

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

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIRURGIA I ESPECIALITATS QUIRÚRGIQUES

TESI DOCTORAL

**“Estudi amb microscopi electrònic de rastreig
ambiental de la morfologia de la superfície
articular d’empelts osteocondrals. Valoració de
dos mètodes de criopreservació”**

Per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia

Sergi Sastre i Solsona

Directors: Prof. Santiago Suso i Vergara
Dr. Josep M. Segur i Vilalta

Barcelona, 2005

Els Doctors SANTIAGO SUSO I VERGARA , I JOSEP M. SEGUR I VILALTA,

INFORMEN que la Tesi Doctoral que presenta SERGI SASTRE I SOLSONA, titulada “ESTUDI AMB MICROSCOPI ELECTRÒNIC DE RASTREIG AMBIENTAL DE LA MORFOLOGIA DE LA SUPERFÍCIE ARTICULAR D’EMPELTS OSTEOCONDRAIS. VALORACIÓ DE DOS MÈTODES DE CRIOPRESERVACIÓ”, realitzada sota la nostra direcció, té les exigències metodològiques i científiques per ser presentada al Tribunal legalment constituït.

Prof. S. Suso i Vergara

Dr. JM. Segur i Vilalta

Barcelona, Juny 2005

A l'Elena,
els meus pares
i el meu germà.

"L'important és no deixar de fer-se preguntes"

"La majoria de les idees fonamentals de la ciència són essencialment senzilles i per regla general poden ser expressades en un llenguatge comprensible per a tots"

"S'ha de fer tot tant senzill com sigui possible, però no més senzill"

Albert Einstein

AGRAÏMENTS

Als meus pares, per tot el que han fet per mi i tot el que m'han donat, gràcies a ells he pogut arribat fins aquí.

A l'Elena, per la seva paciència, sacrifici i amor durant tots aquest anys, per haver estat allà en els moments més difícils. Per totes les bones experiències viscudes i les moltes que ens falten per viure.

Al Prof. Santiago Suso, Cap de l'Institut Clínic d'Especialitats Mèdiques i Quirúrgiques, Cap de Servei de Cirurgia Ortopèdica i Traumatologia de l'Hospital Clínic i Director del Banc de Teixits de l'Aparell Locomotor, per totes les millories aconseguides al Servei des de que vaig començar la residència i per les fites que encara resten per aconseguir, gràcies per la seva confiança dipositada en mi com a membre del Servei de COT i per la direcció d'aquesta Tesi.

Al Dr. Josep M^a Segur, al Josep M^a, membre de la Unitat de Genoll de l'Hospital Clínic i codirector del Banc de Teixits de l'Aparell Locomotor, per tot el que m'ha ensenyat aquests anys, tant dins com fora de l'àmbit de la medicina, gràcies a la seva ajuda i perseverança ha estat possible aquest treball.

A l'Elba Agustí, biòloga de la Trasplant Services Foundation (TSF) per la seva ajuda en el processament i criopreservació de les mostres per poder realitzar aquesta tesi.

A tot l'equip de Microscopia Electrònica de Rastreig Ambiental, del Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica (CREB) de la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), per les hores passades davant del microscopi i tot el treball realitzat.

Al Sergi Sanz, del Departament de Bioestadística de l'Hospital Clínic, pel seu esforç i per les seves orientacions per poder realitzar el disseny i l'anàlisi estadística d'aquest treball.

A la Trasplant Services Foundation (TSF) per la beca concedida sense la qual no hagués estat possible la realització d'aquesta tesi.

Al Dr. Sebastià Ramiro, al Sebas, per la seva dedicació amb tots els residents; per ensenyar-nos a mantenir la vocació que ens ha fet escollir aquesta professió i el tracte amb el pacient, difícil de sostenir en determinats moments.

A tota la resta dels membres del Servei de Cirurgia Ortopèdica i Traumatologia, per tot el que m'han ensenyat sobre la nostra especialitat durant aquests llargs anys de residència, els Drs. Andreu Combalía, per tots els treballs realitzats; Lluís Peidro, Àngel Ferreres, Pep Riba, Xavi Gallart, Quim Forés, Josep M^a Arandes, Salvi Prat, Salvador Fuster i Pablo Fernández de Retana.

A tots els altres membres de la Unitat de Genoll de l'Hospital Clínic, pel seu acolliment i ensenyaments en aquesta nova etapa que hem començat, els Drs. Francesc Maculé, Carles Vilalta, Pere Torner, Joan Carles Martínez i Lluís Lozano.

A tots els residents amb qui hem coincidit durant el període de formació, per la seva amistat i els bons moments passats: Guillermo, M^aJosé, Lázaro, Pilar, Pedro Ignacio, Joan Carles, Jordi, Anna, Jenaro, Pere, Sandra, Dani, Alexandre, Guillem, Dragos, Raül i Josep.

Al Dr. Ignasi Claret, l'Ignasi, per la seva amistat, confiança, paciència i per totes les seves ensenyances durant aquests últims anys, i per tot el camí que resta per recórrer.

Al Dr. Carbonell, pel seu meticolós treball a l'iniciar aquesta línia d'investigació que m'ha permès realitzar aquesta tesi.

A tota la resta de metges amb els que hem compartit aquells difícils moments i les llargues hores de les guàrdies, els Drs. Emili González, Xavi Alemany, Mario Bueno, Pep Roca, Adrià Serra, Conxi Castro, Anna Garcia, Llorenç Mateo i Anna Carreño, també pel seu acolliment durant l'etapa al Taulí.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ

A.-CARTÍLAG

1.- Estructura i funció del cartílag articular.....	14
1.1- Els condrocits.....	15
1.2- La matriu extracel·lular.....	16
1.2.a.- Col·lagen.....	17
1.2.b.- Proteoglicans.....	17
1.2.c.- Proteïnes no col·làgenes.....	18
1.3.- Regions del cartílag articular.....	18
1.3.a.- Zona superficial.....	20
1.3.b.- Zona transicional.....	22
1.3.c.- Zona medial.....	22
1.3.d.- Zona calcificada.....	22
1.4.- Regions de la matriu extracel·lular.....	23
1.4.a.- Regió pericel·lular.....	23
1.4.b.- Regió territorial.....	24
1.4.c.- Regió Interterritorial.....	24
1.5.- Interaccions entre condrocits i matriu.....	24
2.- Reparació fisiològica del cartílag.....	26
2.1.- Factors vinculants a l'anatomia del cartílag articular.....	26
2.2.- Factors vinculants als condrocits.....	28
2.3.- Factors vinculants a la matriu extracel·lular.....	28
3.- Resposta del cartílag articular a les lesions mecàniques.....	28
4.- Història natural de les lesions del cartílag articular.....	30
5.- Diagnòstic de les lesions condrials.....	31
6.- Classificació de les lesions condrials.....	33
7.- Prevalença i incidència de les lesions condrials.....	35
8.- Tractament de les lesions condrials.....	35
8.1.- Tamany de la lesió.....	36
8.2.- Localització de la lesió.....	36
8.3.- Alineació dels components articulars.....	36
8.4.- Lesions concomitants.....	37
9.- Alternatives quirúrgiques per a reparar lesions del cartílag articular.....	37

ÍNDEX

9.1.- Desbridament artroscòpic.....	37
9.2.- Perforacions subcondrals i microfractures.....	37
9.3.- Autoempelts osteocondrals.....	38
9.4.- Implant condrocits autòlegs cultivats.....	39
9.5.- Noves expectatives.....	41
9.5.a.- Matrius per a la reparació de cartílag.....	41
9.5.b.- Implants d'autoempelts osteocondrals.....	41
B.- CRIOPRESERVACIÓ	
1.- Introducció.....	43
2.- Història.....	45
2.1.- Criopreservació de teixit cartilaginós.....	46
3.- Principis de la criopreservació.....	49
3.1.- Efectes directes de la disminució de la temperatura.....	49
3.2.- Efectes indirectes de la disminució de la temperatura.....	51
3.3.- Sobrefredament.....	52
3.4.- Inducció de la formació de gel (seeding).....	52
4.- Característiques els factors de la criopreservació.....	53
4.1.- L'agent refrigerant o criogen.....	53
4.2.- L'agent crioprotector.....	54
4.3.- Solucions crioprotectors.....	57
4.4.- Altres soluts afegits al medi de congelació.....	58
4.4.- Agents antimicrobians.....	59
5.- Viabilitat postcriopreservació.....	59
6.- Importància de la superfície de l'empelt osteocondral.....	63
7.- Escales per l'estudi de la morfologia de superfície.....	63
C.- MICROSCOPIA ELECTRÒNICA	
1.- Microscopi electrònic de rastreig convencional.....	66
2.- Microscopi electrònic de rastreig ambiental.....	67
<u>OBJECTIUS I HIPÒTESI</u>	68

MATERIAL I MÈTODES

1.- Model animal.....	73
2.- Disseny de l'experiment.....	75
3.- Càlcul del tamany de la mostra.....	75
3.1.- Estudi d'imatges.....	76
4.- Protocol d'eutanàsia.....	77
5.- Tècnica de dissecció.....	79
6.- Preservació dels empelts.....	81
6.1.- Empelt osteocondral en estat fresc (grup control).....	82
6.2.- Empelt osteocondral criopreservat	83
6.2.a.- Empelt criopreservat amb RPMI sense L-glutamina (grup 1).....	86
6.2.b.- Empelt criopreservat amb Krebs-Henseleit modificat (grup 2).....	89
7.- Descongelació empelt criopreservat.....	89
8.- Microscopia electrònica de rastreig ambiental de la superfície del cartílag.....	91
8.1.- Classificació de la superfície cartilaginosa.....	93
8.2.- Confiabilitat, valides i variabilitat del sistema de classificació.....	94
9.- Sistema de classificació de la superfície empelts osteocondrals	
9.1.- Rellu de la superfície.....	99
9.2.- Fenedures.....	100
9.3.- Llacunes.....	100

RESULTATS

1.- Imatges en estat fresc i criopreservades amb RPMI i amb Krebs-Henseleit modificat.....	103
2.- Avaluació i comparació de la superfície articular dels empelts.....	119

DISCUSSIÓ

A.- MATERIAL I MÈTODES

ÍNDEX

1.- Model animal.....	130
2.- Disseny de l'experiment.....	130
2.1.- Principi de replicació.....	131
2.2.- Principi d'aleatorització.....	131
2.3.- Principi de control local.....	132
3.- Càlcul del tamany de la mostra.....	132
4.- Protocol d'eutanàsia.....	133
5.- Tècnica de dissecció.....	133
6.- Preservació dels empelts.....	134
6.1.- Empelt osteocondral en estat fresc (grup control).....	134
6.2.- Empelt osteocondral criopreservat.....	134
6.2.a.- Empelt criopreservat amb RPMI sense L-glutamina (grup 1).....	134
6.2.b.- Empelt criopreservat amb Krebs-Henseleit modificat (grup 2).....	135
7.- Corbes de congelació i reescalfament dels empelts criopreservats.....	136
8.- Obtenció de mostres.....	139
9.- Microscopia electrònica de rastreig ambiental de la superfície del cartílag.....	139
10.- Comparació entre els grups a estudi	146
<u>B.-RESULTATS</u>	
1.- Imatges en estat fresc i criopreservades amb RPMI i amb Krebs-Henseleit modificat.....	147
2.- Avaluació i comparació de la superfície articular dels empelts.....	153
<u>CONCLUSIONS</u>	158
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	161