

Injertos osteocondrales congelados en el conejo. Estudio experimental

Frozen osteochondral allografts rabbits. Experimental study

A. CARRANZA-BENCANO, J.R. ARMAS-PADRÓN, E. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, M.T. CAÑETE REINA.

CENTRO DE INSEMINACIÓN IN VITRO Y TRANSFERENCIA EMBRIONARIA DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

Resumen. Con el propósito de analizar un protocolo de congelación de cartílago completo estudiando y la viabilidad del cartílago tras la implantación se ha realizado un estudio experimental en 60 rodillas de 45 conejos de Nueva Zelanda de población no genéticamente pura. Se extrajeron injertos osteocondrales de 4 mm de diámetro y 2-3 mm de espesor, incluyendo cartílago articular y hueso subcondral que fueron sometidos a congelación lenta hasta -196° en Planer Kryo-10, Serie II, Controlled Rate Freezers, siguiendo un descenso de temperatura controlada bajo crioprotección con Dimetilsulfóxido, propanodiol y sacarosa. Posteriormente fueron descongelados e implantados en cóndilos femorales. Los injertos evolucionaron a tejido amorfo acelular y pasados los 2 meses, tras la incorporación del componente óseo se desarrolló tejido fibrocartilaginosa de sustitución. El presente estudio indica que el cartílago articular congelado no mantiene su viabilidad tras la implantación.

Summary. The purpose of this study was to analyze a protocol for freezing whole cartilage and to study the viability of cartilage after the implant in 60 knees of 45 New Zealand rabbits from a genetically impure population. Osteochondral implants were removed, measuring 4 mm in diameter and 2-3 mm thickness, including the articular cartilage and the subchondral bone, and slow freezing up -196° using Planer Kryo-10, Series II, Controlled Rate Freezers, following a controlled drop in temperature under cryo-protection with Dimethylsulfoxide, propanediol and saccharose. After thawing grafts were implanted in femoral condyles. The implants evolves into an acellular amorphous tissue and after 2 months, period in wich the incorporation of the osseous compound occurs, substitute fibrocartilaginous tissue develops. This study shows that frozen articular cartilage does not remain viable after implant.

Introducción. El cartílago según algunos autores (1,2) es inmunológicamente privilegiado ya que la matriz enmascara los antígenos celulares, y generalmente no induce respuesta inmune aunque los condrocitos pueden desarrollar antígenos de histocompatibilidad cuando el receptor es sensibilizado con hueso o hueso y médula ósea (3,4) y una vez que la respuesta inmune ha sido estimulada por exposición directa a antígenos celulares, el cartílago puede ser vulnerable directamente por anticuerpos citotóxicos o por linfocito o indirectamente por mediadores inflamatorios y enzimas inducidos por la respuesta inmune (5,6). El hueso, sin embargo, no es inmunológicamente privilegiado (1,7), por tanto, el injerto osteocondral ideal deberá tener cartílago viable y hueso subcondral muerto, carente de inmunidad.

En este sentido, la congelación puede ser el mejor método de aplicación clínica de reducir la inmunidad de grandes y no vascularizados aloinjertos osteocondrales (8), aunque a consta de la pérdida de viabilidad del condrocito. De esta manera la ventaja de reducción de inmunidad debe ser sopesada con la desventaja de la pérdida celular. Por ello, el éxito de los métodos de preservación del cartílago articular es un requisito esencial para el éxito con trasplantes de injertos osteoarticulares.

Las células cartilaginosas aisladas se mantiene viables metabólicamente y mantienen su fenotipo después de la preservación y congelación (9,10), pero estas células tienen peor sobre vivencia cuando el cartílago articular completo es congelado y almacenado (11-19), no existiendo aún protocolos establecidos para conservar cartílago completo

Correspondencia:

Andrés Carranza Bencano
c/Santa Clara 16- 1º-D
41002 Sevilla
E-mail: acarranz@cica.es

Tabla 1.

Material

	n° rodillas	n° animales	n° injertos
Cartílago congelado-almacenado 4 semanas-descongelado-implantado	60	45	30
Grupo a (sacrificio 5 días)	12	9	6
Grupo b (sacrificio 2 semanas)	12	9	6
Grupo c (sacrificio 4 semanas)	12	9	6
Grupo d (sacrificio 8 semanas)	12	9	6
Grupo e (sacrificio 12 semanas)	12	9	6

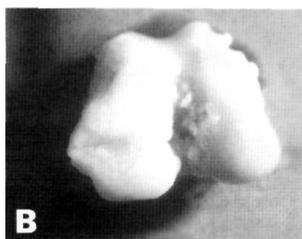
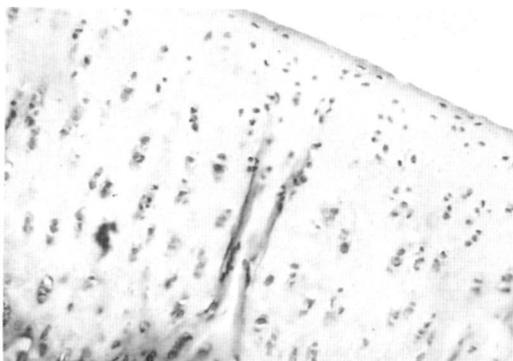


Fig. 1: Aspecto macroscópico del injerto osteocondral congelado a los 5 días (A) y a las 12 semanas de su implantación (B).

Fig. 2: Cartílago articular con picnósis nuclear y retracción citoplasmática a los 5 días de implantación (Grupo a)(H-E, 16 x).



viable durante un periodo de tiempo útil ante la necesidad de disponer de un banco de tejido con garantías de viabilidad.

El propósito de este trabajo es analizar un protocolo de congelación de cartílago completo estudiando la viabilidad del cartílago tras la implantación.

Material y métodos. Hemos utilizado 60 rodillas de 45 conejos de Nueva Zelanda (Tabla 1), de población no genéticamente pura, hecho considerado importante en relación con la alogenicidad del injerto, los animales desechados por mortandad o infección fueron sustituidos para conseguir grupos homogéneos.

La técnica quirúrgica, bajo anestesia general y rigurosas medidas de asepsia, consistió en artrología por incisión parapatelar interna para exponer ambos cóndilos femorales y extraer con trocar dos injertos osteocondrales de 4 mm de diámetro y 2-3 mm de espesor, incluyendo cartílago articular y hueso subcondral. Así, fueron obtenidos un total de 30 injertos osteocondrales. La fijación de los mismos se realizó por presión, y no se utilizó inmovilización postoperatoria con lo que la actividad del animal sólo se vio restringida por las dimensiones de la jaula.

Los 30 injertos (Tabla 1) fueron utilizados para su implantación, tras congelación-descongelación, en cóndilo femoral interno de rodilla derecha y posterior sacrificio con dosis letal de tiobarbital a intervalos de 5 días (grupo a), 2 semanas

(grupo b), 4 semanas (grupo c), 8 semanas (grupo d) y 12 semanas (grupo e).

Todo el proceso de congelación-descongelación se desarrolló bajo condiciones de esterilidad proporcionada por una cabina de flujo aéreo laminar. Utilizamos como medio de congelación una solución constituida por agua ultrapura con PBS DulbeccosR, D-glucosa monohidrato, piruvato ácido, penicilina y estreptomina a una osmolaridad de 275-280 mosmol/Kg y a un pH de 7'35, a la que añadimos dimetil sulfoxido (DMSO) y propanodiol (PROH), como crioprotectores permeables, a unas diluciones preestablecidas de 0.25; 0.5; 0.75; 1.0; 1.25 y 1.5 molar; sacarosa, como crioprotector impermeable, a una dilución de 0.25 molar y suero fisiológico. Las piezas osteocondrales fueron sumergidas en este medio de congelación, con intervalo de 5 minutos en cada una de las diluciones indicadas.

En la última dilución del medio de congelación, las piezas osteocondrales fueron introducidas en criotubos de 1.8 ml, para su congelación en Planer Kryo-10, Serie II, Controlled Rate Freezers, siguiendo un descenso de temperatura controlada en 4 rangos de congelación: La 1ª entre +20° C y +4° C. a una tasa de -10° C/min, la 2ª entre +4° C y -4° C a -0'5° C/min, la 3ª entre -4° C y -80° C a -1° C/min. , y la 4ª entre -80° C y -140° C. a -2° C/min. Finalmente, fueron almacenadas a -196° C. en nitrógeno líquido durante 4 semanas. Para la descongelación, las piezas osteocondrales fueron introducidas en Planer Krio-10, Serie II, Controlled Rate Freezers a -100° C. para seguir una rampa gradual de +8° C/min hasta + 22° C, momento en que fueron retiradas del medio de congelación, pero en sentido inverso a su introducción, desde 1.6 molar hasta 0.25 molar. Finalmente fueron mantenidas en suero fisiológico hasta su implantación.

Tras el sacrificio se efectuó la extracción del cóndilo femoral derecho para fijación en formaldehído al 10%, descalcificación en ácido nítrico, procesado en parafina y obtención de cortes de 5 micras para su tinción en Hematoxilina-Eosina.

Para la valoración de resultados, desde el punto de vista macroscópico se valoraron los siguientes parámetros: resultado técnico, incorporación del injerto óseo, reacción de tejidos blandos, pannus, estado del injerto de cartílago. En el estudio microscópico se valoró la estructura y celularidad del cartílago.

Resultados. Macroscópicamente el cartílago implantado presentaba pérdida de brillo y transparencia y cambios degenerativos progresivos en relación con el tiempo de evolución (Fig. 1 A y B).

A los 5 días (grupo a) la tinción con H-E mostraba, gran eosinofilia citoplásmica, con picnósis nuclear, retracción y rotura de citoplasmas con lagunas vacías (Fig. 2).

A las 2 semanas (grupo b) se advertía como el área de implantación estaba constituido histológicamente por un material amorfo y eosinofílico sin arquitectura alguna (Fig. 3).

A las 4 semanas (grupo c) se observaban abundantes cambios degenerativos del cartílago con franca pérdida de celularidad, advirtiéndose sólo a nivel profundo algunos nidos celulares (Fig. 4).

A las 8 semanas (grupo d) la tinción con Hematoxilina-Eosina mostraba cambios histológicos degenerativos del cartílago, en todo su espesor, con desaparición tanto de la matriz como de las células, apareciendo como una masa eosinofílica amorfa con abundantes espacios claros (Fig. 5).

A las 12 semanas (grupo e) se advertía al microscopio óptico la presencia de un fibrocartílago a nivel de la zona de implantación del cartílago (Fig. 6).

Discusión. El trasplante de aloinjertos osteocondrales ha emergido como alternativa al reemplazo protésico en el tratamiento de lesiones tumorales y defectos del cartílago articular (20). De tal manera, que el avance de la cirugía ortopédica ha hecho posible el uso de cartílago articular fresco (21) y congelado (22) para reparar defectos de articulaciones humanas dañadas. Pero, a pesar de resultados precoces favorables, tardíamente aparecen complicaciones por

cambios degenerativos (23). Y se ha presentado evidencia de que una respuesta inmune por parte del huésped puede deteriorar la supervivencia de los injertos osteocartilaginosos (24), por lo que la inhibición de esta respuesta podría mejorar el resultado del injerto. Por tanto, el injerto osteocartilaginoso ideal deberá contener cartílago viable y hueso subcondral muerto carente de inmunidad. Por ello, se han desarrollado numerosos estudios de congelación de injertos osteocondrales (11-19,25) con el objetivo de conseguir mantener la viabilidad condrocitaria y disminuir la inmunidad del componente óseo.

La congelación y almacenamiento de células cartilaginosas aisladas en presencia de DMSO o Glicerol con o sin adición de tocoferol permite una elevada tasa de viabilidad con conservación de su fenotipo (10) pero su uso práctico está limitado por la dificultad de vehiculización de los mismos en defectos condrales (26) y la escasa capacidad de producción de matriz de las mismas para rellenar dichos defectos. Así, Bentley (27) publicó 90% de viabilidad de condrocitos aislados, pero tras su implantación en defectos del cartílago articular sólo el 33% de dichos defectos fueron rellenados con cartílago.

Las técnicas óptimas de almacenamiento de cartílago parece ser el uso de medio de cultivo a temperatura por debajo de congelación (25,28-32), pero estas técnicas tienen la desventaja de permitir el almacenamiento por cortos periodos de tiempo y la inmunidad del componente óseo no parece decrecer por este método (33) y el cartílago se deteriora después del trasplante posiblemente por respuesta inmune.

Por todo ello, la congelación de cartílago completo tendría la ventaja de permitir un largo periodo de almacenamiento, con ausencia de inmunidad y gran facilidad de trasplante, pero desafortunadamente el cartílago intacto no sobrevive a la congelación en muchos



Fig. 3: Material amorfo, carente de estructura en área de implantación a las 2 semanas (Grupo a) (H-E, 16 x).

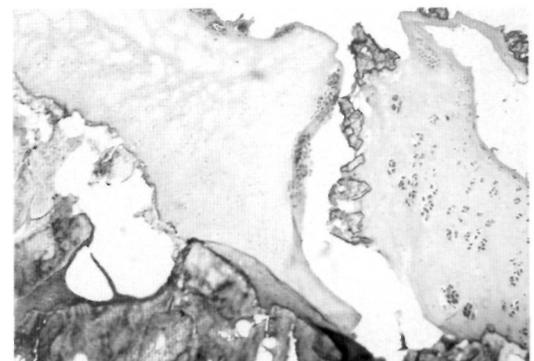


Fig. 4: Degeneración completa del cartílago articular con pérdida de celularidad a las 4 semanas (Grupo c) (H-E, 6,3 x).

Fig. 5: Ausencia de células cartilaginosas a las 8 semanas (Grupo d)(H-E, 6.3 x).

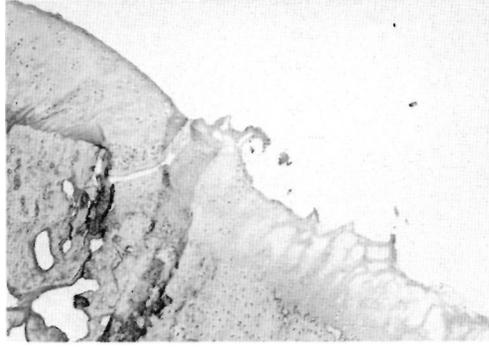
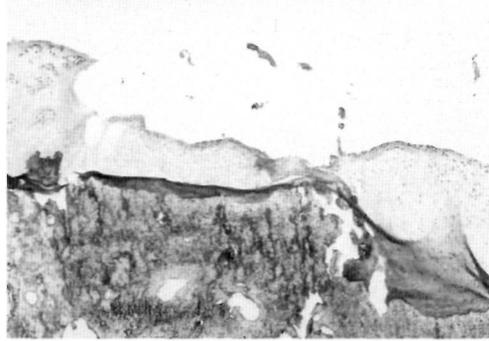


Fig. 6: Presencia de fibrocartilago en área de implantación a las 12 semanas (Grupo e)(H-E, 6.3 x).



casos (11,12,14-17,19,25) aunque mantenga sus propiedades mecánicas temporalmente (13,34) y pocos avances fundamentales se han hecho en este campo desde el reconocimiento de la importancia de la razón de enfriamiento y la introducción del glicerol y el DMSO como agentes crioprotectores.

Las condiciones óptimas para mantener la viabilidad parece ser un lento enfriamiento (10,14-16,19) con un meseta de alrededor de 1 hora a 4° para permitir la penetración del DMSO (35). Aunque el DMSO se ha mostrado que penetra fácilmente los tejidos (36) puede presentar interreacción con las moléculas de la matriz cartilaginosa, llevando a peor penetración dentro del cartíla-

go (18). Aunque Tomford (37) demostró captación de DMSO-H3 en la capa profunda del cartílago, diversos estudios de viabilidad encuentran esta reducida a la capa superficial (17,25,38) lo que coincidiría con esta dificultad de penetración a las capas profundas. El DMSO se considera tóxico sobre la base de sus efectos sobre la membrana celular y enzimas intracelulares (39,40). Estudios experimentales demuestran que la tasa de toxicidad del DMSO debe estar por debajo de 10-20% (38,41).

Así, hay muchos factores que afectan el éxito de la congelación, almacenamiento, descongelación e implantación de aloinjertos osteocondrales y el futuro debe dirigirse a mejorar la criobiología del cartílago articular por la aplicación, desarrollo o combinación de crioprotectores de menor toxicidad y mejor penetración que el DMSO actualmente utilizado, así como la precisa determinación de la óptima razón de congelación y descongelación es también importante.

El presente estudio ha tenido en cuenta estos conocimientos previos e indica que el cartílago articular no mantiene su viabilidad tras la implantación, de tal manera, que a los 5 días, en estos injertos fijados a presión que no han incorporado su capa ósea subcondral, sólo se mantiene la actividad celular en células aisladas a nivel periférico, quizás porque la nutrición por vía sinovial sea insuficiente para mantener la viabilidad del cartílago adulto. El injerto evoluciona a tejido amorfo acelular y pasados los 2 meses, tras la incorporación del componente óseo se desarrolla tejido fibrocartilaginoso de sustitución. ■■■■■

Bibliografía

1. **Langer F, Gross E.** Immunogenicity of allograft articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1974; 56A:297-302.
2. **Peacock EE, Weeks PM, Petty JM.** Some studies on the antigenicity of cartilage. *Am NY Acad Sci* 1960; 87:175-84.
3. **Heyner S.** The antigenicity of cartilage grafts. *Surg Gynec and Obstetr* 1973; 136:298-305.
4. **Malseed ZM, Heyner S.** Antigenic profile of the rat chondrocyte. *Arthrit and Rheumat* 1976; 19:223-31.
5. **Evans CH, Mazzocchi RA, Nelson DD, Rubash HE.** Experimental arthritis induced by intrarticular injection of allogenic cartilaginous particles into rabbit knee. *Arthrit and Rheumat* 1984; 27:200-7.
6. **Sin TM, Sedgwick AD, Willoughby D.** Studies on the mechanism of cartilage degradation. *J Pathol* 1984; 142:23-30.
7. **Czitrom AA, Axelrod T, Fernandes B.** Antigen presenting cells and bone allotransplantation. *Clin Orthop* 1985; 197:27-31.
8. **Langer F, Czitrom A, Pritzker KP, Gross AE.** The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *J. Bone Joint Surg* 1975; 57A:216-20.
9. **Schachar NS, Nagao M, Matsuyama T, McAllister D, Ishii S.** Cryopreserved articular chondrocytes grow in culture, maintain cartilage phenotype and synthesize matrix components. *J Orthop Res* 1989; 7:344-51.
10. **Van Steensen MA, Homminga GN, Burna P, Olthuis H, van den Berg WB.** Optimization of cryopreservative procedures for human articular cartilage chondrocytes. *Arch Orthop Traum Surg* 1994; 113:318-21.
11. **Bujia J, Kremer D, Sudhoff H, Viviente E, Sprekelsen C, Wilmes E.** Determination of viability of cryopreserved cartilage grafts. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995; 252:30-4.
12. **Desjardins MR, Hurting MB, Palmer NC.** Heterotopic transfer of fresh and cryopreserved autogenous articular cartilage in the horse. *Vet Surg* 1991; 20:434-45.
13. **Malinin TI, Mnaymneh W, Lo HK, Hinkle DK.** Cryopreservation of articular cartilage. Ultrastructural observations and long-term results of experimental distal femoral transplantation. *Clin Orthop* 1994; 303:18-32.
14. **Marco F, Lopez-Oliva F, Asenjo JA, Pedro JA, Noriega M, Garcia-Navarrete F, Lopez-Duran L.** Determinación de protocolos óptimos de crioconservación de aloinjertos osteocondrales. *Rev Orthop Traum* 1992; 36:116-22.
15. **Marco F, León C, Lopez-Oliva F, Pérez AJ, Sánchez-Barba A, Lopez-Duran L.** Intact articular cartilage cryopreservation. In vivo evaluation. *Clin Orthop* 1992; 283:11-20.
16. **Muldrew K, Hurting M, Novak K, Schachar N, McGann LE.** Localization of freezing injury in articular cartilage. *Criobiology* 1994; 31:31-8.
17. **Ohlendorf C, Tomford WW, Mankin HJ.** Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. *J Orthop Res* 1996; 14:413-6.
18. **Tavakol K, Miller RG, Bazett-Jones DP, Hwang WS, McGann LE, Schachar NS.** Ultrastructural changes of articular cartilage chondrocytes associated with freeze-thawing. *J Orthop Res* 1993; 11:1-9.
19. **Viviente E, Bujia J, Torregrosa C, Osete JM, Medina A, Sprekelsen C, Wilmes E.** Viabilidad celular de injertos de cartilago crioconservado. *Acta Otorrinolaringol* 1996; 47:263-7.
20. **Gebhardt MC, Flugstad DI, Springfield DS, Mankin HJ.** The use of bone allografts for limb salvage in high-grade extremity osteosarcoma. *Clin Orthop* 1991; 270:181-6.
21. **Meyers MH, Chatterjee SN.** Osteochondral transplantation. *Surg Clin North Am* 1978; 58:429-34.
22. **Mankin HJ, Doppelt SH, Sullivan TR, Tomford WW.** Osteoarticular and intercalary allograft transplantation in the management of malignant tumors of bone. *Cancer* 1982; 50:613-30.
23. **Parrish FF.** Allograft replacement of all or part of the end of long bone following excision of a tumor: report of 21 cases. *J Bone Joint Surg* 1973; 55A:1-22.
24. **Rodrigo JJ.** The problem of fit in osteochondral allograft. In Friedlaender GE, Mankin HJ and Sellkw (eds), *Osteochondral allografts: Biology, Banking and Clinical Applications*. Boston: Little Brown. 1984, p. 249.
25. **Brighton CT, Chester AS, Jimenez SA, Irwin JT, Lane JM, Lipton M.** Articular cartilage preservation and storage. *Arthrit and Rheum* 1979; 22:1093-101.
26. **Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Owaki H, Ono K, Yassui N.** Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg* 1989; 71B:74-80.
27. **Bentley G, Smith AU, Mukeryhee R.** Isolated epiphyseal chondrocyte allograft into joint surfaces. *Ann Rheum Dis* 1978; 37:449-53.
28. **Black J, Shadle CA, Parson R, Brighton CT.** Articular cartilage preservation and storage II. Mechanical indentation testing of viable stored articular. *Arthrit and Rheum* 1979; 22:1102-8.
29. **Brighton CT, Irwin JF, Lipton MA, Lane JM.** Application of tissue culture techniques to the storage of viable articular cartilage. *Trans Orthop Res Soc* 1977; 2:89-93.
30. **Kwan MK, Hacker SA, Woo SL, Wayne JS.** The effect of storage on the biochemical behavior of articular cartilage. A large strain study. *J Biomech Eng* 1992; 114:149-53.
31. **Schachar NS, Cucheran DJ, McGann LE, Novak K, Frank CB.** Metabolic activity of bovine articular cartilage during refrigerated storage. *J Orthop Res* 1994; 12:15-20.
32. **Wayne JS, Amiel D, Kwan MK, Woo S, Fierer A, Meyers MH.** Long-term storage effects on canine osteochondral allografts. *Acta Orthop Scand* 1990; 61:539-45.
33. **Thomas YD, Jimenez SA, Brighton CT.** Cell-mediated immune response to fresh, freeze-dried and in vitro stored viable osteochondral allografts in rabbits. *Trans Orthop Res Soc* 1982; 7:121-5.
34. **Tomford WW, Springfield DS, Mankin HJ.** Fresh and frozen articular cartilage allografts. *Orthopaedics* 1992; 15:1183-8.
35. **Tomford W, Duff GD, Mankin HJ.** Experimental freeze preservation of chondrocytes. *Clin Orthop* 1985; 197:11-4.
36. **David NA.** The pharmacology of dimethyl-sulfoxide 6544. *Ann Rev Pharmacol* 1972; 12:253-374.
37. **Tomford WW, Fredericks GR, Mankin HJ.** Cryopreservation of intact articular cartilage. *Trans Orthop Res Soc* 1982; 7:176-9.
38. **Schachar NS, Heard J, McGann L.** Relevance of the permeability coefficients and differential cooling rates to the cryopreservation of isolarteral articular cartilage chondrocytes. *Trans Orthop Res Soc* 1982; 7:120-6.
39. **Rannler DH.** The effect of DMSO on several enzyme system. *Ann NY Acad Sci* 1967; 141:291-9.
40. **Weiner ND, Lu MY, Rosoff M.** Interactions of dimethyl sulfide with lipid and protein monolayers. *J Pham Sci* 1972; 61:1098-101.
41. **Tomford W, Fredericks GR, Mankin HJ.** Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes. *J Bone Joint Surg* 1984; 66A:253-9.