

# La congelación causa cambios ultraestructurales en la red colágena meniscal. Resultados preliminares\*

P. Gelber<sup>(1)</sup>, A. Torres<sup>(1)</sup>, F. Alameda<sup>(2)</sup>, J. Lloreta<sup>(2)</sup>, E. Cáceres<sup>(1)</sup>, J.C. Monllau<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología. <sup>(2)</sup> Servicio de Anatomía Patológica. IMAS-Hospitales del Mar y de la Esperança. Barcelona

## Correspondencia:

P. Gelber  
IMAS-Hospitales del Mar-Esperança  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Passeig Marítim, 23-25. 08003 Barcelona  
e-mail: pgelber@imas.imim.es

\* PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN CONCEDIDO EN EL XXIV CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE ARTROSCOPIA

Se sugiere que una alteración en la red colágena que disminuya la permeabilidad meniscal y conlleve a un déficit nutricional podría ser la causa de la retracción o *shrinkage* del menisco trasplantado. El objetivo fue evaluar si la congelación, uno de los procesos de conservación meniscal más empleados, podía alterar la ultraestructura colágena meniscal. Se analizaron con microscopía electrónica tres meniscos previamente congelados a -80 °C y otros tres como control. Se midió el diámetro de las fibras y se clasificaron en tres grados de acuerdo con el nivel de desestructuración colágena. El diámetro de las fibras colágenas de los meniscos congelados promediaba en cortes longitudinales 12,78 nm, y en los transversales 14,78 nm. Los controles presentaban una media de 14,52 nm en las secciones longitudinales y 17,67 nm en las transversales. Los meniscos congelados fueron clasificados como grado 3, y los controles como grado 2. Los resultados sugieren que el proceso de congelación tiende a alterar la red colágena meniscal.

**Palabras clave:** Conservación meniscal. Red colágena. Congelación. Cambios ultraestructurales.

**Freezing causes ultrastructural changes in the meniscal collagen network. Preliminary results.** It is suggested that changes in the collagen network reducing meniscal permeability and leading to nutritional deficiency might be the cause of the retraction or shrinkage of the transplanted meniscus. The aim of our study was to assess whether freezing, one of the most widely used procedures for meniscus preservation, might alter the meniscal collagen ultrastructure. Three menisci that had been previously frozen to -80 °C and a further three control ones were studied by electron microscopy. The diameters of the fibres were measured and classed into three categories according to the degree of collagen destruction. In the frozen menisci, the mean diameter of the collagen fibres was 12.78 nm in longitudinal sections and 14.78 nm in transverse ones. The corresponding values for the control menisci were 14.52 nm and 17.67 nm, respectively. The frozen menisci were classed as category 3, and the control ones as category 2. These results suggest that the freezing procedure tends to alter the meniscal collagen network.

**Key words:** Meniscus preservation. Collagen network. Freezing. Ultrastructural changes.

## INTRODUCCIÓN

Una de las complicaciones más frecuentemente observadas después del trasplante meniscal alogénico es la disminución de tamaño o retracción (*shrinkage* en la literatura anglosajona) del tejido trasplantado<sup>(1)</sup>. Se cree que este

fenómeno, de etiología desconocida, potenciaría la susceptibilidad al daño del cartílago articular<sup>(2-4)</sup>. Una de las hipótesis etiológicas que se mencionan en la literatura responsabiliza a una reacción más o menos sutil de rechazo inmunológico<sup>(5)</sup>. Más recientemente, otra teoría ha sugerido que esta disminución del tamaño

meniscal vendría condicionada por un déficit nutricional, secundario a cierto grado de desestructuración de la red colágena<sup>(6)</sup>.

Los cambios histológicos que se producen en los aloinjertos meniscales tras la inmovilización<sup>(5)</sup> y el trasplante han sido estudiados por diferentes autores, tanto en modelos experimentales<sup>(1,7)</sup> como clínicos<sup>(5)</sup>. Del mismo modo, las alteraciones que los diversos procedimientos de conservación —como la criopreservación<sup>(7,8)</sup>, la liofilización<sup>(9)</sup> y también la congelación profunda<sup>(10)</sup>— puedan causar sobre la celularidad y propiedades mecánicas de los trasplantes también han sido analizadas. Sin embargo, se desconocen los posibles efectos que la congelación a -80 °C, uno de los procedimientos más habituales de conservación de aloinjertos, pudiera producir sobre la ultraestructura meniscal. El objetivo de este trabajo fue evaluar si este método de preservación causaba alguna alteración de la especializada red colágena meniscal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron seis meniscos externos obtenidos durante artroplastias totales de rodilla de pacientes afectos de genuvaro artrósico. Se evaluó la relativa indemnidad del compartimento femorotibial externo tanto radiográfica como clínicamente durante el acto quirúrgico. La serie correspondía a 4 mujeres y 2 hombres, con una media de edad de 73,1 años (rango: 60-84 años). Cinco rodillas eran izquierdas y la restante derecha. El procesamiento se realizó bajo condiciones estériles y se tomaron muestras para cultivo. Tres meniscos fueron utiliza-

dos como control. Se obtuvo una sección de 1 cm<sup>2</sup> del cuerpo meniscal y se procedió a su fragmentación hasta obtener piezas de 1 mm<sup>3</sup>, incluyéndolas seguidamente en una solución de glutaraldehído al 2%, dentro de los 15 minutos posteriores a su extracción de la rodilla del paciente. Los otros tres meniscos fueron inmediatamente congelados a -80 °C durante 7 días. Posteriormente, se procedió a su descongelación, mediante inmersión en solución fisiológica a 36 °C, e inclusión en glutaraldehído al 2%, tal como se había realizado con los meniscos del grupo control (**Figura 1**).

El análisis de los resultados fue realizado a doble ciego, tanto por parte del patólogo como más tarde por parte del cirujano ortopédico. Para evaluar las correspondientes secciones se midieron y promediaron 300 fibras longitudinales y 100 transversales de cada menisco, en secciones fotográficas con escala x 19.000. Dado que no existía literatura previa, se ideó una clasificación de las secciones atendiendo a: la periodicidad del colágeno, el grado de disrupción, la pérdida de la disposición en bandas y la existencia de edema intrafibrilar. La escala de gradación variaba desde el grado 1, donde la ultraestructura no evidenciaba cambios patológicos (normal), hasta el grado 3, donde se objetivaba una severa alteración (**Figura 2**).

## RESULTADOS

Las muestras correspondientes a uno de los meniscos usados como control debieron descartarse por errores técnicos en su preparación que dificultaron su interpretación.



Figura 1. Etapas de la preparación del menisco hasta su inclusión en solución de glutaraldehído al 2%.

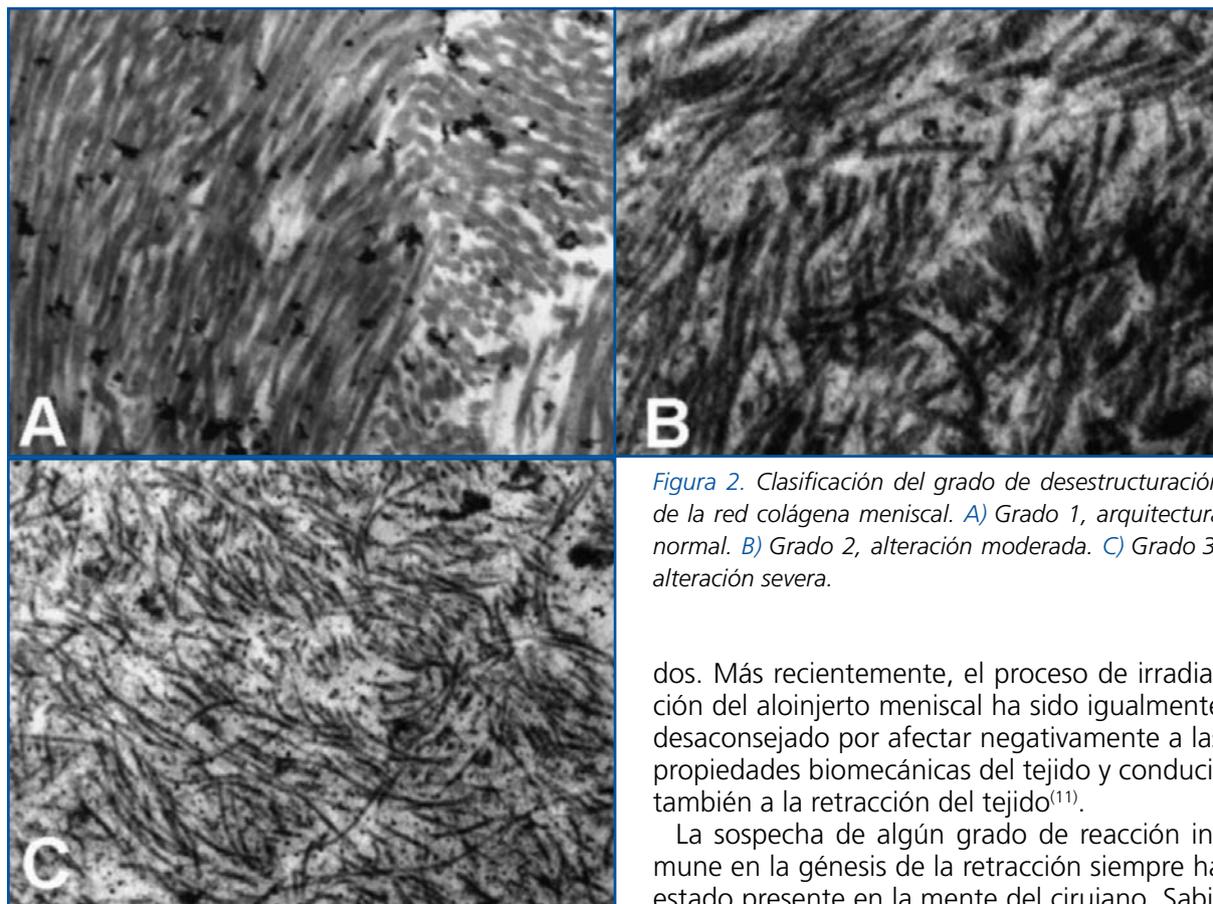


Figura 2. Clasificación del grado de desestructuración de la red colágena meniscal. A) Grado 1, arquitectura normal. B) Grado 2, alteración moderada. C) Grado 3, alteración severa.

Las fibras colágenas de los meniscos previamente congelados (grupo experimental) mostraron un diámetro promedio en cortes longitudinales de 12,78 nm, mientras que en las secciones transversales promediaban 14,78 nm.

Las fibras de los controles promediaban 14,53 nm en las secciones longitudinales y 17,67 nm en las transversales.

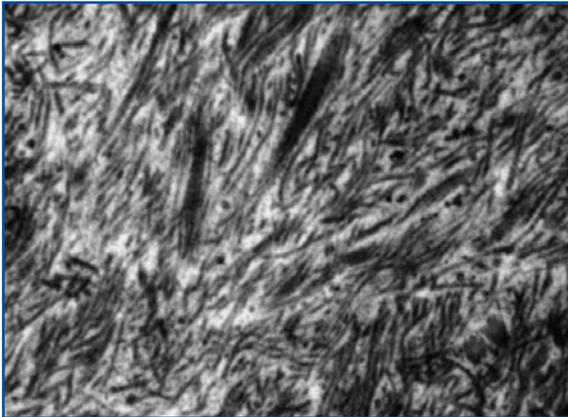
Las muestras de los tres meniscos congelados fueron clasificadas como 1, 3 y 3 (Figura 3), en tanto que las del grupo control fueron clasificadas como grado 2 (Figura 4).

## DISCUSIÓN

Poco se puede encontrar en la bibliografía sobre las causas que puedan predisponer a la retracción o encogimiento del menisco trasplantado. Uno de los primeros en alertar sobre el tema de la retracción meniscal fue el grupo de Wirth<sup>(9)</sup>, que la observó en el seguimiento de su primera serie de aloinjertos liofiliza-

dos. Más recientemente, el proceso de irradiación del aloinjerto meniscal ha sido igualmente desaconsejado por afectar negativamente a las propiedades biomecánicas del tejido y conducir también a la retracción del tejido<sup>(11)</sup>.

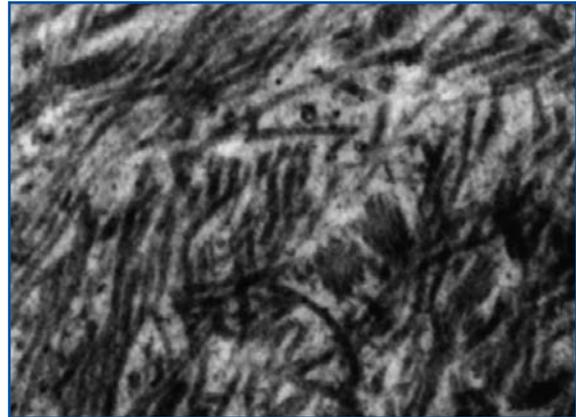
La sospecha de algún grado de reacción inmune en la génesis de la retracción siempre ha estado presente en la mente del cirujano. Sabido es que el menisco no presenta células que expresen el sistema HLA tipo II en superficie. Sin embargo, al realizar el trasplante, la sinovial que indefectiblemente acompaña al menisco incluye sus sinoviocitos y algunas células endoteliales que sí tienen estos antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad. Rodeo *et al.*<sup>(5)</sup> sugieren que, si bien no se evidencian las típicas reacciones tisulares de un rechazo inmunológico, sí se percibe una reacción de grado moderado, similar a la observada en las sinovitis crónicas. Los fenómenos inflamatorios locales vinculados a esta reacción inmune podrían ser la explicación, al menos parcial, de las retracciones meniscales observadas en muchas series. La presencia de rechazo inmunológico también fue apoyada por Khoury *et al.*<sup>(12)</sup>, quienes afirmaban que si bien la presencia del complejo HLA II y antígenos del grupo ABO es debida a sinoviocitos y células endoteliales muertas, hecho este que disminuye su potencial antigénico, éste no puede ser neutralizado por completo. Por el contrario, otros autores, como Wada *et al.*<sup>(13)</sup>, afirman que en sus casos no se objetivó reacción inmune alguna.



*Figura 3.* Sección de un menisco previamente congelado, clasificado como grado 3. Se observa la falta de paralelismo y el aumento del espacio interfibrilar. El diámetro de las fibras es menor que el observado en los controles.

Por otro lado, hay autores que preconizan que la etiología de la retracción podría estar relacionada con un cierto grado de déficit nutricional y éste podría estar condicionado por una alteración en la red colágena meniscal. Se conoce que el menisco es en su mayor parte avascular y que su zona interna se enriquece por difusión de los nutrientes, desde los sectores más superficiales, a través de los poros de colágeno<sup>(2,6,14,15)</sup>. Ochi *et al.* estudiaron el efecto de la inmovilización en la malla colágena meniscal<sup>(6)</sup>, sugiriendo que un aumento en el tamaño de los espacios interfibrilares conlleva a un descenso en la permeabilidad del tejido. En la presente serie, este distanciamiento interfibrilar ha podido ser observado en los meniscos que habían sido congelados previamente a su análisis. Arnoczky *et al.* estudiaron en un modelo canino<sup>(2)</sup> la repoblación celular de meniscos trasplantados que habían sido previamente congelados, con ayuda de nitrógeno líquido, hasta  $-80^{\circ}\text{C}$  en el lapso de 1 minuto (*deep frozen*). Los autores observaron que a los 6 meses de evolución la parte central del menisco permanecía acelular especulando que este hecho, entre otras causas, podría deberse a la dificultad de los nutrientes para difundir hasta las capas más profundas.

El proceso de congelación rápida a  $-80^{\circ}\text{C}$  es uno de los métodos más utilizados en Europa para conservar los meniscos hasta su utilización clínica. Por el contrario, en los Estados Unidos la criopreservación se encuentra más extendida. Ésta podría ser la causa de la falta de



*Figura 4.* Sección de un menisco usado como control clasificado como grado 2.

trabajos en la bibliografía sobre el efecto del congelamiento simple en la ultraestructura del menisco, mientras que sí se han documentado los efectos de la criopreservación<sup>(2,7)</sup>. Shibuya *et al.*<sup>(7)</sup> estudian el efecto de la criopreservación y concluyen que posiblemente el dimetil sulfóxido (DMSO), usado como anticongelante, no difunde completamente y, como consecuencia, el proceso de congelación destruye la celularidad profunda y provoca una alteración de la malla colágena, con edema y rotura de fibrillas y alteraciones en su diámetro.

En la bibliografía no existe ningún sistema de valoración del estado ultraestructural del menisco. Una escala de gradación histológica, como la sugerida en el presente trabajo, podría ser de utilidad para la valoración del estado meniscal en determinadas situaciones clínicas.

La limitación fundamental del presente estudio es su reducido tamaño muestral, por lo que un mayor número de meniscos es necesario para establecer significado estadístico de estos hallazgos preliminares.

## CONCLUSIONES

Las fibras colágenas de los meniscos congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  presentan un menor diámetro y un mayor grado de desestructuración en comparación con los meniscos usados como controles. Esta observación sugiere que el proceso de congelación altera la ultraestructura colágena del menisco. Este hecho podría contribuir a explicar el frecuente fenómeno de retracción observado en numerosos meniscos trasplantados.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Rijk PC, Van Noorden CJ. Structural Analysis of meniscal allograft after immediate and delayed transplantation in rabbits. *Arthroscopy* 2002; 18: 995-1001.
- 2 Arnoczky SP, Dicarlo EF, O'Brien SJ, Warren RF. Cellular repopulation of deep-frozen meniscal autografts: an experimental study in the dog. *Arthroscopy* 1992; 8: 428-36.
- 3 Mikic ZD, Brankov MZ, Tubic MV, Lazetic AB. Allograft meniscus transplantation in the dog. *Acta Orthop Scand* 1993; 64 (3): 329-32.
- 4 Kelly BT, Potter HG, Deng X, Pearle AD, Turner AS, Warren SF, Rodeo SA. Meniscal allograft transplantation in the sheep knee. Evaluation of the chondroprotective effects. *Am J Sport Med* 2006; 34 (9): 1464-77.
- 5 Rodeo SA, Seneviratne A, Suzuki K, Felker K, Wickiewicz TL, Warren RF. Histological analysis of human meniscal allografts, a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82-A: 1071-82.
- 6 Ochi M, Kanda T, Sumen Y, Ikuta Y. Changes in the permeability and histologic findings of rabbit menisci after immobilization. Changes in the permeability and histologic findings of rabbit menisci after immobilization. *Clin Orthop Relat Res* 1997; 334: 305-15.
- 7 Shibuya S. Meniscus transplantation using a cryopreserved allograft. Histological and ultrastructural study of the transplanted meniscus. *J Orthop Sci* 1999; 4: 135-41.
- 8 Arnoczky SP, McDevitt CA, Schmidt MB, Mow VC, Warren RF. The effect of cryopreservation on canine menisci: a biochemical, morphologic, and biomechanical evaluation. *J Orthop Res* 1988; 6: 1-12.
- 9 Milachowski KA, Weismeier K, Wirth CJ. Homologous meniscus transplantation. Experimental and clinical results. *Int Orthop* 1989; 13: 1-11.
- 10 Jackson DW, Weland J, Simon TM. Cell survival after transplantation of fresh meniscal allografts. DNA proof analysis in a goat model. *Am J Sports Med* 1993; 21: 540-50.
- 11 Noyes FR, Barber-Westin SD. Irradiated meniscus allografts in the human knee. *Orthop Trans* 1995; 19: 417.
- 12 Khoury MA, Goldberg VM, Stevenson S. Demonstration of HLA and ABH antigens in fresh and frozen human menisci by immunohistochemistry. *J Orthop Res* 1994; 12: 751-7.
- 13 Wada Y, Amiel M, Harwood F, Moriya H, Amiel D. Architectural remodeling in deep frozen meniscal allografts after total meniscectomy. *Arthroscopy* 1998; 14: 250-7.
- 14 Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 1982; 10: 90-5.
- 15 Gershuni DH, Hargens AR, Danzig LA. Regional nutrition and cellularity of the meniscus. Implications for tear and repair. *Sports Med* 1988; 5: 322-7.