo preliminar, empleado finalmente para evaluar los resultados a largo plazo (36 semanas), los siete conejos fueron considerados aptos, perteneciendo cuatro al grupo MAI y tres al grupo MCP.

3.2.3 MÉTODO DE ESTUDIO MECÁNICO

Una vez en el laboratorio de biomecánica, las piezas fueron descongeladas a temperatura ambiente y humidificadas mediante suero fisiológico. Cada espécimen se colocó en una cubeta soporte a la que se fijó mediante cemento acrílico CMV[®] (polimetilmetacrilato) (Figura 21). Dicha cubeta fue depositada a su vez sobre la plataforma base del aparato de indentación para el examen mecánico.



Figura 21: Especímenes colocados sobre la cubeta del aparato de indentación.

Método de indentación

Cada uno de los fémures fue colocado en la cubeta en posición vertical, con la superficie articular hacia arriba. La cubeta presentaba una proyección esférica en su base que fue colocada en el orificio de la plataforma universal del aparato. El montaje fue ajustado verticalmente hasta que el indentador hiciese contacto con la superficie articular. Se colocó una masa m sobre el extremo de la barra más próximo al indentador permitiendo que la barra pivotase entrando el indentador en contacto con la superficie del cartílago perpendicularmente a ésta. En este punto se bloqueó la barra y se liberó repentinamente de modo que el peso de la masa m se aplicaba rápida y perpendicularmente sobre la superficie del cartílago a través del indentador, dando lugar a una respuesta oscilatoria transitoria inicial característica de un material viscoelástico, seguida de un período no oscilatorio de compresión o creep que aumentaba con el tiempo hacia un valor de equilibrio. Ambas respuestas eran transferidas mediante un conversor analógico - digital a un ordenador y registradas mediante programa específico (DATS signal processing software, Prosig Ltd., Fareham, Hampshire) en unas gráficas amplitud de oscilación/tiempo. Durante este proceso, las muestras fueron bañadas con solución de Ringer a temperatura ambiente.

Para este experimento se emplearon los siguientes parámetros:

$$\begin{array}{lll} m_1 = 0.9 \text{ Kg} & m_2 = 1.25 \text{ Kg} & L_2 = 103.0 \text{ mm} \\ m = 167.5 \text{ g} & L_1 = 193.8 \text{ mm} & \end{array}$$

Determinación de la rigidez elástica

El valor de la rigidez elástica de cada espécimen, k , viene dado por la expresión matemática¹⁵:

$$= 4 \pi^2 / 2L^2$$

Donde I es el momento de inercia de la balanza, T es el período de oscilación y L es la distancia entre el pivot de la balanza y la vertical al indentador.

A partir de las masas empleadas (m , m_1 y m_2) y de la disposición de éstas y del indentador en la barra (L_1 , L) se obtiene un momento de inercia $I = 0.06 \text{ N m s}^{-1}$. Conociendo los valores de I y de L , podemos obtener, a partir del periodo de oscilación resultante en cada espécimen, el valor de T .

El coeficiente de rigidez elástica fue obtenido en cada uno de los especímenes sobre el área del defecto en fémures intervenidos y sobre el área correspondiente topográficamente en fémures control.

Un total de 5 medidas fueron realizadas en cada uno de los puntos descritos para cada espécimen.

3.2.4 MÉTODO HISTOLÓGICO

Una vez realizado el estudio mecánico, cada espécimen fue sometido al siguiente proceso:

1. Fijación en formol tamponal al 37% durante un mínimo de 48 horas.
2. Decalcificación en ácido nítrico al 5% durante aproximadamente 72 horas hasta obtener una consistencia blanda.
3. Sección del espécimen en la porción central del surco patelar siguiendo el plano sagital, obteniéndose así dos mitades, a y b.
4. Deshidratación en concentraciones crecientes de alcohol.
5. Aclarado con Xilol.
6. Inclusión en bloques de parafina.
7. Cada bloque de parafina fue cortado con un microtomo de rotación Reichert-Jung modelo 2040 en secciones de 3 micras. Se obtuvieron siete secciones de la faceta interna de la mitad a de cada espécimen (porción central del defecto en los operados y del surco patelar en los controles) y otras siete de la faceta externa de la mitad b (porción lateral del defecto en los operados y del surco patelar en los controles).
8. Estas secciones se tiñeron con Hematoxilina - Eosina (una de cada mitad del espécimen), Tricrómico de Masson (una de cada mitad) y Azul alcían (cinco de cada mitad), destinándose al estudio histológico e histomorfométrico.

Tinción de hematoxilina - eosina de Harris

El método de preparación de esta tinción requiere los siguientes pasos:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Lavado con agua corriente durante 10 minutos.
3. Tinción con Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
4. Lavado con agua corriente durante 2 minutos.
5. Diferenciación mediante dos inmersiones rápidas en alcohol ácido de 80° al 1%.
6. Lavado con agua corriente durante 5 minutos.
7. Virado en agua amoniacal al 0.4% dos veces.
8. Lavado con agua corriente durante 10 minutos.
9. Contraste con Eosina - Flosina durante 30 segundos.
10. Deshidratación, aclarado y montaje en DPX o DEPEX.

La elaboración de la solución de Hematoxilina de Harris requiere los siguientes pasos:

1. Preparación de soluciones:

Solución A

- Hematoxilina 5 grs
- Etanol absoluto 50 ml

Solución B

- Sulfato aluminico potásico 100 grs
- Agua destilada 100 ml

Otros reactivos

- Oxido amarillo de mercurio 2.5 grs
- Acido acético 20 ml

2. Mezcla de soluciones:

Se retira la solución B de la placa calefactora y se agrega la solución A, colocando la mezcla en un agitador frío. Una vez agitada, la mezcla resultante se lleva a ebullición rápida agitando de forma intermitente.

Cuando el líquido comienza a hervir, se coloca en el agitador frío, añadiendo lentamente óxido amarillo de mercurio y agitando durante 3 minutos.

La solución se enfría rápidamente introduciendo el recipiente cerrado herméticamente en agua fría que es renovada continuamente.

Una vez frío el preparado, se añaden 20 ml de ácido acético, quedando la hematoxilina lista para su uso.

Antes de cada tinción se debe filtrar la solución para evitar precipitados.

Tinción de tricrómico de Masson

La preparación de esta solución requiere los siguientes pasos:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Mantener durante una hora en baño maría a 54° en líquido de Carmín.
3. Lavado con agua corriente durante 5 minutos.
4. Tinción con Hematoxilina de Weigert durante 20 minutos.
5. Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
6. Inmersión dos veces en alcohol ácido.
7. Lavado con agua corriente durante 5 minutos.
8. Inmersión en Ponceau - Fucsina durante 2 minutos.
9. Acido acético al 0.5%, dos cambios de pocos segundos.
10. Mordiente (ácido fosfotúngstico) durante 12 minutos.
11. Verde luz durante 5 minutos.
12. Acido acético al 0.5%, dos cambios de pocos segundos.
13. Deshidratar, aclarar y montar en DPX.

La elaboración de la tinción de tricrómico de Masson requiere las siguientes soluciones:

Hematoxilina de Weigert

Solución A

- Alcohol de 96°100 ml
- Hematoxilina10 grs

Solución B

- Agua destilada990 ml
- Acido clorhídrico10 ml
- Cloruro férrico12 grs

SOLUCION DE TRABAJO

- Solución A 80 ml
- Solución B 40 ml

Ponceau de Xilidina al 1%

- Ponceau de Xilidina10 grs
- Acido acético glacial 10 ml
- Agua destilada990 ml

Fucsina ácida al 1%

- Fucsina ácida10 grs
- Acido acético glacial10 ml
- Agua destilada990 ml

SOLUCION DE TRABAJO

- Solución Ponceau de Xilidina80 ml
- Solución Fucsina ácida40 ml

Verde luz

- Verde luz o azul de amilina20 grs
- Acido acético glacial10 ml
- Agua destilada990 ml

Acido fosfotúngstico

- Acido fosfotúngstico50 grs
- Agua destilada1000 ml

Con esta tinción se obtiene:

| | |
|---------------------|-----------------------------|
| Núcleos: Azul | Citoplasma: Rosa o rojo |
| Hematíes: Rojo vivo | Osteoide: Rojo |
| Hueso: Rojo o verde | Matriz cartilaginosa: Verde |
| Colágeno: Verde | Fibras elásticas: Rosa |

3.2.5 MÉTODO HISTOQUÍMICO

Tinción de azul alcian

Esta tinción es un método histoquímico para los mucopolisacáridos ácidos del cartílago. Las mucinas son polisacáridos que contienen hexosamina y que están unidos de forma covalente a variable cantidad de proteína. Los grupos hexosa libres están unidos a algunas moléculas ácidas que le confieren la reactividad histoquímica. Las mucinas del cartílago son mucopolisacáridos que contienen ácido glucurónico fuertemente sulfatado (condroitín sulfato de tipos A y C). Son lábiles frente a la enzima hialuronidasa y poseen un fuerte carácter ácido. Reaccionan con el Azul Alcian a pH 0'5. Los colorantes Alcian forman parte del grupo de las cuproftalocianinas, sustancias hidrosolubles de color azul que poseen cobre en su composición molecular. Tienen una gran afinidad por los mucopolisacáridos ácidos, uniéndose a los grupos carboxilo a pH 2'5 y los grupos sulfato a pH 0'5 y 1 (característica para diferenciar las mucin-

nas). Esta unión transforma el colorante en un pigmento insoluble, el azul Monastral, de color azul turquesa brillante.

Su preparación se realiza en los siguientes pasos:

- 1- Desparafinar y llevar hasta agua.
- 2- Solución tampón de ácido acético al 3%, 2-3 min.
- 3- Solución de Azul alcían , 20-30 min.
- 4- Solución tampón de ácido acético al 3%, lavar.
- 5- Lavar con agua destilada abundantemente.
- 6- Deshidratar pasando por los alcoholes, sustitutivo de xilol y montar.

Reactivos:

a- Azul Alcían a pH 0'5

b- Acido acético al 3%

Resultados:

Los mucopolisacáridos ácidos sulfatados se tiñen de color azul-turquesa

3.2.6 MÉTODO HISTOMORFOMÉTRICO

Concepto

La histomorfometría es el análisis histológico cuantitativo de los diferentes elementos que constituyen un tejido.

Las mediciones de las estructuras de un tejido pueden realizarse de forma manual, semiautomática y automática. Los procedimientos manuales y semiautomáticos requieren la identificación visual y el seguimiento manual de las diferentes estructuras por el observador. Con el fin de evitar la subjetividad y los errores causados por la fatiga del observador se diseñaron los métodos automáticos basados en técnicas de análisis de la imagen. Estos métodos automáticos son poco aplicables por la tendencia de las preparaciones a presentar pequeñas líneas de rotura que falsearían los contajes, motivo por el cual se eligió un método semiautomático para este trabajo.

Histomorfometría semiautomática

Requiere de los siguientes elementos:

- Microscopio óptico.
- Cámara lúcida o dispositivo para dibujo.

- Cursor, en el que el punto activo está indicado por un diodo luminoso.
- Tablero digitalizador.
- Ordenador con programa de histomorfometría e impresora de datos.

Para la realización del estudio se empleó una cámara lúcida con zoom, un microscopio Reichert Polyvar y un morfómetro Zeiss modelo Videoplan (Figura 22).



Figura 22: Histomorfómetro

Funcionamiento del sistema

La cámara lúcida o dispositivo para dibujo consiste en una serie de espejos o prismas intercalados entre los objetivos y el cabezal del microscopio que permite proyectar como un punto luminoso dentro del campo de visión del microscopio la imagen del cursor que se desplaza sobre el tablero digitalizador. Moviendo el cursor, el observador puede visualizar éste en el campo del microscopio y delimitar con él las distintas estructuras histológicas en estudio. Al realizar esta operación, aparece en la pantalla del ordenador una imagen o dibujo de estas estructuras.

El tablero digitalizador está constituido por una malla o cuadrícula electrónica dividida en cuadrados de 0.1 milímetros de diámetro. A cada punto de intersección de esta malla le corresponde en la memoria del ordenador una coordenada en el eje de abscisas (x) y otra en el de ordenadas (y). Al desplazar el cursor sobre el tablero la malla informa al ordenador sobre los puntos por donde pasa, transformándose de esta forma la imagen o información analógica en información digital. Mediante un programa específico el ordenador procesa los datos obtenidos y proporciona las áreas, perímetros y longitudes de la imagen analizada.

Sistemática de trabajo

Para realizar las mediciones de las estructuras histológicas en estudio se deben seguir los siguientes pasos:

1. Definición de los parámetros a medir:

Es necesario definir en el programa de histomorfometría las magnitudes que van a ser medidas (Área de cartílago normal, área de tejido regenerado, grosor de cartílago normal, grosor de

cartílago regenerado, área de hueso bajo el cartílago normal y área de hueso bajo el tejido regenerado).

2. Calibración del aparato:

Mediante la calibración se informa al ordenador de la escala de trabajo empleada (relación entre la distancia en el campo microscópico y el desplazamiento del cursor sobre el tablero digitalizador)

Se realiza mediante un portaobjetos que incorpora una escala milimetrada sobre la cual se marca la distancia entre dos puntos correspondiente a 1 milímetro.

El aumento utilizado para realizar las mediciones es de 40 x.

3. Colocación de la preparación del corte en estudio en el microscopio y medida de los parámetros previamente definidos:

Estos parámetros quedan almacenados en archivos definidos en la memoria del ordenador y pueden ser imprimidos o exportados a programas de cálculo para realizar determinaciones estadísticas.

3.2.7 VALORACIÓN MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA E HISTOMORFOMÉTRICA DEL TEJIDO NEOFORMADO Y DEL CARTÍLAGO CONTROL

Fue diseñada una base de datos para el registro de las observaciones macro, microscópicas e histomorfométricas de cada espécimen. En ella se anotaron las fechas de intervención y sacrificio, peso inicial y final de cada conejo, tiempo quirúrgico, incidencias técnicas y complicaciones postoperatorias.

Para la evaluación de los aspectos macro y microscópicos del tejido neoformado se empleó una modificación de la escala propuesta por O'Driscoll en 1986²⁶².

Valoración macroscópica

En este campo se calificó el aspecto macroscópico de cada espécimen tras el sacrificio, valorándose las características del tejido regenerado, cartílago circundante, presencia de adherencias, derrame y estado de la sinovial.

Se asignaron 2 puntos (bien) a aquellos especímenes en los que el tejido regenerado era de coloración blanco perlada, la coloración del cartílago circundante y de la sinovial era normal y no presentaban adherencias ni derrame; 1 punto (regular) cuando se reunían tres de estas cinco cualidades y 0 puntos (mal) cuando reunían dos o menos (figura 23).

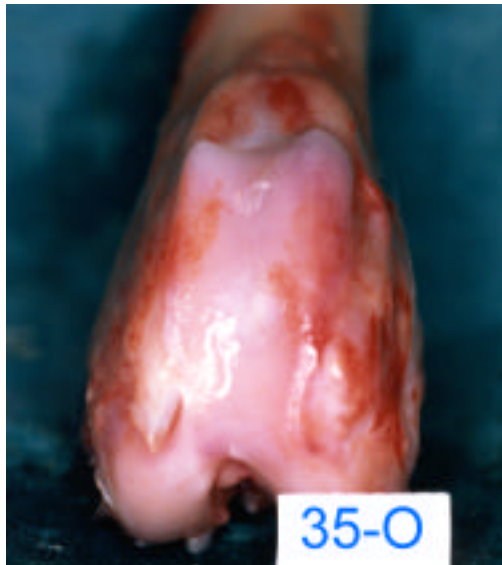


Figura 23: Aspecto macroscópico

Movilidad

Fue considerada como buena (2 puntos) cuando el arco de movilidad de la rodilla era comparable al de un conejo sano no operado, regular (1 punto) cuando presentaba una limitación moderada del mismo (pérdida de la movilidad hasta un 25%) y mala (0 puntos) cuando existía una rigidez.

Valoración microscópica - histología descriptiva

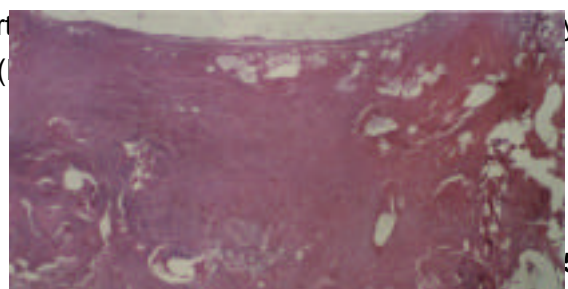
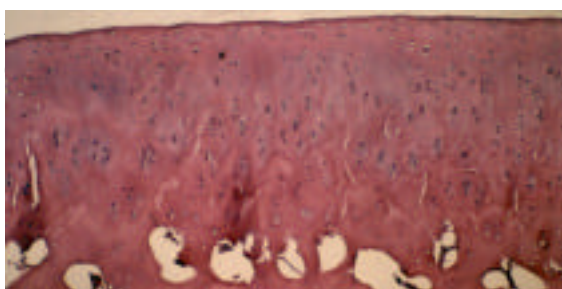
En la valoración histológica de los especímenes se contemplaron los siguientes aspectos:

- a. Tipo de tejido predominante
- b. Características estructurales del tejido regenerado
- c. Celularidad del cartílago circundante

- a. Tipo de tejido predominante (máximo 4 puntos, mínimo 0 puntos)

Se consideró como tal el que aparecía en una proporción mayor del 50% del tejido neoformado.

Se asignaron 4 puntos cuando el tejido neoformado era predominantemente de características hialinas (morfología y disposición celular semejante a las del cartílago hialino) (Figura 24 y 27),



o cartílago hialino y hueso (Figura 25 y 26)

Figura 24 : Tejido con características hialinas (Azul alcian 100x)

Figura 25: Fibrocartilago. (Azul alcian 40x)

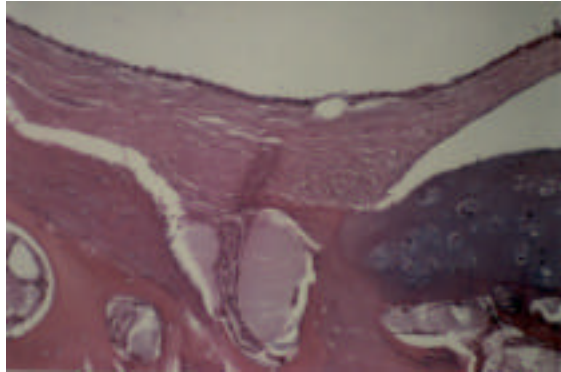


Figura 26: Tejido fibroso. (Azul alcian 100x)

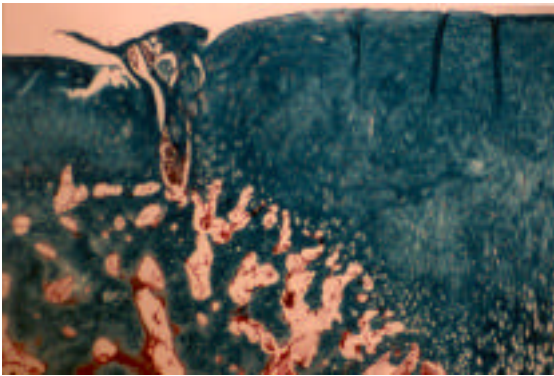


Figura 27: Tejido con características hialinas (T.M. 40x)

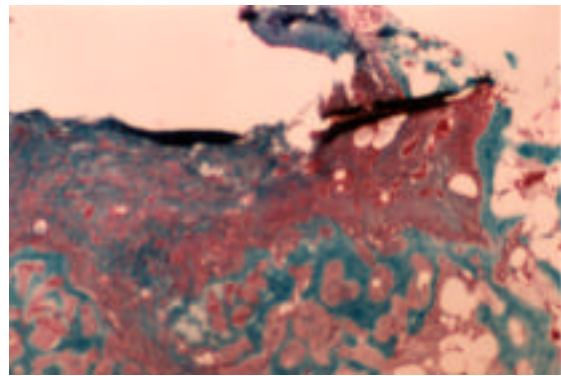


Figura 28: Tejido fibroso. (T.M.40x)

b. Características estructurales del tejido neoformado (máximo 10 puntos, mínimo 0 puntos)

Se evaluaron cualitativamente cinco aspectos:

1. Regularidad de la superficie: Se asignaron 2 puntos cuando la superficie era lisa e intacta (Figura 29), 1 punto cuando existía laminación superficial (Figura 30), y 0 puntos en caso de disrupción completa o fibrilación del tejido (Figura 31).

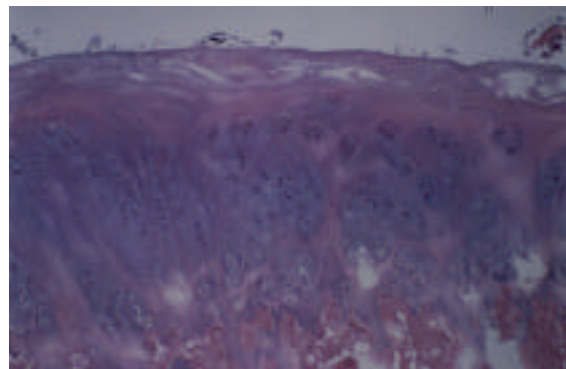
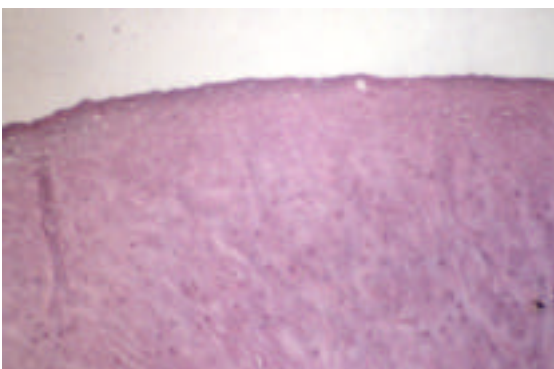


Figura 29: Superficie lisa e intacta (Azul alcian 100x)

Figura 30: Laminación superficial (Azul alcian 100x)

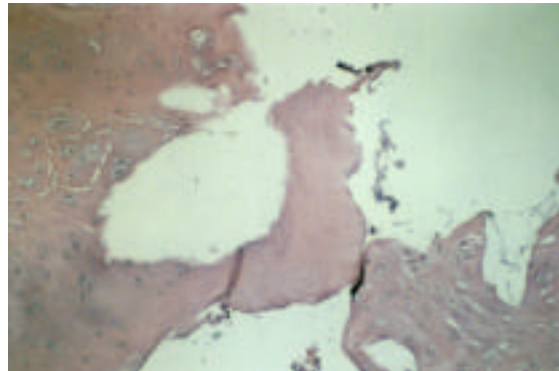


Figura 31: Disrupción completa (Azul alcian 100x)

2. Nivel del tejido neoformado con respecto al cartílago circundante: Se consideró nivelado (2 puntos) (Figura 32), sobreelevado (1 punto) (Figura 33) o deprimido (0 puntos) (Figura 34).

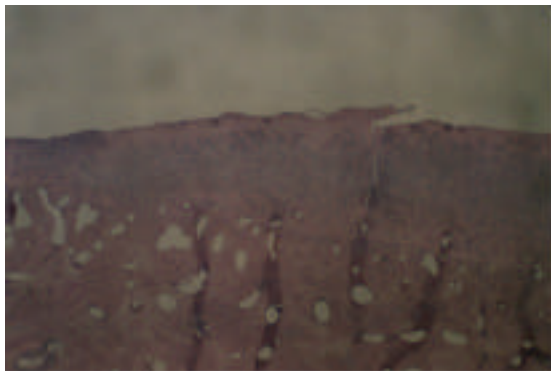


Figura 32: Tejido nivelado (Hematoxilina-eosina 40x)

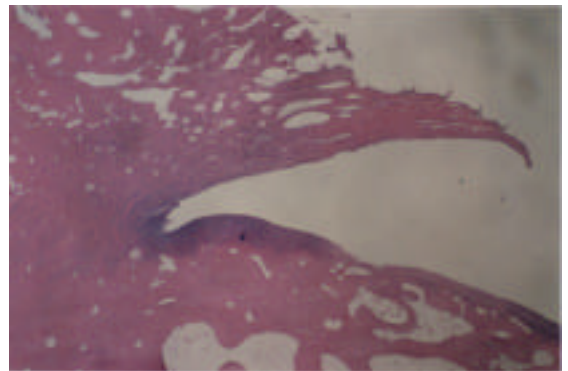


Figura 33: Tejido sobreelevado (Azul alcian 40x)

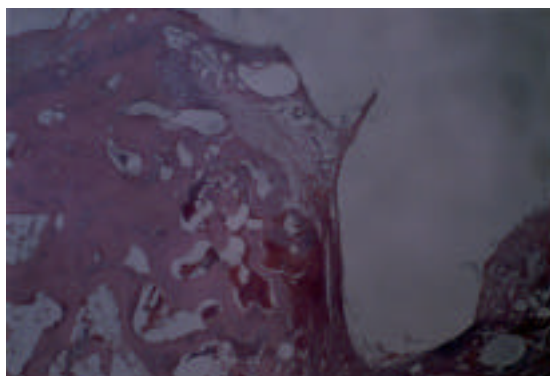


Figura 34: Tejido deprimido (Azul alcian 40x)

3. Tipo de lesión: Se clasificó como completa (0 puntos) (Figura 35), parcial (1

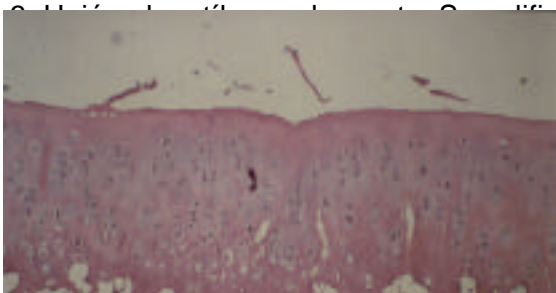


Figura 35: Unión completa (Hematoxilina-eosina 100x) Figura 36: Unión parcial (Azul alcian 100x)

4. Integridad estructural: Fue considerada como normal (2 puntos) (Figura 37), ligera disrupción (1 punto) (Figura 38) o disrupción severa (0 puntos) (Figura 39)

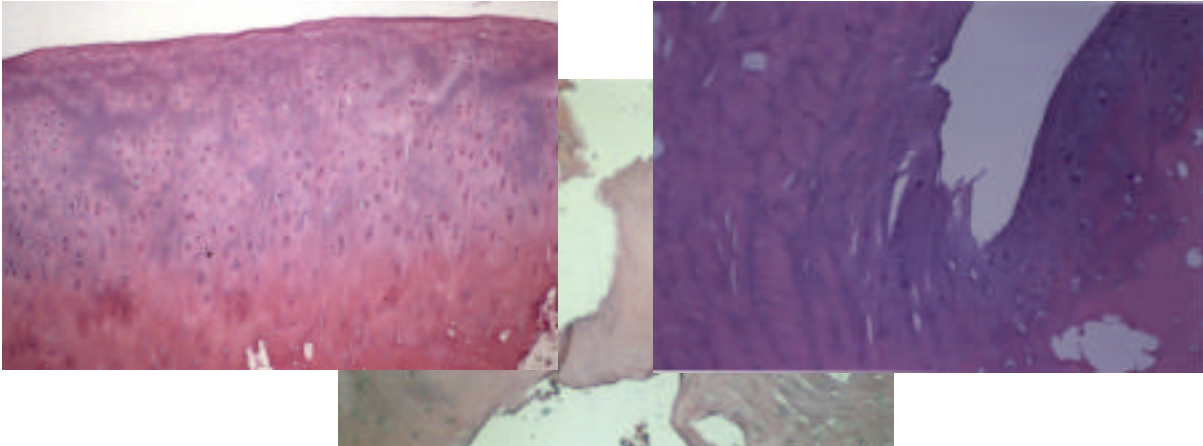


Figura 37: Integridad normal (Azul alcian 100x)

Figura 38: Ligera disrupción (Azul alcian 100x)

Figura 39: Disrupción severa (Hematoxilina-eosina 100x)

5. Presencia de proteoglicanos: Se evaluó cualitativamente la intensidad del color azul del tejido neoformado en la tinción de azul alcian, considerándose como +++ (2 puntos) (Figura 40) cuando ésta era semejante a la del cartílago normal, ++ (1 punto) (Figura 41) cuando era menor, y + (0 puntos) cuando estaba ausente (Figura 42).

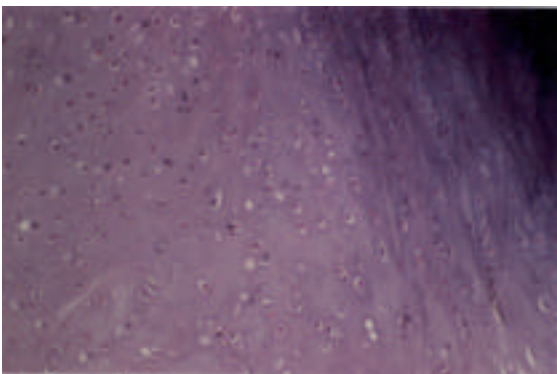


Figura 40: Proteoglicanos +++ (Azul alcian 100x)

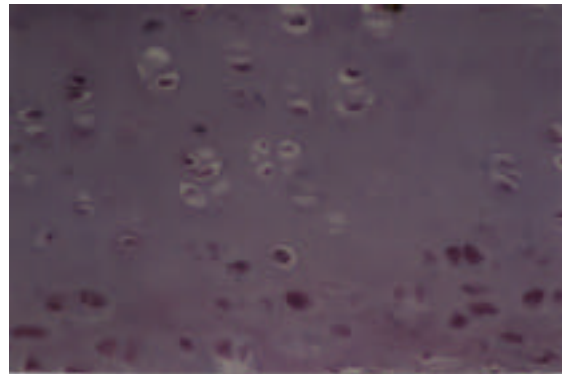


Figura 41: Proteoglicanos ++ (Azul alcian 200x)

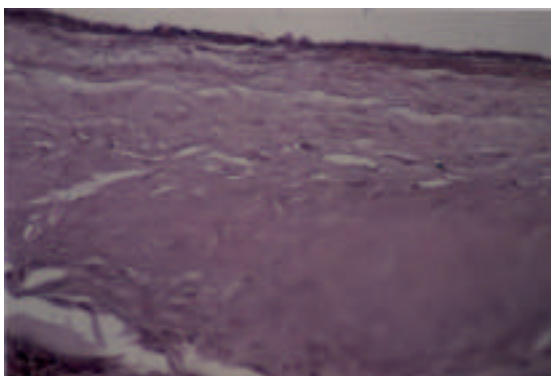


Figura 42: Proteoglicanos + (Azul alcian 100x)

c. Celularidad del cartílago circundante

Fue considerada como normal (2 puntos) (Figura 43), hipocelularidad moderada (1 punto) cuando ésta era menor del 50% (Figura 44), y severa hipocelularidad (0 puntos) cuando era mayor del 50% (Figura 45).

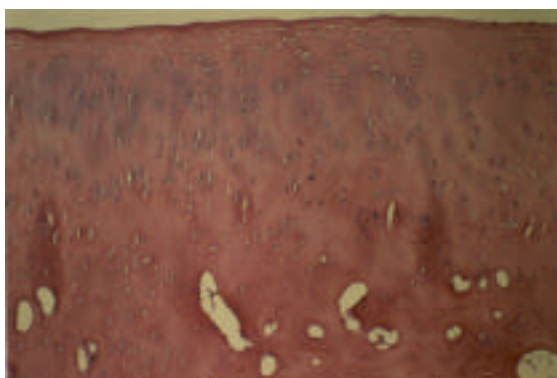


Figura 43: Celularidad normal (Azul alcian 100x)

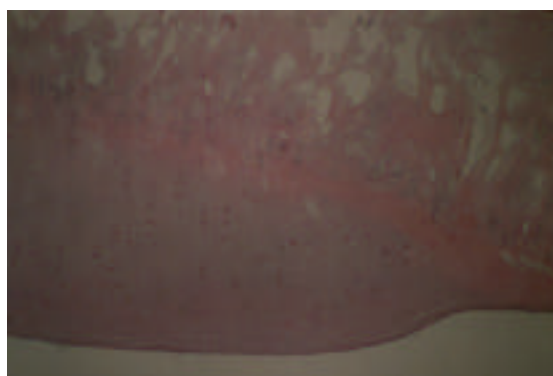


Figura 44: Hipocelularidad moderada (Azul alcian 100x)

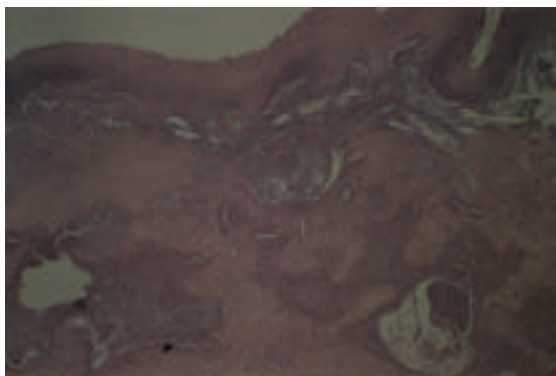


Figura 45: Severa hipocelularidad (Azul alcian 100x)

El total de la puntuación otorgada al estudio histológico microscópico fue de un máximo de 16 puntos y de un mínimo de 0 puntos.

Valoración histomorfométrica

Los parámetros definidos para el estudio fueron los siguientes:

1. Area de tejido regenerado en el defecto osteocondral. Medida exclusivamente en los fémures intervenidos.
2. Grosor del tejido regenerado. Medido exclusivamente en los fémures intervenidos.
3. Area de hueso regenerado. Correspondiente al área de hueso trabecular situado debajo del tejido neoformado en el defecto osteocondral. Medido únicamente en los especímenes intervenidos.
4. Area de cartílago normal. Medido tanto en los especímenes intervenidos como en los fémures control. En los fémures experimentales, la medición del área de cartílago normal se realizó en el cartílago adyacente al defecto osteocondral.
5. Grosor del cartílago normal. Medido tanto en los especímenes intervenidos como en los fémures control. En los fémures experimentales, esta medición se realizó en el cartílago adyacente al defecto osteocondral.
6. Area de hueso normal. Correspondiente al área de hueso trabecular situado debajo del tejido neoformado en el defecto osteocondral en los especímenes operados y a la obtenida en el mismo punto de los fémures control.

Los resultados de los grosores y de las áreas se expresaron en valores absolutos en mm y mm² respectivamente.

3.2.8 MÉTODO ESTADÍSTICO

Para la comparación de medias entre dos variables continuas se ha utilizado un test t de Student. Previamente se comparó la igualdad de varianzas de ambas muestras mediante un test F. Si se apreciaban diferencias significativas, se estimaba cada varianza por separado y se utilizaba la corrección de Welch para los grados de libertad.

Para comparar tres o más variables (rigidez elástica según tipo de tejido regenerado) se ha empleado un análisis de la varianza clásico.

Cuando las variables eran discretas (tipo de tejido-movilidad), se comparó la independencia de los factores mediante un test chi-cuadrado.

Para el análisis exploratorio de los datos se empleó el programa Data Desk, para el resto de los análisis y gráficos se empleó el programa S-Plus.