

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

---

# **MATERIAL I MÈTODES**

Un cop obtingut el consentiment informat per escrit del Comitè d'Ètica en Experimentació animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona, es va iniciar el projecte d'investigació que es descriu a continuació.

### **1-EL MODEL ANIMAL**

Per a realitzar aquest estudi es va escollir com a model animal al conill (*Oryctolagus cuniculus*) albi New Zealand, femella, adulta (de 10 a 12 mesos d'edat), amb un pes mig aproximat de 3,5 kg (fig. 18). El número de conills de cada mostra es determinà per un càlcul estadístic que es precisarà més endavant.

La raça de conill New Zealand fou constituïda inicialment a l'any 1977 a base d'encreuaments realitzats a partir de reproductors procedents de les races Gunter Bildtein i M. Dumont d'Alemanya i França respectivament.

La vida mitjana està establerta en uns 7 anys quan està en llibertat i en 3 anys quan roman en règim d'estabulari. El conill pesa al néixer de 100 a 120 grams, iniciant-se el deslletament als 35-50 dies, moment en el qual presenta un pes de 800 a 900 grams. Assoleix la seva maduresa sexual als 4-5 mesos, presentant un pes, en aquest moment, de 2'5 a 4 kilograms.



Fig.18. Conill New Zealand femella de 3,5 kg.

Es va preferir l'ús d'aquests animals donada la facilitat d'adquisició, manipulació, manteniment i fonamentalment pel fet que diversos grups d'investigació internacionals acostumen a utilitzar aquest model en els seus projectes, amb la qual cosa es facilitarà la comparació de resultats i l'ús posterior de la informació generada per a estudis futurs. Per altra part, es va posar cura en la selecció de la edat de l'animal a fi de garantir que el procés de creixement, amb la conseqüent degeneració de les articulacions de l'animal, no alteri les variables que es desitgen estudiar.

Per tal de no introduir variables que puguin alterar l'estudi, els animals utilitzats van ser emprats només per aquest estudi, sent sacrificats posteriorment per tal d'estudiar els objectius del present treball.

Les restes d'animals i d'altres residus produïts per aquest treball no són considerats perillosos per a la salut o el medi ambient i la seva eliminació va quedar a càrrec del servei de recollida d'animals de l'ajuntament de Barcelona mitjançant l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

### **2.-DISSENY DE L'EXPERIMENT**

El present és un treball d'investigació de tipus experimental, longitudinal i prospectiu, en el disseny del qual s'han tingut en compte els tres principis bàsics que Hinkelmann i Kempthorne <sup>59</sup> van establir per a millorar la validesa de l'anàlisi estadístic i incrementar la sensibilitat de qualsevol experiment. Aquests principis son: 1º Principi de replicació, 2º Principi de l'aleatorització 3º Principi del control local o bloqueig. Aquests principis seran tractats amb profunditat en la discussió de l'estudi.

### **3.-EL CÀLCUL DEL TAMANY DE LA MOSTRA.**

Basant-nos en els plantejaments de Bailey <sup>5</sup>, Weakley <sup>127</sup>, Williams <sup>129</sup> amb respecte a animals d'estudi per microscopia electrònica, es van crear tres grups d'estudi. Un grup per a l'estudi de empelts en estat fresc, un altre pels empelts en criopreservats amb RPMI i un altre pels empelts criopreservats amb K-H modificat.

### 3.1.-ESTUDI D'IMATGES

Bailey <sup>5</sup>, Weakley <sup>127</sup>, Williams <sup>129</sup>, expliquen que els investigadors en microscopia electrònica prefereixen crear grups de comparació compostos de 4 a 6 animals per a obtenir resultats estadísticament vàlids, ja que la validesa estadística en aquest cas ve donada pel nombre de fotografies obtingudes pel microscopi electrònic a partir d'àrees seleccionades aleatòriament, al menor augment possible, seguint un criteri microgràfic no esbiaixat (per exemple una foto cada 3 camps, una foto en cada cantonada dreta per camp, o altres).

Dins de tots els elements a considerar en el càlcul del tamany de la mostra en un estudi on s'emprin animals d'experimentació, la variabilitat de la població estimada i la mínima diferència entre mesures que es volen detectar són les que més influeixen en la reducció del sofriment del animals d'experimentació. El principi bàsic consisteix en portar a terme experiments amb el menor nombre possible d'animals, però mantenint la probabilitat de detectar diferències significatives dintre d'uns límits admissibles.

Es va utilitzar la fórmula de Jakstys <sup>64</sup> pel càlcul del nombre mínim de fotografies per a resultats estadísticament vàlids:

$$(5 \text{ animals per grup}) \times (1 \text{ bloc de teixit per animal}) \times (20 \text{ fotografies per bloc}) =$$

$$100 \text{ fotografies per bloc}$$

Aquesta fórmula demostra que una mostra limitada a 1 bloc de teixit pot convertir-se en una font d'un gran nombre de microfotografies, el total de la qual augmenta en relació al nombre de grups que participen en l'estudi.

Degut a que l'estudi concebia la presència de tres grups, la quantitat total de fotografies seria 300.

Amb la finalitat de construir una progressió d'imatges, es van prendre cent fotografies a 250 augments de les superfícies articulars de cada un dels grups d'experimentació. Altres augments compresos entre 250 x i 1500 x foren emprats en fotografies addicionals per a precisar detalls.

#### **4.- PROTOCOL D'EUTANÀSIA**

Degut a que es volia aïllar els dos genolls de cada conill en peces anatòmiques individuals, quedant així el conill sense les seves extremitats, es va optar per practicar l'eutanàsia a l'animal en iniciar els procediments experimentals.

Prèviament se li va practicar un examen físic articular a l'animal per tal d'assegurar l'absència de patologies pròpies de la raça que poguessin interferir amb els objectius que es desitjaven aconseguir.

Els animals van ser eutanitzats mitjançant administració intravenosa de Pentobarbital sòdic, en dosis de 100 mg per kg de pes en bolus (fig. 19).

Aquest fàrmac ha de ser diluït a concentracions menors del 5%, ja que pel contrari precipita i es requeriria alcalinitzar més el medi, amb el que es faria més irritatiu i dolorós per l'animal. Per reduir al màxim les molèsties de la injecció en la vena auricular marginal es va aplicar crema de lidocaïna al 25% tòpicament a l'àrea de la venoclisi.

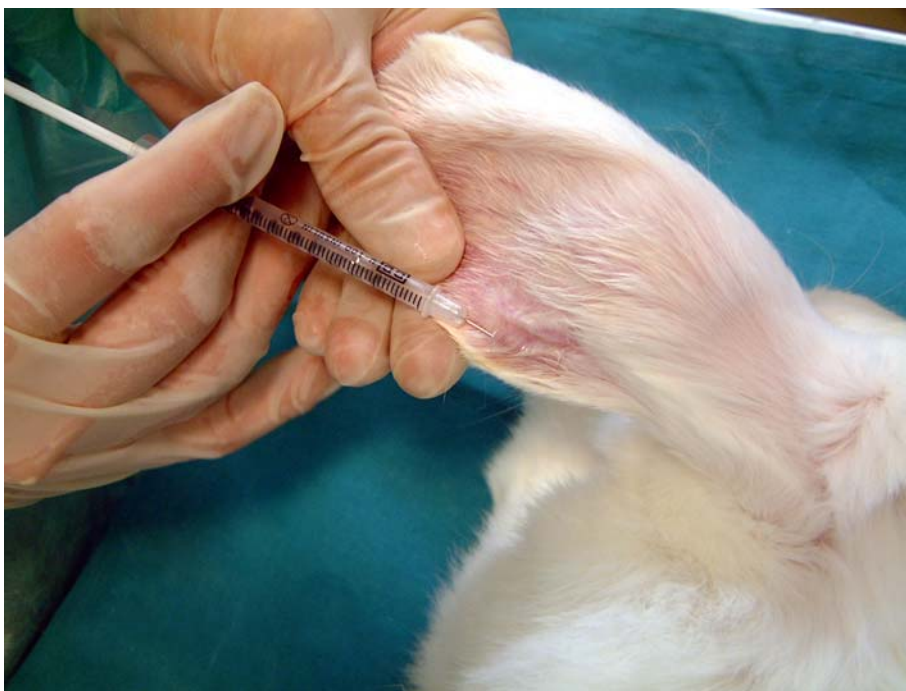


Fig. 19. Injecció de l'agent eutanitzant a l'orella de l'animal d'experimentació.

La Comissió Europea considera que aquest és un mètode altament recomanat per eutanitzar conills, per ser molt ètic, ràpid, efectiu, de cap perill per l'operador, encara que es requereixi un entrenament previ per aplicar-lo, i així consta en el document preparat per ser usat amb Directiva 86/609/EEC del 24 de novembre de 1986, sobre l'aproximació de les lleis, regulacions i provisions administratives dels Estats membres en tot allò referent a la protecció d'animals usats per a propòsits experimentals i altres propòsits. (No L 358, ISSN 0378-6978).

Per reconèixer i confirmar la mort de l'animal es va comprovar l'aturada de la respiració i el batec cardíac per palpació i auscultació amb fonendoscopi, així com l'absència de reflexos.



### **5.-TÈCNICA DE DISECCIÓ**

Els mitjans d'instrumentació emprats inclouen equip de cirurgia menor, a més de materials estèrils de rebuig (fig. 20).



Fig.20. Material de dissecció utilitzat en condicions estèrils.

Es va disposar el cos de l'animal en posició de decúbit supí sobre un camp estèril. Se li va practicar l'accés per via central amb dissecció progressiva de plans cutanis, fàscia, i músculs i exposició d'elements ossis. Seguidament se'ls va extreure ambdós genolls per osteotomia del fèmur proximal i de tibia distal (fig. 21-23).



Fig. 21. Camp quirúrgic preparat en condicions estèrils

Es va practicar l'obertura lateral de la càpsula articular del genoll. Aquest últim procediment es va realitzar per aconseguir una temperatura més homogènia en les capes més superficials del cartílag en relació amb l'exterior de l'articulació, i a la vegada permetre el millor flux de solucions criopreservants en els casos corresponents.



Fig. 22. Accés quirúrgic central sobre el genoll del conill.

## **6.- PRESERVACIÓ DELS EMPELTS OSTEOCONDRAIS**

En concordança amb els objectius de l'estudi, es van crear tres grups d'empelts osteocondrals que es diferenciarien en el tipus de preservació: un grup en estat fresc (G.1) i els altres dos en criopreservació (G.2 i G.3). Cada grup d'empelts estaria compost per genolls drets o esquerres en nombre total de cinc .



Fig. 23. Peça ja dissecada i extreta preparada per criopreservar.

#### **6.1.- EMPELT OSTEOCONDRALE EN ESTAT FRESC (GRUP CONTROL).**

Un cop aïllats els genolls de conills que formaven part del primer grup, van ser submergides en solució estèril de NaCl al 0.9% a temperatura ambient i mantingudes en aquest estat fins el seu trasllat immediat al Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica (conegut com a CREB) de la UPC on es trobava el microscopi electrònic per examinar-los.

## 6.2.-EMPELT OSTEOCONDRALE CRIOPRESERVAT

L'empelt osteocondral destinat a criopreservació es va disposar en solució RPMI sense L-Glutamina a 4°C pel trasllat al laboratori de criopreservació, a les instal·lacions del Departament de Recerca de la Trasplant Services Foundation (TSF) durant el menor temps possible fins tenir disponibilitat de processament, no arribant a superar més de dues hores des de l'eutanàsia de l'animal (fig. 24).



Fig. 24. Mostra en l'interior de la solució RPMI per traslladar al laboratori de criopreservació

El personal de laboratori equipat amb gorro i mascareta va practicar un rentat minuciós de mans i va treballar en una càmera de flux laminar desinfectada en la qual es va estendre un camp estèril. Seguidament es van extreure les peces anatòmiques, es van introduir en bosses de plàstic estèrils de criopreservació (Baxter-Cryocite<sup>®</sup> 750 ml) a una peça per bossa amb solució crioprotectora corresponent (fig. 25). Es van extreure amb

una xeringa les bombolles d'aire que van quedar a la bossa i es va rotular amb el nombre corresponent a cada empelt (fig. 26).

Després les bosses (fig. 27) es van guardar en una nevera a 4°C durant 30 minuts, i d'aquí van passar a una càmera de congelació programable (Cryoson®) aconseguint un descens de la temperatura de 1°C / minut fins arribar a -60°C, després a 3-4°C / minut fins els -100°C. Aquest procés dura aproximadament uns 80 minuts i permet regular el pas progressiu de l'agent crioprotector en la cèl·lula i teixit intercel·lular i a la vegada disminueix la probabilitat de generar grans cristalls de gel en el teixit.<sup>56</sup>

A continuació les bosses passen a les cubes de nitrogen líquid on estaran a -196°C durant el temps estimat de conservació estipulat en aquest estudi que va ser de 15 dies.



Fig. 25. Introducció de les peces d'estudi en bosses especials per criopreservació





Fig. 26. Extracció de les bombolles d'aire de la mostra.

El subministre de nitrogen líquid i el control de la temperatura es van garantir mitjançant una unitat informatitzada d'abastiment automàtic amb registre d'incidències.



Fig. 27. Mostra ja processada i preparada per iniciar el procés de criopreservació

#### 6.2.A.-SOLUCIÓ CRIOPROTECTORA RPMI SENSE L-GLUTAMINA (GRUP 1)

La solució crioprotectora estava composta per:

90 ml solució RPMI sense L-Glutamina

10 ml solució d'albumina humana al 20%

5 ml solució de dimetilsulfòxid (DMSO) al 100%

Es solen utilitzar mescles d'agents crioprotectors creant així les solucions crioprotectors que tenen l'avantatge de que la concentració total de solut és incrementada en la mostra sense augmentar excessivament la concentració de qualsevol agent crioprotector.



### Solució RPMI sense L-Glutamina

La solució RPMI va ser formulada originalment per cultius cel·lulars en l'institut memorial Parc Roswell (Roswell Park Memorial Institute, RPMI). En el nostre protocol es va emprar la solució RPMI sense L-Glutamina, la composició de la qual es troba en la taula 1.

## MATERIAL I MÈTODES

---

Component	Concentració (mg/litre)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1000.0
KCl	4000.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1000.0
NaCl	60000.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15120.0
Glucosa	20000.0
Rojo Fenol	50.0
L-Arginina	2000.0
L-Asparagina	500.0
L-Àcido Aspàrtic	200.0
L-Cisteina	500.0
L-Àcido Glutàmic	200.0
Glutation (Reduït)	10.0
Glicina	100.0
L-Histidina	150.0
L-Hidroxiprolina	200.0
L-Isoleucina	500.0
L-Leucina	500.0
L-Lisina HCl	400.0
L-Metionina	150.0
L_Fenilalanina	150.0
L-Prolina	200.0
L-Serina	300.0
L-Treonina	200.0
L-Triptófano	50.0
L-Tirosina	200.0
L-Valina	200.0
Biotina	2.0
Vitamina B12	0.05
Pantotenat càlcic	2.5
CaCl <sub>2</sub>	-
NaHCO <sub>3</sub>	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	--

Taula 1: Composició de la solució RPMI sense L-Glutamina (Roswell Park Memorial Institute) Biological industries – Beth Haemek, Israel

La solució RPMI sense L-Glutamina es va utilitzar també com a medi de transport a una concentració de 100% des del moment de l'extracció de les peces anatòmiques fins el seu processament amb la solució crioprotectora.

### 6.2.B.-SOLUCIÓ CRIOPROTECTORA KREBS-HENSELEIT MODIFICADA (GRUP 2)

La solució crioprotectora estava composta per :

-Solució Krebs-Henseleit modificada (taula 2)

-12 ml solució de DMSO al 100%

Edta(disódico)	0,03 mM
NaCl	118 mM
KCl	4,7 mM
MgSO <sub>4</sub> 7.H <sub>2</sub> O	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub> 2.H <sub>2</sub> O	1,25 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
Glucosa	11 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Sacarosa	0,1 M

Taula 2. Solució K-H modificada

## **7.-DESCONGELACIÓ DE L'EMPELT CRIOPRESERVAT**

Pel descongelament d'aquests empelts osteocondrals es van seguir els següents passos:

1<sup>er</sup>.- Immersió de la bossa amb l'empelt congelat en solució NaCl 0.9% a 40°C aproximadament 3 o 4 minuts al "bany Maria" (fig. 28).

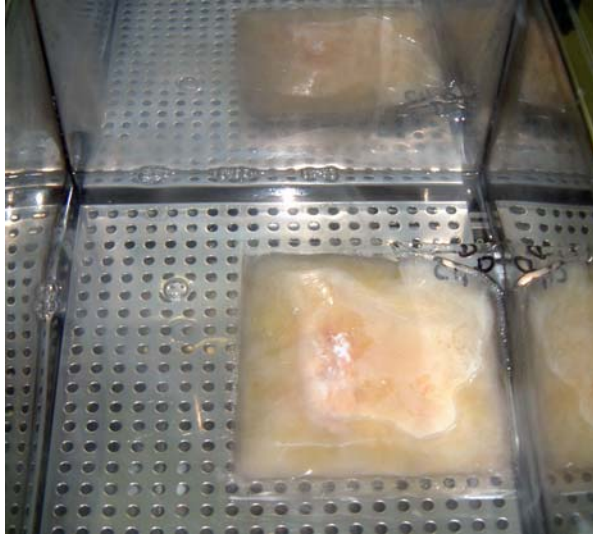


Fig. 28. Procés de descongelació: immersió de la bossa en aigua a 40 °C



Fig. 29. Següent pas de la descongelació. Obertura de la bossa.

2<sup>on</sup>.- Obertura de la bossa i col·locació de l'empelt en solució NaCl 0.9% a 40°C durant aproximadament 3 o 4 minuts (fig. 29).

3<sup>er</sup>.- Col·locació de l'empelt en solució RPMI a 4°C de temperatura ambient fins a la seva conservació i transport.

## **8.-MICROSCOPIA ELECTRÒNICA AMBIENTAL DE RASTREIG DE LA SUPERFÍCIE DEL CARTÍLAG**

Es va prendre una mostra del cartílag hialí d'àrees de càrrega del còndil femoral intern amb una trefina de 5.5 mm de diàmetre i es va sotmetre a un rentat amb ultrasons durant 10 segons per eliminar al màxim restes que es puguin trobar a la superfície. Immediatament cada un dels fragments va ser posat en un pedestal (stub) per al seu estudi amb un microscopi electrònic de rastreig ambiental (ESEM<sup>TM</sup> ElectroScan 2020 ESEM-FEG) a 276'65 °K (3,5 °C), una acceleració de voltatge de 10 KV i 20 KV, a una pressió de càmera de 10 Torr ((fig. 30-31).



Fig. 30. Microscopi electrònic de rastreig ambiental de la UPC (CREB).

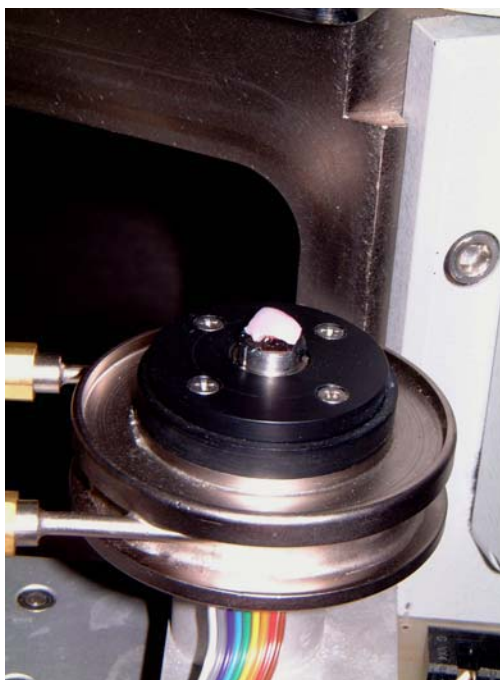


Fig. 31. Detall del MERA amb el pedestal sobre el qual es col·loca la mostra en fresc.

### 8.1.-CLASSIFICACIÓ DE LA SUPERFÍCIE CARTILAGINOSA

En aquest estudi es va utilitzar un sistema de classificació de morfologia de superfície articular dissenyat pel nostre grup,<sup>21, 118</sup> seguint la metodologia de l'estudi de Juvérin (1983) amb les modificacions introduïdes per Hong i Henderson (1996). Les modificacions que es van fer a aquesta escala estan justificades per:

1. És un estudi d'estructures anatòmiques diferents, ja que Juvérin va estudiar la superfície de ròtules de conills New Zealand i Hong i Anderson van utilitzar ròtules de rates albines adultes.
2. El microscopi electrònic utilitzat (MERA) és diferent a l'utilitzat pels autors anteriors, ja que no requereix de mètodes físicoquímics de fixació de mostres ni l'exposició de la mateixa al buit.

Les escales dissenyades per Jurverlin <sup>68</sup>, modificada per Hong, <sup>60</sup> es van crear a partir de mostres de cartílag de ròtula processades per microscopia electrònica de rastreig, per la qual cosa van haver de ser sotmeses a processos físicoquímics que no apliquem en aquest treball.

### 8.2.-CONFIABILITAT, VALIDÉS I VARIABILITAT DEL SISTEMA DE CLASSIFICACIÓ.

Segons Pynsent <sup>101</sup> al desenvolupar un sistema de classificació o instrument de categorització és necessari considerar tres propietats bàsiques que abarquen els tres punts de vista de l'investigador: la confiabilitat, la validesa i la variabilitat.

#### MEDICIÓ DE LA CONFIABILITAT (VARIABILITAT INTRA-OBSERVADOR)

Un instrument o test és fiable quan al administrar-se en repetides ocasions pel mateix observador en un mateix objecte de medició no hi han canvis significatius en els resultats <sup>101</sup> (variabilitat intra-observador).

Per medir la confiabilitat de cada una de les categories es va aplicar en dos oportunitats el sistema de classificació per un mateix observador en cada una de les fotografies obtingudes del grup d'empelts en estat fresc. Aquestes medicions han estat separades per un període de 15 dies per tal de disminuir la incidència d'altres factors aliens al sistema.

Per tal de valorar aquesta propietat es va calcular l'índex Kappa, amb els seus corresponents intervals de confiança a 95 %, desviació estàndard i valoració. Altres índexs calculats serà l'índex de concordança observat (Po) amb els seus intervals de confiança del 95 %, i l'índex de concordança esperat (Pe).



### MEDICIÓ DE LA VALIDESA

Un instrument de mesura o test és vàlid quan la seva estructura comprèn totes les propietats possibles <sup>101</sup>. Per la seva definició podem concloure que és difícil trobar sempre el test o sistema de classificació perfectament vàlid i que la validesa és la propietat més difícil de mesurar en un instrument de classificació.

Per tractar de donar-li al nostre sistema de classificació la major validesa possible, cadascuna de les fotografies va ser sotmés a un escrupolós examen per tal d'abarcàr tots els tòpics o variants en cada categoria.

### MEDICIÓ DE LA VARIABILITAT (VARIABILITAT INTER-OBSERVADOR)

Existeixen diferents formes de mesurar el grau de concordança entre dos observadors que classifiquen una mostra o espècimen. El cas més simple es presenta quan la variable qualitativa és dicotòmica (dues possibilitats). Aquesta situació es pot representar en una taula de freqüències:

		Mètode B		
		Positiu	Negatiu	
Mètode A	Positiu	a	c	f1
	Negatiu	b	d	f2
		c1	c2	n

La mesura més simple de concordança és la proporció de coincidències (Pc) front el nombre total de subjectes:

$$Pc = (a + b) / n$$

Però encara que no existís cap relació entre les observacions dels dos participants existeix sempre la possibilitat que es presenti concordança per atzar.

Amb la finalitat de determinar fins a quin punt la concordança observada és superior a la que s'esperava obtenir per atzar, Cohen (1960) va descriure un índex anomenat "índex de concordança kappa (K)" que està definit de la manera següent:

$$K = (P_o - P_e) / 1 - P_e$$

on  $P_o$  és la proporció de concordança observada (en tant per 1) i  $P_e$  és la proporció de concordança esperada per atzar. En cas d'acord perfecte la proporció de concordança serà 1, pel que "1-  $P_e$ " representa el marge d'acord possible no atribuïble a l'atzar. D'aquest marge nosaltres observem probablement només una part " $P_o - P_e$ ", a menys que existeixi acord perfecte,  $P_o = 1$ .

És així com en cas de concordança perfecta entre els dos observadors el valor de l'índex de concordança kappa és de 1; si la concordança observada és igual a l'esperada, kappa val zero; i si en el cas de que l'acord observat sigui inferior a l'esperat l'índex de kappa és menor que zero.

Per calcular  $P_e$ , la concordança esperada, el raonament és el següent: d'acord amb la taula anterior la probabilitat de que l'observador A classifiqui una determinada superfície del cartílag en una categoria (eventualitat que anomenarem "positiu") podem estimar-la com  $f_1/n$ ; mentre que la corresponent probabilitat de l'observador B l'estimarem com a  $c_1/n$ . Si considerem que existeix independència entre ambdós observadors, la probabilitat de que coincideixin en classificar un determinat espècimen en una categoria de l'escala serà igual al producte d'ambdues probabilitats (successos independents).

Aplicant el mateix raonament calculem la probabilitat de que es produeixi acord entre els observadors en classificar un espècimen en una altra categoria diferent a la que s'estudia (eventualitat que anomenarem "negatiu") Aleshores la probabilitat d'acord en qualsevol de les dues classificacions serà la suma d'ambdós valors, és a dir:

$$Pe = (f1 * C1 + f2 * c2) / n^2$$

Landis i Koch (1977) van publicar uns marges per valorar el grau d'acord de dos observadors en funció de l'índex kappa (K):

Índex Kappa (k)	Grau d'acord o Força de concordança
0.00	Sense acord
0.01-0.2	Insignificant
0.21-0.4	Poca
0.41-0.6	Moderada
0.61-0.8	Bona
0.81-1.0	Molt bona

En el cas de la nostra escala de classificació del cartílag, com no existirà un índex global es determinarà l'índex de concordança kappa específic entre les categories que conformen l'escala, el que equival a convertir el resultat possible en dues úniques respostes: es classifica a l'espècimen en la categoria d'interès (positiu) o es classifica en algunes de les restants (negatiu).

D'aquesta manera per a cadascuna de les categories s'elaborarà una taula 2 x 2 calculant el valor corresponent índex kappa com si es tractés d'una variable dicotòmica.

Posteriorment es valorarà l'índex de concordança kappa de cadascuna de les categories emprant l'escala de Landis i Koch anteriorment descrita.

Comparació entre els grups d'estudi

Per realitzar la comparació entre els grups d'estudi (fresc i criopreservat) a partir de les variables qualitatives del sistema de classificació de la superfície de cartílag s'emprà el test de Chi-quadrat de Pearson, considerant un resultat com a significant si  $p < 0.05$ . Pel seu càlcul s'emprà el software estadístic SPSS en la seva darrera versió, sota assessoria del Departament de Bioestadística i Epidemiologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

### **9.-SISTEMA DE CLASSIFICACIÓ DE LA SUPERFÍCIE ARTICULAR D'EMPELTS OSTEOCONDRAIS**

El sistema de classificació modificat per Carbonell i col. <sup>21, 118</sup>, que es va utilitzar, està compost per tres grans categories que a l'hora agrupen a un total de deu subcategories. Cada categoria és independent, motiu pel qual aquest sistema de classificació engloba en realitat a tres sistemes de classificació d'accidents topogràfics. En una mateixa imatge poden estar presents més d'una subcategoria, en aquest cas l'observador les ha d'enregistrar per separat.

#### **9.1.-Relleu de la superfície**

1. Superfície llisa.
2. Superfície irregular:
  - a) Superfície amb Colines

b) Protuberàncies

9.2.-Fenedures.

3. Superfície sense fenedures.
4. Superfície amb fenedures superficials
5. Superfície amb fenedures profundes

9.3.-Llacunes

6. Sense llacunes
7. Llacunes plenes
8. Llacunes buides

9.1.-RELLEU DE LA SUPERFÍCIE: denominem així la forma que aparentment presenta el fragment de cartílag en la seva superfície (accidents topogràfics de relleu). Aquesta pot ser llisa quan és uniformement plana en la seva extensió i irregular quan presenta relleus amb o sense patró definit.

9.1.a.- SUPERFÍCIE LLISA: Quan la superfície que s'aprecia en la imatge és uniformement plana en extensió.

9.1.b.- SUPERFÍCIE IRREGULAR: quan l'extensió posseeix alguns relleus que poden seguir o no un patró definit. Es distingeixen dos grans tipus de irregularitats: les colines i les protuberàncies, que poden estar presents simultàniament en una mateixa superfície.

9.1.b.1.- Superfície amb COLINES: quan aparenta una superfície ondulada , són imatges que recorden una cordillera de muntanyes.

9.1.b.2.- Superfície amb PROTUBERÀNCIES: quan aparenten abultaments arrodonits amb els marges ben definits.

En ocasions, es possible observar cossos rodons de marges ben definits de color clar que poden no pertànyer a la superfície. En aquest cas és probable que es tracti de petits fragments d'os i cartílag remanents en el procés de tall al prendre la mostra i que no són classificats com a protuberàncies.

9.2.-FENEDURES DE SUPERFÍCIE: anomenem així a imatges lineals que recorden a una esquerda o fractura, la seva presència no defineix irregularitat de superfície.

9.2.a.- SUPERFÍCIE SENSE FENEDURES: no s'observen fractures ni esquerdes, donant la impressió d'indemnitat.

9.2.b.- FENEDURES SUPERFICIALS: quan es veu a la imatge el fons de la mateixa, com si es tractés d'una esquerda poc profunda.

9.2.c.- FENEDURES PROFUNDES: quan no es pot apreciar el fons de l'esquerda.

9.3.-LLACUNES: és l'apreciació en la fotografia d'una superfície que dona la sensació d'un defecte rodó o ovalat, de marges molt ben definits, que poden o no estar ocupades a l'igual que en les fenedures la seva presència no defineix irregularitat de superfície. Els tamanyes poden ser molt variables.

9.3.A.- SUPERFÍCIE SENSE LLACUNES: no s'observen defectes rodons o ovalats, de marges molt ben definits.

9.3.B.- LLACUNES PLENES: una o més estructures rodones, de tamany variable, de marges ben definits, ubicades en la superfície fotografiada ocupats per algun cos.

9.3.C.-LLACUNES BUIDES: una o més estructures rodones, de tamany variable, de marges ben definits, ubicades en la superfície fotografiada i que dona a l'observador la sensació de que es tracti d'un forat no ocupat, o al menys d'on no és possible diferenciar si està ocupada o no per algun cos. Els seus tamany són molt variables.