

# EVALUACIÓN MICROSCÓPICA EN CONEJOS (*Oryctolagus cuniculus*) DE BIOCOPATIBILIDAD DE ALOIMPLANTE DE MENISCOS CONSERVADOS EN GLICERINA AL 98%

## Microscopic Evaluation in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of Meniscus Alloimplant Biocompatibility Preserved 98% Glycerin

Mastoby Miguel Martínez Martínez <sup>1\*</sup>, Juan Carlos Ballut Pestana <sup>1</sup> y Eulalio Manuel Lozano Sossa <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Ciencias Pecuarias, A.A. 354, Montería, Colombia. <sup>2</sup>Práctica privada, Montería, Colombia. E-mail: mastobymvz@hotmail.com

### RESUMEN

A fin de evaluar microscópicamente la biocompatibilidad de aloimplante de meniscos conservados en glicerina al 98%, se utilizaron 10 conejos machos de raza Nueva Zelanda Albina (cinco como donadores y cinco como receptores). De los donadores, cinco meniscos mediales frescos se utilizaron para estudio histológico (grupo control) y cinco se conservaron en glicerina al 98% por ocho meses para posterior implantación (grupo experimental). Previo a la implantación, los meniscos conservados se introdujeron 24 horas en recipiente plástico estéril que contenía 11 mL de solución constituida por 10 mL de cloruro de sodio al 0,9% y 1 mL de gentamicina (40mg) quedando a una concentración de 4mg de gentamicina. Después de 60 días de aloimplantación en rodilla de conejo, estos fueron sacrificados y los meniscos se retiraron y prepararon para estudio histológico. El estudio estableció que hubo crecimiento de células en los meniscos post-implantados y que las medias del conteo celular de los meniscos post-implantados presentaron diferencias estadísticamente significativas con los pre-implantados más NO hubo diferencias estadísticamente significativas entre las porciones de un mismo menisco. Además, el tipo de fibra predominante en los meniscos implantados fue colágeno tipo I en un 82% y el porcentaje restante (18%) correspondió a estructuras celulares oxidadas con citoplasma, indicativo de degeneración celular. Los meniscos aloimplantados en rodilla de conejo fueron biocompatibles porque permitieron crecimiento de células constitutivas de menisco (condroblastos, condrocitos, fibrocondrocitos), pudiendo considerarse una opción viable de reemplazo tisular en caso de lesión.

**Palabras clave:** Biocompatibilidad, histología, implantación, meniscectomía, rodilla.

### ABSTRACT

In order to evaluate microscopically the biocompatibility of meniscal alloimplantation in rabbits preserved in 98% glycerin, ten Albino New Zealand male rabbits were used (five donors and five receptors). Five fresh medial meniscus were used, taken from donors for histological study (control group), and five were preserved in 98% glycerin during eight months for late implantation (experimental group). Prior to implantation, the preserved meniscus were submerged during 24 hours in a sterile plastic container containing a 11 mL solution of 10 mL sodium chloride to 0.9% and 1 mL of gentamicin (40mg), leaving a 4 mg concentration of gentamicin. After 60 days of alloimplantation in rabbit knee, these were euthanized and the meniscus were removed and prepared for histological study. The study could establish that there was a growth of cells in the post-implanted meniscus and that the averages of cell count of the post-implanted meniscus presented statistical meaningful differences compared with the pre-implanted. However, there were not any statistical meaningful differences among portions from the same meniscus. Also, the type of predominant fiber in the implanted meniscus was 82% of type 1 collagen and the other percentage (18%) corresponded to oxidized cell structures with cytoplasm, an indicator of cellular degeneration. It was concluded that the alloimplanted meniscus in knee were biocompatible because they let the growth of constituting meniscus cells (chondroblasts, chondrocytes, fibrochondrocytes), being this considered a viable way to tissue replacement in case of injury.

**Key words:** Biocompatibility, histology, implantation, meniscectomy, knee.

### INTRODUCCIÓN

La sutura es la opción más adecuada para el tratamiento de las lesiones de menisco, siempre y cuando se pueda

restaurar su integridad anatómica y funcional, que depende de la cicatrización adecuada de la zona afectada y la irrigación vascular [2, 25]. Lesiones complejas o localizadas en áreas centrales avasculares por lo general no pueden ser reparadas [33, 36].

Los procedimientos como la meniscectomía y aloinjertos son opciones cuando no se puede utilizar la reparación o reconstrucción del menisco [9, 28, 30, 33, 36]. Dentro de las desventajas de los aloinjertos están la dificultad de la técnica de conservación, la posibilidad de ser un vector de enfermedades infecciosas, los posibles procesos de respuesta inmune, la viabilidad y el tamaño del implante [8, 29, 33, 35].

El injerto de menisco fresco es considerado como el tipo ideal de trasplante porque contiene un gran número de células viables [30]. En cuanto a la refrigeración a 4°C mantiene la viabilidad celular sin cambiar la arquitectura del menisco [15, 29].

Varios estudios han sugerido que una población viable de condrocitos puede tener un efecto beneficioso en el mantenimiento de la matriz extracelular y en la integridad mecánica del injerto después del trasplante [30]. El obstáculo para este procedimiento es coordinar el período en el cual las células se mantienen viables, desde la retirada del donante hasta el momento del trasplante [15].

La congelación a temperaturas inferiores a 0°C mantiene la viabilidad celular por un máximo de cinco días [9, 14, 29]. La congelación a temperaturas de -70°C, es el método más ampliamente utilizado para la preservación de los meniscos, causando la muerte de todas las células, pero mantiene la arquitectura del tejido [29, 34]. Aunque es un proceso poco generoso ha demostrado resultados clínicos satisfactorios. Existen autores que afirman que todas las células son destruidas, pero no causan efectos clínicos deletéreos debido a la acelularidad del tejido meniscal [1, 9, 14].

Los condrocitos son las células predominantes y están presentes en mayor cantidad en los cuernos de los meniscos, rodeado de abundante sustancia intersticial. Los fibrocitos se encuentran principalmente en la mitad exterior del menisco, distribuidos entre las fibras de colágeno [32].

Reckers y col. [29] cuantificaron la disminución progresiva de la viabilidad celular de meniscos de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) conservados para trasplantes en un período de 30 días a temperaturas de congelación de -7,2°C, -21,4°C y -73°C y obtuvieron viabilidad celular del 30%, concluyendo que, la cantidad de células viables del menisco fueron similares hasta el decimocuarto día de conservación en cualquiera de las temperaturas utilizadas. Sin embargo, a partir de este período de tiempo, la cantidad de células viables fue menor a temperaturas más bajas.

La criopreservación mantiene parcialmente la integridad de la membrana celular y la viabilidad de los condrocitos del donador [30, 34]. Este método mantiene entre el 30 y el 40%

de células viables, pero este porcentaje disminuye con el tiempo de almacenamiento [30]. De Beer y col. [11] encontraron que el 95% de las células del donante habían sido sustituidas un año después de la implantación por las células del hospedador en injerto de menisco humano criopreservado. Debido a estos resultados se preguntaron, si la viabilidad celular en el momento del trasplante sería realmente necesaria.

Los meniscos son fibrocartílagos compuestos principalmente por colágeno tipo I, representando cerca del 80% del contenido total y el 20% restante está compuesto por fibras de colágeno tipo II, III, V y VI, proteoglicanos, células y pequeñas cantidades de fibras elásticas [8, 19, 21, 22, 25]. Las fibras colágenas del menisco están orientadas principalmente de forma circunferencial, entrelazadas por fibras orientadas radialmente, que parten de la superficie del menisco hacia las capas más profundas [25, 30].

Braccialli y col. [6], al estudiar el cartílago auricular bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*) demostraron que, la glicerina al 98% evitó el crecimiento de microorganismos y mantuvo la integridad estructural y celular después de la implantación en el pabellón auricular de perros (*Canis familiaris domesticus*). La glicerina al 98% no causó alteraciones significativas en la integridad morfológica y estructural del tejido con membranas biológicas bovinas, tales como duramadre, fascia lata, pericardio, peritoneo y túnica vaginal [18]. La glicerina al 98% deshidrata el tejido, sustituyendo la mayor parte del agua intracelular sin alterar la concentración iónica de las células, actuando como protector eficaz de la integridad celular [27].

Los meniscos son considerados inmunoprivilegiados porque sus células están envueltas en una densa matriz, no permitiendo el acceso de células inmunorreactivas [30]. El papel de la viabilidad celular en el trasplante de menisco no es claro por el momento [29].

El objetivo de este estudio fue evaluar microscópicamente la biocompatibilidad de meniscos aloimplantados en conejos a través de la identificación y cuantificación de células presentes (histomorfometría celular) y tipo de colágeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestra

En este estudio fueron utilizados 10 conejos machos de la raza Nueva Zelanda, esqueléticamente maduros a la conformación radiográfica, con edad entre 10 y 12 meses y peso vivo entre 4 y 5 kg, oriundos del bioterio del Departamento de Ciencias Pecuarias de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Córdoba, Colombia. De los 10 conejos, cinco fueron donadores de meniscos y cinco receptores, los cuales tuvieron un período de tres meses para acostumbamiento en jaulas individuales, donde recibieron una dosis única de ivermectina 0,2mL al 1% por vía subcutánea, ración comercial dos veces al día (d) y agua a voluntad.

### Procedimiento para la colecta de meniscos

#### - Fase I

Para la extracción de los meniscos, los animales fueron tranquilizados con levopromacina a dosis de 2mg/kg, vía intramuscular, y sacrificados con sobredosis de pentobarbital, por vía intracardiaca.

Posterior a esto, toda la piel del miembro fue removida. Inmediatamente, la capsula articular y los ligamentos cruzados, intermeniscal, menisco-tibial y menisco-femoral fueron seccionados para la exéresis del menisco medial. Los meniscos fueron colocados en pequeños frascos plásticos estériles con capacidad para 20mL, conteniendo glicerina al 98%. Los frascos fueron rotulados para su identificación y almacenados a temperatura ambiente por ocho meses.

#### - Fase II

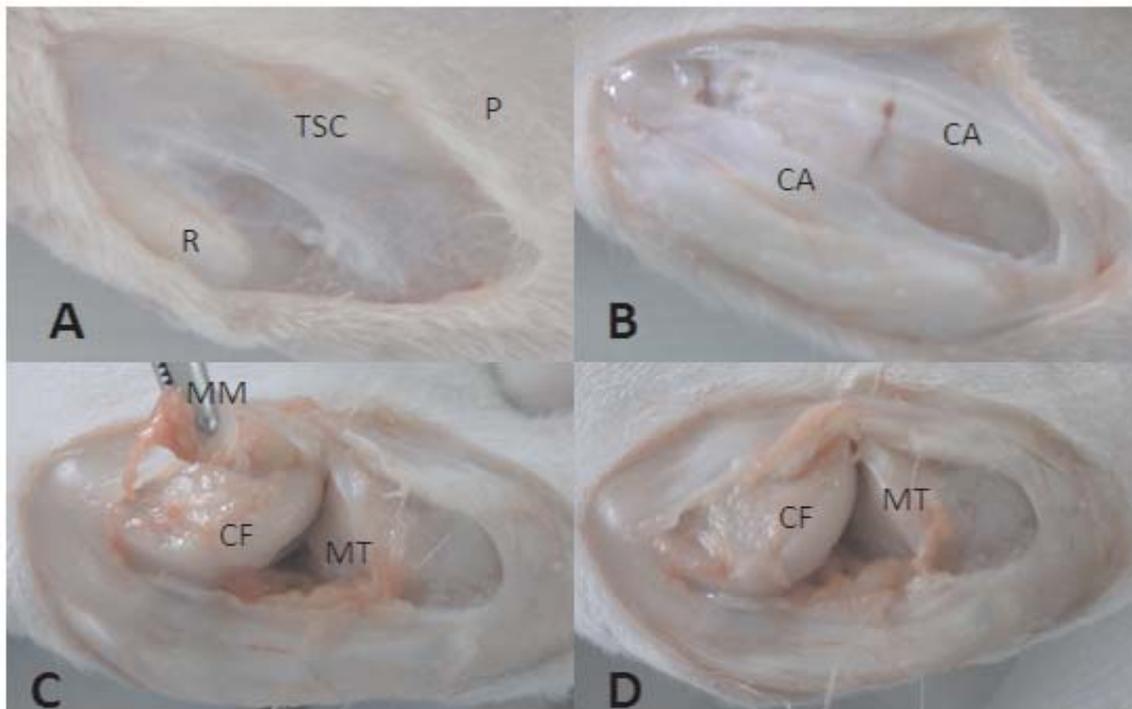
Para la implantación de los meniscos, fueron inmersos por un periodo de 24 horas (h) en 11 mL de una solución que contenía 10 mL de cloruro de sodio al 0,9% y 1 mL de gentamicina (40mg) quedando la solución a una concentración de 4mg de gentamicina.

Para el preoperatorio, los animales fueron mantenidos en ayuno hídrico de 12h y recibieron 4mg/kg de gentamicina por vía intramuscular, 45 min. previos a la inducción anestésica.

Posteriormente se les aplicó morfina 2 mg/kg/24h/2d, vía subcutánea y fueron sedados con levopromacina a la dosis de 2mg/kg y anestesiados con tiletamina/zolazepam a la dosis de 20 mg/kg, ambos por vía intramuscular. La región del miembro pélvico, del tercio proximal del fémur hasta el tercio distal de la tibia fue rasurada. Seguidamente se embrocó con éter etílico para remover la grasa cutánea. La anestesia disociativa se complementó con el bloqueo del nervio femoral utilizando lidocaína al 2% en dosis única de 1mL.

La preparación del campo operatorio fue hecha de manera rutinaria. El abordaje quirúrgico fue basado en la técnica descrita por Bojrab y col. [4] y adaptada para conejos, la cual se describe a continuación:

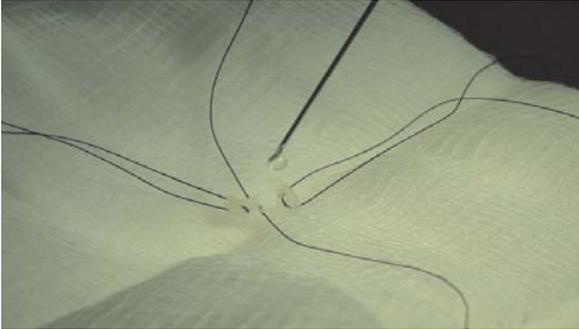
Para la meniscectomía medial total se realizó una incisión longitudinal de la piel y tejido subcutáneo en la superficie cráneo-medial de la articulación de la rodilla, de aproximadamente 1,5 cm de extensión. En seguida, el tejido celular subcutáneo fue disecado hasta la perfecta exposición de la capsula articular medial, que se incidió en un punto equidistante entre el ligamento colateral medial y la rótula. Seguidamente, la rótula fue luxada lateralmente y la rodilla flexionada, obteniéndose buena exposición articular. Un discreto esfuerzo en valgo y flexión de la rodilla fueron suficientes para conseguir el abordaje del menisco medial (FIG. 1). Se utilizó bisturí N° 15 y tijera curva de 10 cm para la realización de la meniscectomía medial total.



**FIGURA 1. MENISCECTOMÍA MEDIAL TOTAL EN CONEJO. DONDE; A) INCISIÓN LONGITUDINAL DE PIEL (P) Y TEJIDO SUBCUTÁNEO (TSC). R= ROTULA. B) CAPSULOTOMÍA ARTICULAR DE LA RODILLA (CA). C) DESPUÉS DE LA SECCIÓN DE LOS LIGAMENTOS MENISCO-CAPSULARES, MENISCO-TIBIAL CRANEAL E INTERMENISCAL, EL MENISCO MEDIAL (MM) QUEDÓ FIJO POR EL LIGAMENTO MENISCO-TIBIAL. CF= CÓNDILO FEMORAL Y MT= MESETA TIBIAL. D) ARTICULACIÓN MENISCECTOMIZADA.**

Fuente: Mastoby M. Martínez M.

Previo a la implantación de los meniscos se le realizaron dos puntos en U transversos, el primero en la región entre el cuerno anterior y el tercio medio del menisco; y el segundo entre el tercio medio y el cuerno posterior utilizando seda 4-0. Un tercer punto simple se realizó en el cuerpo del menisco, dejando todos los cantos de aproximadamente 10 cm de longitud (FIG. 2).



**FIGURA 2. MENISCO PRE-IMPLANTACIÓN CON LOS TRES PASAJES DE SEDA.**

Fuente: Mastoby M. Martínez M.

Para la implantación del menisco medial fue necesaria su acomodación dentro de la articulación de acuerdo a la disposición anatómica. Los cantos largos de la seda fueron pasados con el auxilio de una aguja calibre 21G, donde el punto caudal se anudó a los músculos de la región poplítea previo pasaje de la cápsula articular y el punto craneal se anudó al ligamento rotuliano en distal y ligeramente por debajo del correspondiente borde de la meseta tibial. El tercer punto en el cuerpo meniscal se anudó, una vez conseguido el cierre de la cápsula articular (FIG. 3). Los planos incididos se suturaron de forma rutinaria empleando para ello puntos simples con seda 4-0. La misma operación se realizó en todos los animales del experimento.

### - Fase III

En el postoperatorio, los animales recibieron 2mg/kg/24h/2d vía subcutánea de morfina y 0,2mg/kg/24h/5d, vía intramuscular de ceftriaxona para la analgesia y antibioticoterapia, respectivamente. Se hicieron curativos diarios de la herida quirúrgica con solución salina fisiológica al 0,9% hasta cicatrización completa y la retirada de los puntos se realizó a los 15d posteriores a la cirugía. Completados los 60d, los conejos fueron sacrificados con sobredosis de barbitúrico (Eutanex®) previa tranquilización con levopromacina, como lo sugerido por el código de ética profesional para animales de experimentación. Los meniscos mediales implantados fueron retirados de la articulación de la rodilla y conservados en formalina para posterior procesamiento histológico.

### Preparación de las muestras y estudio microscópico

#### ➤ Preparación y evaluación de las muestras para la celularidad

Fueron coloreadas por el método de Hematoxilina – Eosina (HE) y para la realización de la morfometría, los cortes

fueron medidos por entero, utilizando objetivo de 40x veces, para calcular el área del corte en mm<sup>2</sup>. Para cada lámina fueron identificados y contados los diferentes tipos celulares, determinados en 500 cuadrantes tomados aleatoriamente. Fue realizada la lectura y descripción histológica de las láminas, evaluando la distribución y los tipos de células presentes: fibroblastos, condrocitos y condroblastos. Las células fueron identificadas y contadas para cada muestra.

#### ➤ Preparación y evaluación de las muestras para fibras de colágeno

Las láminas debidamente identificadas fueron coloreadas por el método tricómico de Masson. Cada lámina fue analizada por el sistema computarizado de análisis de imágenes, constituido por una video-cámara, acoplada a un microscopio óptico marca LEICA modelo DM500, fabricado por Microsystems Suiza 2008, con objetivos pancromáticos de 10x, que transmitieron las imágenes a un computador de escritorio convencional HP de dos gigas de memoria y disco duro de 200 megas perteneciente al laboratorio de simulación del Programa de Ingeniería Industrial de la Universidad de Córdoba, equipado con placa digitalizadora y software Imagen-Pro Plus® (versión 4,5) para la realización de la identificación de las fibras de colágeno y su posterior conteo.

### Estudio estadístico del conteo celular

El estudio estadístico del conteo celular de los meniscos se realizó en dos fases, una de ellas haciendo estudios comparativos entre los diferentes estados de los meniscos (pre-implantación y post-implantación) y la otra, entre las partes que conforman al menisco (craneal, cuerpo y caudal) que se le denominó estudio intra-meniscal.

#### ➤ Estudio estadístico entre los meniscos pre y post-implantación

Se usó como herramienta el Diseño de Experimentos también conocido como DOE por sus siglas en inglés. La información que se registró en el software se fundamentó en los aspectos que se describen a continuación:

##### • Factores y niveles del experimento

En el experimento se plantearon dos factores con sus respectivos niveles de operación:

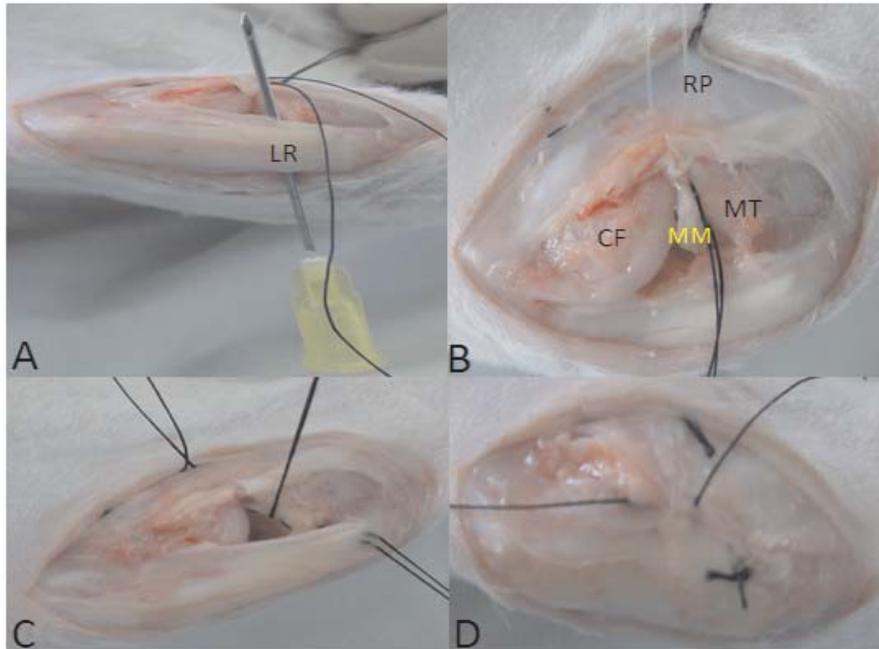
A = Estado del menisco.      B = Tipo de célula

##### • Diseño del experimento

Se realizó un diseño multifactorial categórico de dos factores con cinco replicas y una variable de respuesta. Los datos para el diseño fueron recolectados contando las células encontradas en los meniscos.

##### • Resultados del experimento

En primer lugar se realizó un análisis de varianza para determinar si los factores presentaban efectos estadísticamente significativos sobre el conteo de las células.



**FIGURA 3. TÉCNICA QUIRÚRGICA PARA ALOIMPLANTACIÓN DEL MENISCO MEDIAL EN LA ARTICULACIÓN DE LA RODILLA DE CONEJO DONDE; A) UTILIZACIÓN DE AGUJA PARA EL PASAJE DE LA SEDA POR EL LIGAMENTO ROTULIANO (LR). B) ACOMODACIÓN INTRA-ARTICULAR DEL MENISCO MEDIAL. CF= CÓNDILO FEMORAL MEDIAL, MT= MESETA TIBIAL MEDIAL, MM= MENISCO MEDIAL, RP= REGIÓN POPLÍTEA. C) ACOMODACIÓN INTRA-ARTICULAR DEL MENISCO MEDIAL CON EL PASAJE DE LA SEDA POR EL LIGAMENTO ROTULIANO EN DISTAL AL BORDE DE LA MESETA TIBIAL. D) CAPSULORRAFIA Y ANUDACIÓN DE LA SEDA EN LA REGIÓN POPLÍTEA Y EN EL LIGAMENTO ROTULIANO. LOS CANTOS DE SEDA SUELTOS CORRESPONDEN AL PUNTO DEL CUERPO DEL MENISCO Y ES EL ÚLTIMO EN ANUDARSE.**

**Fuente:** Mastoby M. Martínez M.

Para demostrar que los datos cumplían el supuesto de Normalidad se realizó el método de Probabilidad Normal, pruebas de Homoscedasticidad y Bondad de ajustes, donde la prueba de Kolmogorov-Smirnov fue la utilizada [23].

• **Prueba de múltiples rangos**

Con esta prueba se realizó una comparación múltiple que permitió determinar las medias significativamente diferentes de otras y las diferencias estimadas entre cada par de medias. El método empleado para discriminar entre las medias fue la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hubo un riesgo del 5,0% de decir que cada par de medias era significativamente diferente, cuando la diferencia real era igual a 0.

Además del estado del menisco, se consideró importante determinar lo sucedido con los tipos de células, esto se analizó con los resultados de las pruebas de múltiples rangos para los tres tipos.

➤ **Estudio estadístico intrameniscal**

En el estudio estadístico se usó como herramienta el DOE. Con los datos recolectados se realizó un análisis de varianza para determinar si los factores presentaban efectos estadísticamente significativos sobre el conteo de las células.

Para realizar el análisis del experimento diseñado, se determinó el uso del software especializado Statgraphics centurión 15 con el que cuenta la Universidad de Córdoba.

La información que se registró en el software se fundamentó en los aspectos que se describen a continuación.

• **Factores y niveles del experimento**

En el experimento se plantearon dos factores con sus respectivos niveles de operación:

- A = Porción del menisco
- B = Tipo de célula

• **Diseño del experimento**

Para el experimento, se realizó un diseño multifactorial categórico de dos factores con cinco replicas y una variable de respuesta.

• **Datos del experimento**

Los datos recolectados se obtuvieron contando las células en cada porción de meniscos.

• **Resultados del experimento**

Con los datos recolectados se realizó un análisis de varianza para determinar si los factores presentaban efectos estadísticamente significativos sobre el conteo de las células.

Para verificar la normalidad de los datos del experimento se realizó la prueba de Probabilidad Normal, además, se consideró necesario confirmarlo con las pruebas de Homoscedasticidad y las de Bondad de ajustes donde la prueba utilizada fue la de kolmogorov-Smirnov.

• **Prueba de múltiples rangos**

Con esta prueba se realizó una comparación múltiple que permitiera determinar las medias significativamente diferentes de otras y las diferencias estimadas entre cada par de medias. El método empleado para discriminar entre las medias fue la LSD de Fisher. Con este método hubo un riesgo del 5,0% de decir que cada par de medias era significativamente diferente, cuando la diferencia real era igual a 0.

➤ **Variables Controladas**

Las variables controladas en la investigación fueron la cantidad de líquido de conservación, tiempo de conservación, tiempo de rehidratación, tiempo de aloimplantación, sexo, especie, raza, edad, peso, estado de salud, manejo y alimentación y procedencia.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Al análisis microscópico de los meniscos implantados, se evidenciaron varios tipos celulares: condroblastos, condrocitos y fibroblastos (FIG. 4). Los condroblastos fueron las células predominantes en todo el menisco (craneal, cuerpo, caudal), pero en la región caudal se determinó una mayor proporción comparándola con las otras áreas; este resultado difiere del reporte de Vilela y col. [35], quienes encontraron que, los condrocitos fueron las células predominantes en meniscos frescos, rehidratados y conservados en glicerina. Otras estructuras fueron observadas, como tejido fibroconectivo con proliferación de fibras elásticas y tejido adiposo, difiriendo del reporte hecho por Athanasiou y Sánchez [3] y Vilela y col. [35], quienes no encontraron estos tejidos en las muestras analizadas.

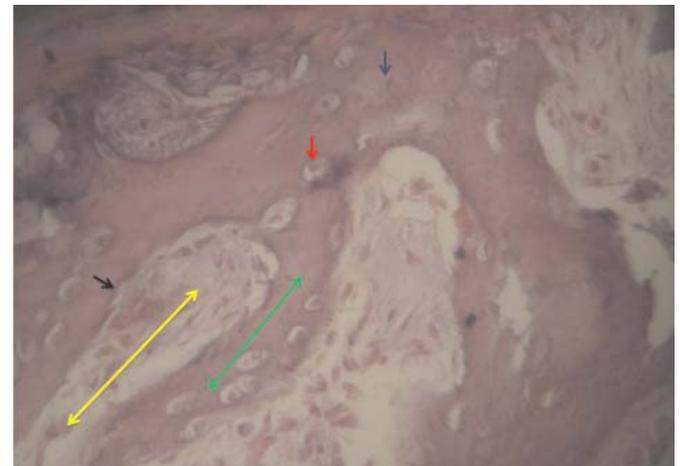
Signos de procesos inflamatorios o de rechazo como la presencia de leucocitos, células gigantes no se observaron en este estudio, contrario a los resultados de Oliveira [24] y Bolson y col. [5], donde evidenciaron procesos inflamatorios cuando implantaron cartílago auricular bovino en cadera de perros y clavos óseos homólogos en la osteosíntesis humeral en palomas (*Columba livia*) domésticas, respectivamente.

El análisis histológico de uno de los meniscos evidenció la presencia de tejido óseo maduro con formación de trabéculas y cavidades de medula ósea rodeados por tejido fibroadiposo (FIG. 5), esta presentación inusual posiblemente fue el resultado de lesión traumática en una de las superficies articulares de la rodilla receptora durante la implantación del menisco, lo que probablemente desencadenó la cascada de un proceso reparativo óseo; estos resultados coinciden con las observaciones de Frederich y col. [28] y Romero y col. [31] quie-



**FIGURA 4. FOTOMICROGRAFÍA DE MENISCO CON 60 DÍAS DE ALOIMPLANTACIÓN EN RODILLA DE CONEJO. HE, 10X. SE OBSERVAN: CONDROCITO (FLECHA NEGRA), CONDROBLASTO (FLECHA AZUL), FIBROBLASTO (FLECHA VERDE).**

Fuente: Mastoby M. Martínez M.



**FIGURA 5. FOTOMICROGRAFÍA DE MENISCO CON PRESENCIA DE CÉLULAS ÓSEAS A LOS 60 DÍAS DE ALOIMPLANTACIÓN EN RODILLA DE CONEJO. DONDE; HE, 40X. SE OBSERVA: OSTEOCITO (FLECHA ROJA), OSTEOBLASTO (FLECHA AZUL), ENDOSTIO (FLECHA NEGRA), CAVIDAD MEDULAR (FLECHA AMARILLA) Y TRABÉCULA ÓSEA (FLECHA VERDE).**

Fuente: Mastoby M. Martínez M.

nes afirman que el traumatismo directo al tejido óseo peri-meniscal es una de las posibles causas de este hallazgo.

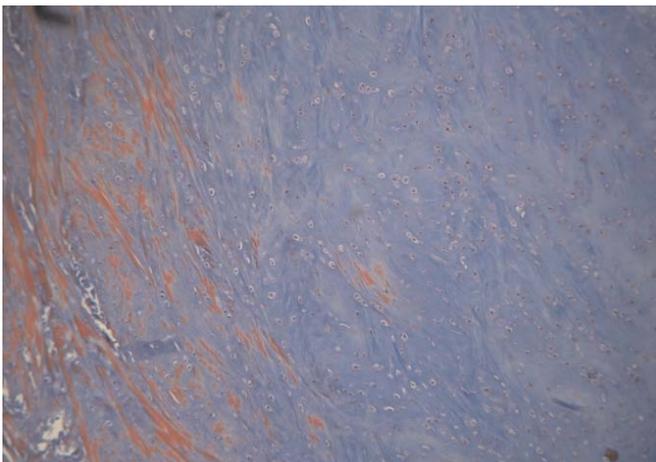
Al comparar el recuento promedio celular de los meniscos pre y post-implantados, se observó un mayor recuento en los post-implantados, resultado que presume una repoblación celular, que es uno de los indicativos de aceptación por parte del tejido receptor. Por otro lado, el menor recuento celular en los meniscos pre-implantados, probablemente estuvo influenciado por el tiempo de conservación (ocho meses) y por el medio de conservación (glicerina al 98%), debido a que este me-

dio conserva las propiedades mecánicas de tejidos pero no la vitalidad celular [16, 31].

Al comparar las interacciones entre los estados meniscales (pre y post-implantación) y el tipo de célula predominante, se encontró que los condroblastos fueron las células predominantes en los meniscos post-implantados mientras que los fibrocondrocitos fueron el tipo celular predominante en los meniscos pre-implantados.

Los condroblastos son la fase inmadura de los condrocitos que se encuentran normalmente en los meniscos [12] y al ser encontrados en mayor cantidad en los meniscos post-implantados, puede ser indicativo de un proceso proliferativo, estimulado por la necesidad fisiológica de la sustancia fundamental amorfa y procolágeno tipo II, necesarios para la forma y resistencia meniscal. En otro sentido, el hecho de encontrar menor cantidad de condroblastos en los meniscos pre-implantados pudo deberse al periodo de tiempo de ocho meses que permanecieron conservados en glicerina, ocasionando envejecimiento fisiológico de estas células; además, según Dubin y col. [13] y Jordán [20], la muerte programada de las células (apoptosis) es producto de la pérdida de una actividad supresora. La falta de factores de crecimiento o a la disminución de los contactos con las células que las rodean, produce efectos opuestos a la mitosis en la regulación del tamaño de los órganos y de los tejidos.

El tipo de colágeno que más predominó en los meniscos implantados fue el colágeno tipo I con un 82% aproximadamente (FIG. 6), coincidiendo con los resultados de Athanasiou y Sánchez [3], Chevrier y col. [10] y Vilela y col. [35], quienes reportaron porcentajes semejantes de colágeno tipo I en meniscos frescos de conejos. Este tipo de colágeno hallado en un mayor porcentaje permite un comportamiento biomecánico semejante al de un menisco *in situ*.



**FIGURA 6. FOTOMICROGRAFÍA DE MENISCO DE CONEJO A LOS 60 DÍAS DE ALOIMPLANTACIÓN. SE OBSERVAN LAS FIBRAS DE COLÁGENO TIPO I DE COLOR AZUL, ESTRUCTURAS OXIDADAS MÁS CITOPLASMA DE COLOR ROJO Y NÚCLEOS CELULARES DE COLOR LILA Y MARRÓN. COLORACIÓN CON TRICRÓMICO DE MASSON, 10X.**

Fuente: Eulalio M. Lozano S.

El porcentaje restante (18%) correspondió a estructuras celulares oxidadas con citoplasma, indicativo de degeneración celular. En este sentido, los resultados obtenidos coinciden con los reportes de McDevitt y Webber [22]; McBride y Clancy [21]; Palastanga y col. [26]; Jackson y col. [19]; Buma y col. [8] y Chevrier y col. [10]. De acuerdo con los hallazgos celulares es probable que el tipo de colágeno observado sea sintetizado por los nuevos condroblastos; además, la biocompatibilidad obtenida, sugiere una bio-recepción del huésped sin reacciones de rechazo en los meniscos post-implantados, coincidiendo con el reporte de Brown y col. [7] y González [17], quienes afirman que los biomateriales para implantación no deben ocasionar reacciones adversas post-cirugía (dolor, necrosis o reabsorción del tejido implantado) en el organismo receptor.

## CONCLUSIONES

Los aloimplantes meniscales en rodilla de conejo se muestran biocompatibles porque permitieron crecimiento de células constitutivas de menisco (condroblastos, condrocitos, fibrocondrocitos), pudiendo considerarse una opción viable de reemplazo tisular en caso de lesión.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Universidad de Córdoba-Colombia por proporcionar los recursos para la investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AAGAARD, H.; VERDONK, R. Function of the meniscus and consequences of meniscal resection. *Scandinav. J. Med. Sci. in Sports*. 9: 134-40. 1999.
- [2] ANDERSON-MOLINA, H.; KARLSSON, H.; ROCKBORN, P. Arthroscopic partial and total meniscectomy: Long-term follow-up study with matched controls. *J. Arthrosc.* 8: 183-189. 2003.
- [3] ATHANASIOU, K.; SANCHEZ, J. Engineering the Knee Meniscus. Synthesis. *Lec on Tiss Engin.* 1(1): 1-97. 2009.
- [4] BOJRAB, J.; ELLISON, G.; SLOCUM, B. Meniscectomia. *Técnicas actuales en Cirugía de pequeños animales*. 4ª Ed. Editorial intermédica, Buenos Aires- Argentina, Pp 1125-1130. 2000.
- [5] BOLSON, J.; SCHOSSLER, J.E.W.; MACHADO, G.; ZEMBRZUSKI, F.B. Pino ósseo homólogo conservado em glicerina a 98 por cento e hemicerclagem com fio poliglactina 910 na osteossíntese umeral de pombos domésticos. *Ciê. Rur.* 38(7): 1925-1931. 2008.
- [6] BRACCIALLI, S.; DALECK, R.; COSTA N, M.; ALESSI, C.; VICENTI, M. Implante de cartilagem auricular de bo-

- vino, conservadora em glicerina a 98%, na aurícula de cães. **J. Vet. Notic.** (1): 53-59. 2001.
- [7] BROWN, T.; BURSTEN, B.; BURDGER, J. Materiales modernos. **Química: La Ciencia central**, 9ª Ed. Buenos Aires- Argentina. Pp. 450-476. 2004.
- [8] BUMA, P.; RAMRATTAN, N.; VAN TIENEN, T.; VETH, R.P. Tissue engineering of the meniscus. **Biomater.** 25(9): 1523-1532. 2004.
- [9] CURY, R.; CAMARGO, O.; PROSPERO, J.; BOTTER, F.; SEVERINO, N.; AIHARA, T.; MARQUES DE O, V. Transplante Homólogo de menisco: Estudo experimental em coelhos. **Res. Bras. Ortop.** 37 (8): 341-350. 2002.
- [10] CHEVRIER, A.; NELEA, M.; HURTIG, M.; HOEMANN, C.; BUSCHMANN, M. Meniscus Structure in Human, Sheep, and Rabbit for Animal Models of Meniscus. **J. Orthop. Res.** 27(9): 1197-203. 2009.
- [11] DEBEER, P.; DECORTE, R.; BELLEMANS, J. DNA analysis of a transplanted cryopreserved meniscal allograft. **J. Arthrosc.** 16 (1): 71-75. 2000.
- [12] DELLMANN, H. Tejidos conjuntivo y de sostén. **Histología Veterinaria**. 2nd Ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España. Pp 42-43. 1994.
- [13] DUBIN, M.; STOPPANI, A. Muerte celular programada y apoptosis: Función de las mitocondrias. **Med. B. Aires.** 60(3): 375-386. 2000.
- [14] FABBRICIANI, C.; LUCANIA, L.; MILANO, G.; PANNI, S.; EVANGELISTI, M. Meniscal allografts: Cryopreservation vs deep-frozen technique. An experimental study in goats. *Knee Surg, Sports Traumatol*, **Arthrosc.** 5(2): 124-34. 1997.
- [15] FELIX, A.; PAULOS, E. Current status of meniscal transplantation. **Knee.** 8(10): 13-17. 2003.
- [16] GIGEK, T.; MARTINS, DE O.; CHAVES, DE A.; DE CARVALHO, W.; VERECHIA, P.; DE ALMEIDA, A. Estudo analítico da técnica de gliceração empregada para conservação de peças anatômicas de bovinos. **V simpósio de Ciências da Unesp – dracena VI encontro de Zootecnia**. Dracena 09/22-24. Brasil. Pp 05352-05355. 2009.
- [17] GONZALEZ, G. Tratamientos superficiales para mejorar la biocompatibilidad de biomateriales metálicos. **XIII Congreso Venezolano de Microscopia y Microanálisis**, Cumaná, 11/09-13, Venezuela. Pp. 1-4. 2008.
- [18] GUIMARÃES, G.; SCAVONE, A.; MACHADO, M.; CRUZ, C.; CAPALBO, A.; SANTOS, A. Avaliação histológica de membranas biológicas bovinas conservadas em glicerina e a fresco. **Biosc. J.** 23 (3): 120-127. 2007.
- [19] JACKSON, J.; VASSEUR, P.; GRIFFEY, S.; WALLS, CH.; KASS, P. Pathologic changes in grossly normal menisci in dogs with rupture of the cranial cruciate ligament. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 218(8): 1281-1284. 2001.
- [20] JORDÁN, J. Apoptosis: muerte celular programada. **Offarm.** 22(6): 100-106. 2003.
- [21] MCBRIDE, D.; CLANCY, J. Lacerações Meniscais/Reparação. In: Andrews, JR; Timmerman, LA. (Eds). **Artroscopia: Diagnóstico e Cirurgia**. Rio de Janeiro: Revinter. Pp 270-280. 2000.
- [22] MCDEVITT, C.; WEBBER, R. J. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. **Clin. Orthop. and Rel. Res.** 252: 8-18. 1990.
- [23] NORUSIS, M. J. *SPSS professional statistics* 6.1. Chicago: SPSS, Inc. 1994.
- [24] OLIVEIRA, J. Acetabuloplastia extracapsular em cães com cartilagem auricular de bovino conservada em glicerina. Universidade Estadual Paulista. São Paulo – Brasil. Tese doutoral. 95 pp. 2003.
- [25] PAIVA, A. Correlação entre diferentes temperaturas e períodos de preservação sobre fibras colágenas de meniscos de coelhos. Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. Tese mestrado. 48 pp. 2006.
- [26] PALASTANGA, N.; FIELD, D.; SOAMES, R. Articulaciones. **Anatomía y movimiento humano: Estructura y funcionamiento**. Editorial Paidotribo. Pp 312-324. 2007.
- [27] PIGOSSI, N. Implantação de dura-máter homóloga conservada em glicerina. Estudo experimental em cães. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Tese doutoral. 92 pp. 1964.
- [28] RAMÍREZ, R.; NARVAEZ, A.; RODRIGUEZ, L.; ZÁRATE, J.; GRACIA, J. Descripción de un caso similar a miositis osificante localizada en un perro. **Vet. Mex.** 39(4): 451-456. 2008.
- [29] RECKERS, L.; FAGUNDES, D.; COHEN, M. Effects of different preservation temperatures and periods meniscus cellularity in rabbits. **Acta Cirúr. Brasil.** 20(6): 428-432. 2005.
- [30] RIJK, P. C. Meniscal Allograft Transplantation – Part I: Background, Results, Graft Selection and Preservation, and Surgical Considerations. **Arthrosc.** 20(7): 728-743. 2004.
- [31] SILVA, E. M.; DIAS, G.; TABARES, M.; MARQUES, T.; FURTADO, J. Estudo Analítico da Técnica de Gliceração Empregada para Conservação de Peças Anatômicas – Experiência da Disciplina de Anatomia Humana do Departamento de Morfologia do UniFOA. 2008. Centro Universitário Volta Redonda. Cadernos UniFOA, Volta Redonda, Edição Especial, maio En línea: <http://www.unifoa.edu.br/pesquisa/caderno/especiais/pos-graduacao/01/66.pdf>?. 14 de agosto de 2009.

- [32] SOMER, L; SOMER, T. Is the meniscus of the knee joint a fibrocartilage. **J. Acta Anat.** 116(3): 234-244. 1983.
- [33] TORRES, B; MUZZI, L; VALÉRIO, A. Como proceder nas lesões meniscais em cães: Revisão. **Clín. Vet.** 63: 48-58. 2006.
- [34] VERDONK, R.; KOHN, D. Harvest and conservation of meniscal allografts. **Scandinav. J. of Med. and Sci. in Sport.** 9: 158-159. 1999.
- [35] VILELA, L.; DEL CARLO, R.; SILVA, J.; MATTA, S.; RODRIGUES, M.; MONTEIRO, B.; MATINEZ, M.; REIS, A.; MACHADO, D.; LOPES, L. Estrutura e celularidade de meniscos frescos de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e preservados em glicerina. **Pesq. Vet. Bras.** 30(4): 295-300. 2010.
- [36] WYLAND, J; GUILAK, F; ELLIOTT, M; SETTON, L; VAIL, T. Chondropathy after meniscal tear or partial meniscectomy in a canine model. **J. Orthop. Res.** 20(5): 996-1002. 2002.