

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

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ DE MATERIAL I MÈTODES

1.-EL MODEL ANIMAL

Es va escollir el model albí New Zealand per ser un animal d'ús freqüent en els estudis sobre el cartílag ^{41, 48, 55, 132}, per la seva docilitat, tamany i facilitat en el maneig. Va haver-hi cura en la selecció de l'edat de l'animal (entre 10-12 mesos) per a que el procés de creixement no interfereixi amb les variables que es volen estudiar.

2.-EL DISSENY DE L'EXPERIMENT

Quan es vol comparar estadísticament dos procediments per saber quin d'ells és el millor, és important reconèixer que el tamany de la mostra i la potència de la prova estadística depenen de la variabilitat de la població que es vol estudiar. Si la població no és molt variable es pot aplicar un menor tamany mostral o augmentar la potència de la prova, estant aquests factors estretament lligats a la reducció del patiment dels animals d'experimentació.

El principi consisteix en realitzar un experiment amb el menor nombre possible d'animals, mantenint la probabilitat de detectar diferències significatives dins d'uns límits admissibles, de manera que no hi hagi necessitat de repetir experiments per haver-se obtingut resultats inútils.

Per aquests motius s'han d'utilitzar dissenys que permetin reduir l'error experimental. Aquesta reducció pot lograr-se uniformitzant els animals emprats i les condicions en les quals es desenvoluparà l'experiment i aquest ha de ser l'objectiu primari que ha de buscar tot investigador.

El treball té un disseny experimental, longitudinal i prospectiu, en l'elaboració del qual es va prendre en consideració els tres principis bàsics que Hinkelmann i Kempthorne⁵⁹, van establir per millorar la validesa de l'anàlisi estadística i incrementar la sensibilitat de qualsevol experiment. Aquests principis són : 1.- Principi de la replicació, 2.- Principi de l'aleatorització 3.- Principi de control local o bloqueig.

2.1.-PRINCIPI DE REPLICACIÓ

“Cada tractament ha d'aplicar-se a varies unitats experimentals” .⁵⁹

En aquesta investigació els tractaments en estudi són la criopreservació en comparació amb el control que és l'empelt osteocondral en estat fresc.

La unitat experimental és l'objecte al qual se li aplica el tractament i en el que es medeix i analitza la variable que s'investiga. En aquest estudi es va escollir com unitat experimental, el còndil intern de fèmur de conill New Zealand.

Hinkelmann⁵⁹ planteja que el principi de replicació està fonamentat en que si les unitats experimentals són el més semblants entre si, es poden detectar errors que en altres casos podrien ser considerats com una diferència entre els tractaments que s'investiguen.

2.2.-PRINCIPI D'ALEATORITZACIÓ

“Assignació al atzar de les unitats experimentals a cada un dels tractaments”⁵⁹

Això ens porta a realitzar estimacions no esbiaixades, tant en la variància com en les diferències entre els tractaments. D'aquesta manera les diferències estan lliures de

les discrepàncies sistemàtiques degudes a fonts de variació no controlades o desconegudes.

En aquest treball es va comptar amb un total de 5 conills (10 genolls en total). Per motius tècnics es va realitzar l'assignació a l'atzar de cada conill a un grup experimental prèvia a la eutanàsia de l'animal.

2.3.-PRINCIPI DEL CONTROL LOCAL O BLOQUEIG

La idea bàsica consisteix en controlar adequadament l'error reduint-lo a la mínima expressió possible, creant subgrups d'unitats experimentals el més homogènies dins de cada grup principal. D'aquesta manera es van reduir alguns factors que podien produir una variació sistemàtica a les diferències entre unitats experimentals, la qual cosa equivaldria a fer una avaluació de l'error experimental dins de cada bloc generat.

En el nostre estudi els blocs o subgrups d'animals van quedar determinats per la forma en que els conills van ser provistos per l'estabulari per a la realització de l'experiment, degut a que els animals arribaven setmanalment en petits grups.

3.- CÀLCUL DEL TAMANY DE LA MOSTRA

Bailey ⁵, Weakley ¹²⁷ i Williams ¹²⁹, plantegen que en els estudis on s'utilitza el microscopi electrònic, són adequats grups de comparació composts per 4 a 6 animals, ja que la validesa estadística de les observacions ve donada més pel nombre d'imatges obtingudes que pel nombre d'individus estudiats per grup. Per tant en el nostre estudi ha estat necessari la utilització de cinc conills, utilitzant cada una de les dues extremitats inferiors per cada un dels grups de criopreservació. Pel grup control es va utilitzar el banc

d'imatges obtingudes de l'estudi previ realitzat per Carbonell.²¹ L'estudi de les imatges realitzades es tractarà posteriorment.

4.- PROTOCOL D'EUTANÀSIA

L'elecció del Pentobarbital per a practicar l'eutanàsia dels animals d'experimentació, es va veure motivada a que la Comissió Europea considera que és un mètode recomanable, per ser ràpid, efectiu i de poc perill per l'operador. Aquestes consideracions van ser presentades en la Directiva 86/609/EEC del 24 de novembre de 1986, sobre "la aproximació de les lleis, regulacions i provisions administratives dels Estats membres en allò concernent a la protecció d'animals usats per propòsits experimentals i altres propòsits".

El pentobarbital es va utilitzar a una concentració del 5% ja que concentracions més altes produeixen la precipitació del mateix, amb el que es requereix més dissolvent i és més irritatiu i dolorós per l'animal.

5.- TÈCNICA DE DISSECCIÓ

Es tracta de mantenir al llarg de tot el procés experimental les màximes condicions d'esterilitat per evitar que agents infecciosos poguessin fer-se presents.^{110, 109}

Es va escollir la tècnica d'accés parapatel·lar interna, realitzant una osteotomia distal de fèmur i proximal de tibia i amb una artrotomia per permetre que el criopreservant arribés millor al cartílag.

6.- PRESERVACIÓ DELS EMPELTS OSTEOCONDRAIS

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

Un cop aïllats els genolls dels conills, van ser submergides en solució estèril de NaCl al 0'9 % a temperatura ambient fins al seu trasllat al centre on es troba el microscopi electrònic utilitzat en l'estudi. La solució fisiològica evita que es deshidrati el cartílag pel seu contacte amb l'aire fins que s'aconsegueixi examinar, i impedeix els canvis osmòtics bruscs que poden produir lesió cel·lular .

6.2.- EMPELTS OSTEOCONDRAIS CRIOPRESERVATS

Les condicions de criopreservació són les mateixes que el nostre grup d'investigació ha utilitzat en altres oportunitats pel manteniment de tendons i al·loempelts ossis ¹⁰⁸, os homòleg cortical ³⁸ i lligaments encreuats anteriors. ¹⁰⁰

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

La solució crioprotectora està 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%

-Solució RPMI sense L-glutamina

Originalment formulada en el Roswell Park Memorial Institute amb la finalitat de ser utilitzada en la criopreservació per a subministrar els nutrients i metabòlits necessaris als teixits (Taula 1). La preferència per una solució sense L-Glutamina radica en l'efecte

sobre la pressió oncòtica que s'obté amb l'aminoàcid pot obtenir-se igual amb la albúmina humana.²⁸

-Solució d'albúmina humana al 20 %

La albúmina humana s'agrega a la solució crioprotectora per a mantenir la pressió oncòtica i reduir la fuga de soluts de la cèl·lula a la matriu extracel·lular i d'aquí a la solució criopreservant durant el procés de descens de la temperatura. A més a més, exerceix per mecanismes no del tot coneguts, una influència protectora contra la desnaturalització de les proteïnes a baixes temperatures. Aparentment comparteixen aquestes propietats altres agents de la solució criopreservant.²⁸

-Solució de DMSO al 100%

El DMSO és un agent crioprotector que té la propietat de penetrar a la cèl·lula i substància intercel·lular, produint un ambient propici per a la reducció del contingut d'aigua a temperatures suficientment baixes com per disminuir l'efecte nociu dels soluts concentrats a les cèl·lules i prevenint la formació de cristalls de gel, proporcionalment grans, que poden danyar a les estructures intracel·lulars.⁵⁶

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

La solució K-H original està comunament emprada per a la criopreservació i mitjà de descongelació de diversos teixits humans com vàlvules cardíques, teixit hepàtic, pancreàtic, cardíac i vasos sanguinis.^{11, 24, 53, 71, 93, 103, 107, 120, 120, 125} Fins la data no disposem de dades d'utilització en teixit cartilaginós.

7.-CORVES DE CONGELACIÓ I REESCALFAMENT DELS EMPELTS MANTINGUTS EN CRIOPRESERVACIÓ.

CORVA DE CONGELACIÓ

A mesura que baixa la temperatura en l'entorn de la cèl·lula comença la formació de gel. La congelació de l'aigua genera un augment paulatí de la concentració de soluts en el medi extracel·lular, que produeix un desequilibri osmòtic. L'aigua surt per osmosi i produeix la deshidratació cel·lular, la qual és adversa a la viabilitat del teixit al moment del seu reescalfament.

La importància de mantenir un procés curós en el descens de la temperatura i del reescalfament de l'empelt està en disminuir els efectes nocius de la formació de gel i la deshidratació intracel·lular.

La primera fase del procés de criopreservació rep el nom de fase de precongela ment o previtrificació, en la qual l'agent crioprotector va penetrant en l'espècimen. Invariablement aquesta fase implica un descens de la temperatura per a anar desaccelerant el metabolisme i la probabilitat de canvis hipòxics i isquèemics, alhora que disminueix la toxicitat química de l'agent crioprotector.

Els empelts osteocondrals poden ser submergits directament en una solució crioprotectora pre-refredada (273°K a 277,15°K) i d'aquí ser passats a una càmera de criopreservació. Una altra opció és utilitzar un equip de criopreservació on es pot regular la taxa de refredament des de les condicions biològiques fins els 273,15°K o 277,15 °K.

Durant la criopreservació, la solució RPMI permet mantenir en les millors condicions possibles l'entorn cel·lular, subministrant múltiples aminoàcids en un ambient tampó (buffer). Encara que els mitjans de cultiu convencionals són utilitzats comunament en criopreservació, es creu que no són solucions ideals per exposar les cèl·lules a baixes

temperatures . Tampoc existeixen evidències que indiquin que les solucions per cultius cel·lulars conformin un entorn negatiu pels espècimens que es conservaran a temperatures inferiors als 273,15°K.

En la preservació de teixits i òrgans, els balanços hídrics i iònics poden ser controlats emprant solucions dissenyades físicament per als desequilibris de temperatura ¹²¹. Aquestes solucions es basen en la premissa que reduint la temperatura a un punt pròxim a la congelació (273,15°K) s'impedeix la necessitat de mantenir un metabolisme en les seves condicions fisiològiques. En aquest ambient ideal, la distribució d'ions i aigua entre els compartiments intra i extracel·lular pot ser mantingudes per medis físics en lloc de medis metabòlics. Això és possible perquè les bombes de membrana s'inactiven a tals temperatures, i en absència de metabolisme les forces de flux transmembrana d'aigua i ions poden ser previngudes o limitades manipulant el medi extracel·lular.

Les següents fases del procés de refredament en la criopreservació consisteix en portar la mostra al menys fins els 233,15°K. Durant aquesta fase de refredament, fer que l'ambient de l'espècimen tingui una temperatura igual o inferior a la del punt de congelació de la solució crioprotectora, no implica necessàriament la congelació de la peça, ja que la congelació del teixit dependrà principalment de tres factors: la taxa de refredament, el tamany de la peça i la presència d'agents nucleants, que són partícules alienes al teixit que catalitzen la formació de nuclis de gel iniciant així la congelació del teixit en si.

La nucleació representa el punt de partida del canvi d'estat líquid a sòlid, i implica la separació progressiva del gel de la solució no congelada, per ho que es produeix un augment de la concentració d'aquesta a mesura que es formi més gel. De la mateixa manera, l'inici de la congelació també està associada amb un canvi d'energia (pèrdua de

calor). El control de la nucleació i la compensació de la temperatura durant el procés de preservació són els factors de rellevància en la viabilitat cel·lular post-preservació.

Les corbes de congelació que s'han adoptat en aquest estudi foren les programades en el congelador biològic de taxa controlada (crossos ®) del laboratori de criopreservació de la TSF de la Corporació Sanitària Clínic, que s'utilitza actualment dins del protocol de la preservació de vàlvules cardíques i altres teixits vasculars. La corba de recalentament emprades també es troba dins del mateix protocol.

CORVA DE RESCALFAMENT

De la mateixa manera que la taxa de refredament, la taxa de recalentament pot afectar la viabilitat cel·lular, però en general, des d'un punt de vista menys crític que la taxa de pèrdua de calor. De totes maneres, els resultats estan determinats per la interacció d'algunes variables criobiològiques, així com les condicions prèvies de refredament.

En molts procediments de criopreservació la taxa de refredament han estat optimitzades per a un ràpid rescalfament, motiu pel qual en aquestes circumstàncies un calentament lent disminueix la viabilitat, encara que depèn del tipus de teixit. Es creu que això és degut a que en descongelació lenta, la cèl·lula pot veure's carregada de soluts (incloent l'agent crioprotector), la qual cosa, combinada amb la baixa permeabilitat a l'aigua provoca la lisi osmòtica. La descongelació lenta dona suficient temps a la cèl·lula per rehidratar-se i perdre gradualment els soluts acumulats (fig. 47).

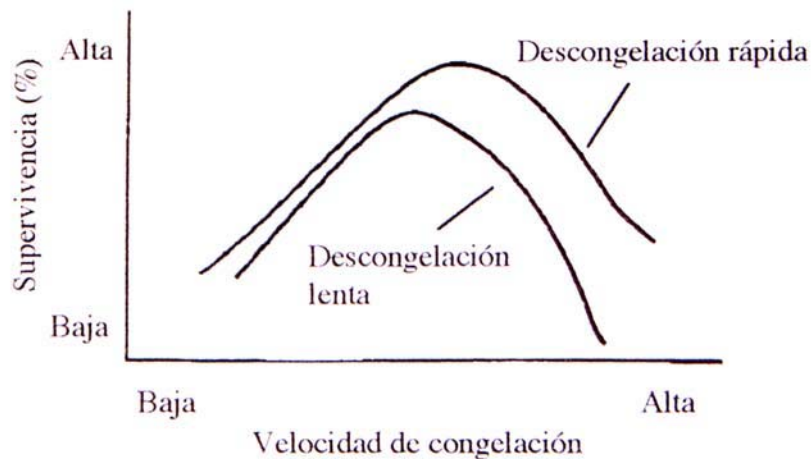


Fig. 47. Relació entre supervivència cel·lular i velocitat de descongelaçió. La supervivència millora quan s'utilitza una descongelaçió ràpida, especialment si la velocitat de congelació també ho és.

8.-OBTENCIÓ DE LA MOSTRA DE CARTÍLAG

Es va obtenir amb una trefina de 5 mm. de diàmetre, d'àrees de càrrega del còndil femoral intern. Vam escollir aquesta tècnica ja que es creu que altera menys la morfologia de l'espècimen que amb altres com el bisturí o elements similars. També ha estat el mètode escollit per altres autors en estudis similars.²¹

9.-MICROSCOPIA ELECTRONICA

La fixació de mostres de cartílag per a microscopia electrònica de rastreig emprant tècniques estàndards amb formaldehid o glutaraldehid causen una distorsió important i encongiment dels espècimens.^{33, 70} Encara que l'aigua del teixit es reemplaçada per

altres elements en la fixació per a microscopia de llum i en la microscopia electrònica de transmissió, en la microscopia electrònica de rastreig convencional el procés de fixació utilitzant “deshidratació sense substitució” produeix artefactes.^{25, 70, 119} En el present estudi la superfície articular dels empelts osteocondrals foren examinades sense mètodes de fixació físicoquímics emprant un microscopi electrònic de rastreig ambiental (MERA) (ESEMTM ElectroScan 2020 ESEM-FEG).

Gardner et al⁴⁵ van examinar la superfície articular de cartílag fresc i congelat emprant un microscopi electrònic criogènic de rastreig. L'avantatge d'aquest mètode és que permet estudiar teixits altament hidratats amb menys possibilitat d'introduir artefactes que amb els mètodes convencionals de microscopia electrònica de rastreig. Hayat⁵⁶, Bald⁷ i Dempsey^{34, 119} van descriure que a pesar de l'alta velocitat a la qual es dona el procés de congelació en un bloc de teixit, en les capes més superficials es produeix tempranament la formació de gel que dificulta la difusió de calor des de les capes més profundes, i per tant existeix la possibilitat de generar distorsions per cristalls. En referència a aquesta tècnica, es plantegen certes preguntes com si es possible mantenir la hidratació en un teixit en les condicions d'alt buit en la càmera del microscopi i sota el raig d'electrons.

Les mostres del nostre treball van ser estudiades a 276,15°K, una acceleració de voltatge de 10 o 20 KV i una pressió de càmera de 10 Torr amb la finalitat que fos el mínim l'efecte de la deshidratació. Les mostres criopreservades van ser portades a temperatura ambient en la seva totalitat abans de ser examinades amb el microscopi, ja que de no esperar el temps adequat, la secció del teixit congelat amb la trefina podia produir alteracions en la superfície.

La fixació de la mostra per examinar-la amb un microscopi electrònic de rastreig convencional radica en la exposició de tindrà l'espècimen al buit de la càmera i al bombardeig dels electrons del feix.

Un microscopi electrònic de rastreig convencional (fig. 48) està constituït principalment per una columna que conté els següents elements:

- 1.-Un canó d'electrons amb un filament que actua com a emissor o font d'il·luminació per analogia amb un sistema òptic.
- 2.-Un sistema de lents electromagnètiques encarregades de focalitzar el feix d'electrons produït pel filament.
- 3.-Un sistema de rastreig que fa recórrer el feix d'electrons per la superfície de la mostra.
- 4.- Un o més dispositius de detecció que captin el resultat de la interacció del feix d'electrons amb la mostra i transformar-lo en senyal elèctrica.
- 5.- Una sortida connectada a una o varies bombes que produeixen el buit necessari per a que no existeixi interferència de molècules amb els electrons primaris i secundaris.

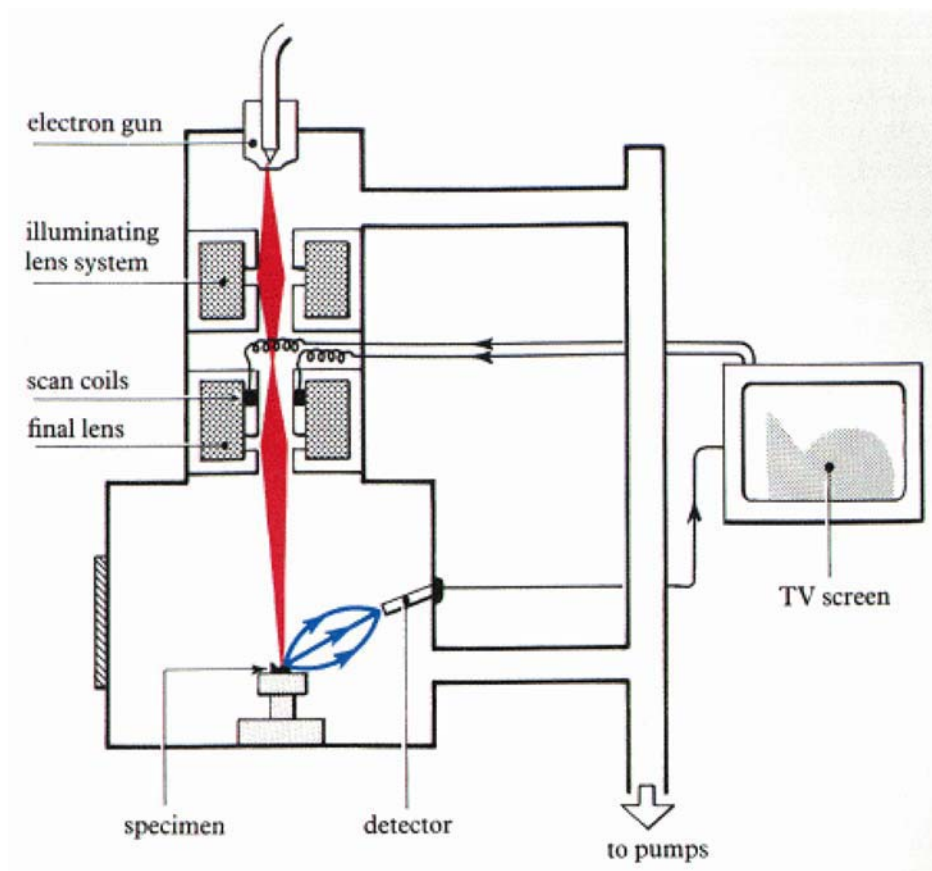


Fig. 48. Esquema d'un microscopi electrònic de rastreig convencional.

A més a més de tots aquests elements, el microscopi posseeix diversos sistemes que permeten observar les senyals elèctriques procedents dels detectors en forma d'imatges, en un monitor, fotografia, espectre d'elements...

El sistema de rastreig, allotjat en la lent de l'objectiu, fa moure el feix un nombre determinat de línies al llarg de la superfície escanejada, repetint-se el procés indefinidament.

A l'incidir el feix d'electrons sobre la mostra, s'alliberen raigs X que poden permetre un espectre d'elements i arribar així a un anàlisi químic elemental de la mostra.

Quan xoquen els electrons del feix contra la mostra que es desitja examinar s'alliberen electrons de l'espècimen. Aquests electrons es denominen secundaris per

diferenciar-los dels electrons provinents del feix (primaris), i són els que el microscopi usa per a generar la imatge.

En realitat quan l'equip capta electrons no pot distingir si provenen del mateix espècimen o procedeixen del feix d'electrons primaris que han estat retrodispersats per la mostra. Davant d'aquesta impossibilitat de distingir-los, en la pràctica es considera un electró secundari aquell que emergeix de la superfície de la mostra amb una energia inferior a 50 eV i un electró retrodispersat el que ho fa amb una energia major.

L'avantatge que té el MERA d'examinar les mostres directament sense necessitat de tècniques de fixació, radica en que permet estalviar un temps considerable en la preparació de les mostres sense emprar processos físicoquímics que poden induir artefactes, motiu pel qual, teòricament, s'aprecia una anatomia més propera a la realitat (fig. 49). A més, la seva càmera no requereix de un buit absolut amb la qual cosa no hi ha interferència a la observació de mostres humides.¹²⁸

El MERA no requereix preparació prèvia de les mostres perquè aplica un gas entre el detector d'electrons i la mostra (vapor d'aigua, àrgon o nitrogen). Aquest gas s'ionitza al col·lisionar amb els electrons secundaris, produint un doble efecte. Per una part amplifica la senyal dels electrons secundaris emesos per la mostra (que són els responsables de produir la imatge) i per altra banda evita que la mostra es carregui electroestàticament. Mitjançant la aplicació d'una diferència de potencial entre el detector i el portamostres, els ions del gas són atrets cap a la superfície de la mostra actuant de igual forma que els recobriments d'or o carbó utilitzats en la microscopia electrònica convencional.



Fig. 49. Microscopi electrònic de Rastreig ambiental de la UPC utilitzat en aquest estudi.

Per a previndre la interferència atmosfèrica per la falta de buit, el MERA utilitza un detector d'electrons secundaris que pot treballar en atmosferes de vapor d'aigua de fins a 10 Torr. A més, el disseny del microscopi contempla uns dispositius anomenats Apertures Limitants de Pressió que separen zones diferenciades de bombeig de buit, creant així un gradient entre l'espècimen i la òptica del microscopi (fig. 50). Aquestes apertures són el suficientment amples com per a permetre el pas dels electrons, però alhora suficientment estretes com per no permetre el pas de molècules de gas d'un compartiment a l'altre. En cada compartiment existeix un sistema de bombeig per a generar el buit necessari.

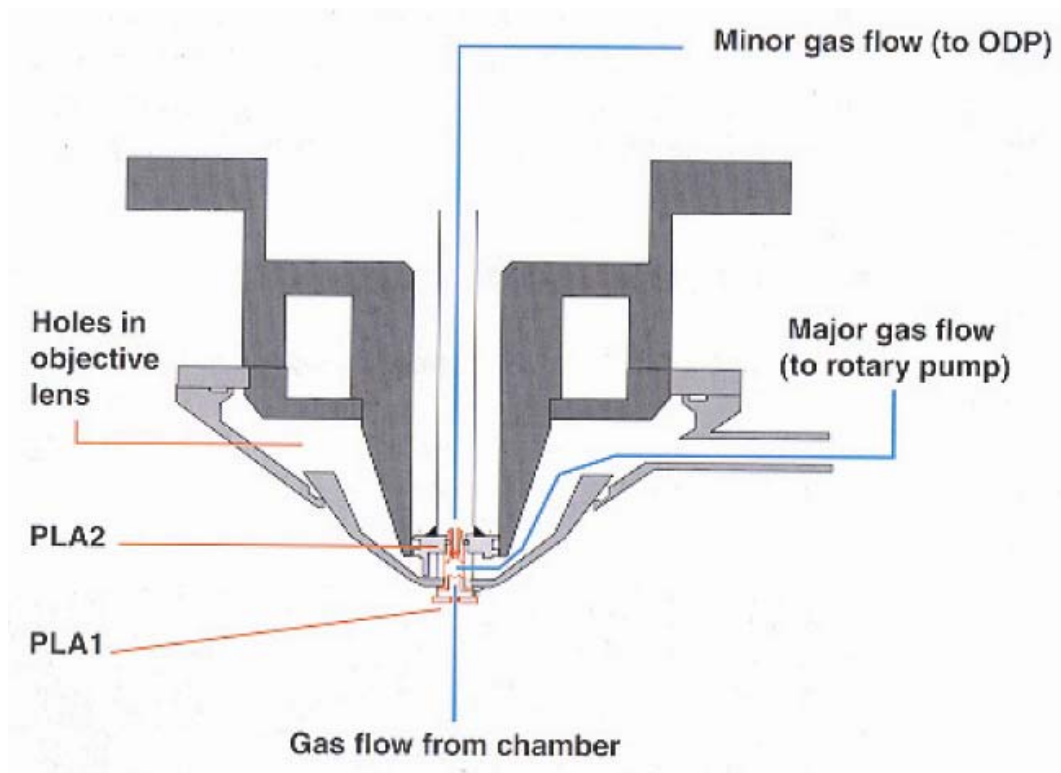


Fig. 50. Diagrama esquemàtic de l'ensamblatge final del MERA mostrant dues apertures Limitants de Pressió (PLA1 i PLA2) i els compartiments que la limiten. Imatge obtinguda del catàleg del ESEM TM

Si el vapor d'aigua es utilitza com a gas en la càmera d'espècimen, les mostres humides poden romandre hidratades. De fet, l'aigua líquida pot mantenir l'equilibri termodinàmic amb la fase de vapor. El diagrama de la fase de l'aigua indica la pressió parcial de vapor d'aigua per a establir-se en aigua líquida a una temperatura determinada en la càmera del microscopi (fig. 51).

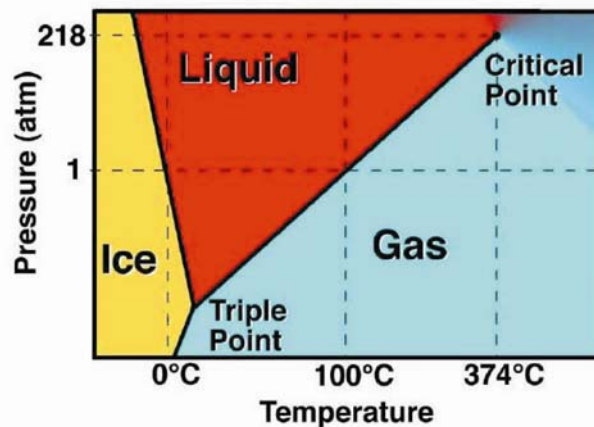


Fig. 51. Diagrama de fase d'aigua.

La tècnica del MERA resol moltes de les limitacions del microscopi electrònic convencional de rastreig on les mostres han de ser elèctricament conductores, compatibles amb el buit i seques. Hi ha una menor manipulació de la mostra i es disminueix el risc de producció d'artefactes.

Les imatges de la superfície articular d'empelts osteocondrals en estat fresc van servir de control en el nostre estudi.

10.-COMPARACIÓ ENTRE ELS GRUPS A ESTUDI

Per realitzar la comparació entre els grups d'estudi (fresc, criopreservat amb KH i criopreservat amb RPMI sense L-Glutamina) a partir de les variables qualitatives del sistema de classificació de la superfície de cartílag es va emprar el test de Chi-cuadrat de Pearson, amb un nivell de significança $p < 0.05$.

DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

1.- IMATGES OBTINGUES AMB UN MICROSCOPI ELECTRÒNIC DE RASTREIG AMBIENTAL DE LA SUPERFÍCIE ARTICULAR D'EMPELTS OSTEOCONDRAIS EN ESTAT FRESC, CONSERVATS PER CRIOPRESERVACIÓ AMB RPMI I CONSERVATS PER CRIOPRESERVACIÓ AMB MEDI KREBS-HENSELEIT MODIFICAT.

Usant un microscopi electrònic de rastreig ambiental (MERA) vam realitzar 100 fotografies de la superfície articular d'empelts osteocondrals en estat fresc i conservats per criopreservació a 77,15°K durant un numero igual de dies. Cap dels espècimens fou exposat a processos de fixació química o física que hauria incrementat la probabilitat d'artefactes i induir d'aquesta manera falses observacions en referència a la morfologia de la peça.

Amb la microscopia electrònica convencional, es necessari fixar la mostra prevalent a través de mètodes de punt crític i bany de metall conductiu, per exemple or, o bé criofixació. Si la mostra no es fixa, a l'observar-la a través del microscopi existeix interferència de la humitat del teixit amb el buit de la càmera i no s'aconsegueix la imatge (a més que es va alterant la mostra progressivament per l'efecte del feix d'electrons)⁵⁶.

En la revisió de la literatura que es va realitzar, s'han trobat poques referències respecte a la aplicació del MERA en l'estudi del cartílag (un teixit molt ric en aigua).^{21, 118}

1.1.-FOTOGRAFIES DELS EMPELTS EN ESTAT FRESC

Les imatges captades pel MERA mostren una superfície articular amb molt pocs defectes de relleu consistents en protuberàncies i colines. Aquestes últimes tenen una

major extensió que la seva alçada. També s'han observat foràmens ovalats de marges nets, les quals corresponen segurament a llacunes condrocítiques en l'interior de les quals hi ha cossos ovalats, de superfície llisa, de marges arrodonits que no guarden contacte amb les parets de la llacuna, i que podria tractar-se de condrocits.

Les nostres observacions ens han permès constatar que les irregularitats detectades no són producte d'artefactes per tècniques de fixació, ja que no hem emprat cap d'aquests procediments, ni tampoc per tècnica de conservació en fresc, per tant considerem aquestes imatges com un patró per a la comparació de mostres similars sotmeses a processos de conservació.

Igualment, basats en les nostres imatges, confirmem que la superfície articular en estat fresc dels empelts osteocondrals de còndil femoral de conill New Zealand, albí, femella, de 10 a 12 mesos d'edat no és completament llis.

Les preparacions de les superfícies articulars utilitzant microscopia electrònica convencional han estat criticades ja que les mostren han de ser deshidratades abans de ser examinades i posteriorment fixat amb una fina capa de metall elèctricament conductiu per a prevenir la càrrega elèctrica de la superfície durant el bombardeig d'electrons. Cadascun d'aquests passos pot produir artefactes.

Des del punt de vista biològic, el material examinat no és estrictament el mateix que hi ha in vivo, encara que s'ha assumit que per les característiques d'avaascularitat del teixit cartilaginosa, els canvis que poden passar en ell no es produeixen tan ràpidament.

Un altre factor a considerar és la disminució del temps de manipulació i processament de les mostres fins a la seva observació amb el MERA, reduint també d'aquesta manera la possibilitat de induir artefactes per aquestes causes.

En la superfície articular d'empelts frescos s'ha observat en diverses oportunitats protuberàncies arrodonides i/o allargades, de superfície llisa, l'origen de les quals o

composició no vam poder aclarir amb el MERA. Alguns autors també les han reportat utilitzant el microscopi electrònic de rastreig convencional, i han suggerit, entre altres hipòtesis, que es deuen a la extrusió de material de condrocits aplanats de la superfície o al col·lapse dels mateixos.⁴⁴ Una altre hipòtesi podria plantejar-se en base a partir de la constitució de la capa de matriu extracel·lular suprajacent al condrocit, doncs en estudis en cartílag de rata emprant microscopi electrònic de transmissió⁴³ s'ha observat que aquesta és rica en fibres col·làgena densament empaquetades, amb el que, al nostre judici, podria influir en la formació de les prominències observades, i perquè aquestes podrien tenir en ocasions formes allargades que no corresponen amb el model de condrocit ovoide o esfèric de la superfície articular.

Les imatges de petits objectes amorfs i blancs en alguns punts de la superfície podrien correspondre a cristalls o dipòsits provinents del líquid sinovial o a fragments ossis produïts durant el procés d'extracció; per disminuir al màxim aquest error i no alterar la mostra es van sotmetre prèviament a un rentat amb ultrasons durant 10 segons. Aquestes partícules sense distribució ni tamany uniforme, van ser publicades per primera vegada al 1980¹² usant microscopi electrònic convencional per l'estudi del cartílag de rata. Aquests autors conclueixen que són cristalls de líquid sinovial.

Respecte a l'ús de la solució fisiològica per al transport de l'empelt en estat fresc, considerem que és important per evitar els efectes de la deshidratació de la mostra per la humitat ambient.

La presència de fractures en la superfície articular va ser molt poc freqüent en els empelts en estat fresc. Aquesta situació contrasta amb les observacions de Jurvelin⁶⁸. Possiblement existeixen varies causes en la producció de les fractures. La primera és la manipulació de la mostra, ja que segons l'instrument de tall i la tècnica que s'utilitza per la secció del teixit poden produir-se deformacions que porten a la pèrdua de continuïtat de

la superfície. La segona font podria consistir en la exposició de condicions físico-químiques (deshidratació, punt crític...) que són importants per a l'observació al microscopi electrònic convencional. Com que a les nostres investigacions no fem aquests tipus de procediments, aquesta podria ser la explicació de perquè hem observat menys freqüentment les fractures que Juverlin i col.

Hong i Juverlin^{60, 68} van descriure superfícies amb predomini fibrós que no observem en la nostra investigació. Considerem que està justificat per diversos motius: us d'un microscopi diferent, teixit de diferents animals i de diferents àrees anatòmiques, possiblement entre d'altres.

1.2.-FOTOGRAFIES DELS EMPELTS CRIOPRESERVATS

Moltes de les imatges en estat criopreservat recordaven a les de l'estat fresc. Les colines i protuberàncies continuaven presents. Algunes llacunes que es van detectar semblaven estar ocupades per cossos ovoides amb aspecte de condrocit, encara que amb algunes diferències. Alguns d'aquests presentaven un puntejat fosc que sembla indicar que la integritat de la membrana cel·lular ha estat vulnerada després del procés de criopreservació.

El paper que juga la membrana en la viabilitat post-criopreservació és molt important. Durant l'estrès osmòtic del recalentament del cartílag, la membrana cel·lular ha de permetre el flux de líquids i electròlits a una velocitat adequada per a que no es produeixi la mort cel·lular. Alguns agents crioprotectors com el DMSO augmenten la permeabilitat de la membrana cel·lular per mecanismes que encara no estan clarament establerts, reduint així el dany durant l'estrès osmòtic.

Aquestes observacions sobre la morfologia del condrocit són les que ens fan sospitar que el protocol de criopreservació que es va utilitzar pot ser adaptat per a aconseguir condrocits que morfològicament siguin més pròxims a l'estat fresc.

Per altra banda, també es van detectar algunes regions de la superfície articular dels empelts criopreservats que s'assemblen més a una superfície congelada ²¹, doncs en ella ens trobem amb un major nombre d'irregularitats tant en colines com en protuberàncies, i inclòs algunes llacunes buides.

Aquestes observacions les podem explicar d'algunes maneres: 1º.- Considerant la possibilitat de que l'efecte nociu del fred en algunes àrees de l'empelt no hagi pogut ser contrarrestat per la solució criopreservant, per una formulació subòptima en la mateixa (és una composició dissenyada específicament per la preservació de teixit vascular, cardíac i pancreàtic), o més per les mateixes limitacions del procés de criopreservació, que s'allunya del mètode de conservació ideal des del punt de vista morfològic i biològic. 2º.- Exposició insuficient de la superfície articular de l'empelt a tots els components de la solució criopreservant, potser per la ubicació de l'empelt en la bossa de criopreservació o a la presència d'altres factors que no han estat ponderats com sediments de soluts. 3º.- Alteracions pròpies de la superfície articular independents del procés de criopreservació. La combinació de tots aquests factors, i segurament d'altres desconeguts fins ara, pot ser la resposta a aquest plantejament.

Seria d'utilitat complementar els estudis observacionals realitzats amb el MERA amb tècniques que permetin determinar bioquímicament la viabilitat del teixit estudiat, en particular en allò referent al metabolisme del condrocit i a les propietats biomecàniques del teixit, ja que la finalitat és mantenir en el temps les condicions biomecàniques d'un teixit cartilaginós un cop implantat en el pacient.

Hi ha molts factors que afecten la conservació del teixit cartilaginós per criopreservació. La congelació, el recalentament, i les propietats de les solucions crioprotectores influeixen notòriament en les característiques que presentaran els teixits després del procés.

L'estudi de tots aquests factors es reconeixen com empírics, tal i com és la criobiologia actual. Els diferents mecanismes d'acció dels agents crioprotectors comunament utilitzats varien segons les cèl·lules i els teixits que es desitgin preservar. Les imatges aquí obtingudes demostren que el nostre protocol de criopreservació amb medi K-H aparenta ser de major utilitat que la conservació amb RPMI en el manteniment de la morfologia de l'espècimen. De totes maneres, considerem que poden haver protocols de criopreservació que s'adaptin millor a les característiques del teixit que desitgem emmagatzemar, ja que com es va mencionar anteriorment els passos seguits són els mateixos que avui dia s'apliquen a altres teixits.

Els nostres estudis, juntament amb els de Carbonell ^{21, 118}, han estat els primers en al camp de la criobiologia en emprar un MERA per a l'estudi de la superfície articular dels empelts criopreservats, sense cap tècnica de fixació físico-química.

2º.- AVALUACIÓ I COMPARACIÓ DELS PRINCIPALS ASPECTES MORFOLÒGICS DE LA SUPERFÍCIE ARTICULAR D'EMPELTS OSTEOCONDRAIS FRESCOS AMB EMPELTS OSTEOCONDRAIS QUE HAN ESTAT EMMAGATZEMATS MITJANÇANT DOS MÈTODES DIFERENTS DE CRIOPRESERVACIÓ, MITJANÇANT UN SISTEMA DE CLASSIFICACIÓ VALIDAT.

2.1.-SUPERFÍCIE LLISA.

En la comparació del grup fresc amb criopreservat 1 (RPMI) observem diferències significatives, les quals no són degudes a l'atzar, i amb una baixa concordança entre ambdós grups. Aquest resultat poden ser interpretats com que la criopreservació amb RPMI produeix canvis a la superfície del cartílag que la fan diferent a la superfície de l'empelt fresc. En la comparació del grup fresc amb el criopreservat 2 (K-H) observem que la distribució va assolir una distribució estadística, amb un índex de correlació molt bo, motiu pel qual es pot concloure que cap dels dos mètodes produeix canvis en la superfície llisa de l'empelt. Al comparar els dos grups criopreservats observem també una baixa correlació entre ambdós. A partir d'aquests resultats podem concloure que la criopreservació amb RPMI introdueix canvis en la superfície llisa de l'empelt osteocondral fresc.

2.2.-SUPERFÍCIE IRREGULAR AMB COLINES

En comparar aquesta categoria en els tres grups la distribució resulta significativa, per la qual cosa l'atzar no pot explicar totalment les diferències. L'índex de concordança al comparar el grup fresc amb el criopreservat amb RPMI (Grup 1) és baixa, així com entre els dos grups de criopreservació (Grup 1 i 2), en canvi presenta un índex de

correlació molt bo quan comparem el grup control amb el criopreservat amb K-H (grup 2). Per aquests motius, concloem que la preservació amb RPMI introdueix un augment en el nombre de colines de la superfície articular fresca.

Pensem que les colines descrites en la nostra escala, corresponen a elevacions que realitza la fibra col·làgena empaquetades en les capes més externes del teixit cartilaginós que sobresurten per una ubicació més superficial de les mateixes (fet que explicaria la seva presència en els empelts en estat fresc). L'efecte de la pèrdua de volum per asseca humitat queda contrarestat en part per la solució criopreservant, però l'efecte osmòtic dels soluts podria contribuir negativament en aquest sentit, situació que podria justificar les colines en empelts criopreservats.

2.3.-SUPERFÍCIE AMB PROTUBERÀNCIES.

En aquest camp d'estudi observem uns resultats similars als anteriors, però amb un índex de correlació entre el grup fresc i el criopreservat amb RPMI moderat. El mateix observem quan comparem els dos grups de criopreservació entre ells. En canvi observem un índex de correlació molt bo entre el grup fresc i el criopreservat amb medi K-H (grup 2).

Creiem que en aquest cas hi ha un fenomen similar al descrit per a la categoria anterior, però en lloc d'intervenir les fibres col·làgenes densament empaquetades, les prominències observades són produïdes pels condrocits que es troben en les capes més superficials.

2.4.-SUPERFÍCIE SENSE FENEDURES

La comparació dels tres grups en aquesta categoria presenta poques diferències, sense canvis estadísticament significatius. Vam observar un índex de correlació molt bo al comparar el grup fresc amb cadascun dels dos grups criopreservats, i un índex de correlació bo al comparar entre si els dos grups criopreservats. El mètode de criopreservació amb K-H provoca menys fenèdres que el criopreservat amb RPMI. Això ens fa pensar que la criopreservació no es un factor que produeixi “per se” fenèdres en la superfície articular fresca, per tant no són events morfològics que serveixin com a indicador per valorar els procediments de conservació experimental en aquest treball.

2.5.-FENEDURES SUPERFICIALS

En aquest camp també trobem resultats similars a l'apartat anterior. Aquí trobem un índex de correlació molt bo al comparar el grup fresc amb el criopreservat amb RPMI, i un índex bo quan comparem entre si els dos grups de criopreservació i al comparar el grup fresc amb el criopreservat amb K-H (grup 2). També podem concloure que la criopreservació no comporta canvis en aquest aspecte respecte a la superfície de cartílag en estat fresc.

2.6.-FENEDURES PROFUNDES

En aquest aspecte trobem en els tres grups a estudi un índex de correlació molt bo entre tots ells, conclouent per tant que la criopreservació no suposa cap alteració al provocar fenèdres profundes respecte a la superfície de cartílag fresc.

2.7.-SUPERFÍCIE SENSE LLACUNES

En el grup fresc es va veure un gran nombre de mostres sense llacunes, i al comparar-ho amb el grup criopreservat amb RPMI (grup 1) es va trobar un índex de concordança molt bo. També es va trobar un índex de concordança molt bo al comparar entre si els dos grups criopreservats, i un índex de concordança bo quan comparem el grup en fresc amb el criopreservat amb K-H (grup 2). Podem concloure en aquest aspecte que la criopreservació no provoca un nombre molt elevat de diferències entre els dos grups de criopreservació.

2.8.-SUPERFÍCIE AMB LLACUNES PLENES

A l'analitzar la presència de condrocits dins les llacunes observem que disminueix l'índex de correlació, sent aquest moderat quan comparem el grup fresc amb el criopreservat amb RPMI (grup 1). En canvi trobem un índex de correlació en aquest aspecte bo, quan comparem el grup fresc amb el criopreservat amb K-H (grup 2). Això ens porta a la conclusió que el mètode de criopreservació amb K-H comporta un major nombre de condrocits visibles en la superfície articular. Això no vol dir que tots aquests condrocits observats siguin viables, quedant a l'espera de poder completar amb posteriors estudis metabòlics la viabilitat d'aquests condrocits.

2.9.-LLACUNES BUIDES

En aquest últim aspecte de comparació dels tres grups vam trobar un baix índex de correlació al comparar el grup fresc al el criopreservat amb RPMI (grup 1), i un índex moderat respecte al grup fresc amb el criopreservat amb K-H. Això ens porta a pensar

que la criopreservació amb RPMI comporta un major nombre de llacunes buides, i per tant de condrocits no viables, que el mètode de criopreservació amb K-H. A pesar d'exposar el teixit osteocondral a un procés de criopreservació es produeix la desaparició d'alguns condrocits, probablement per l'efecte de les baixes temperatures, respecte a la superfície cartilaginosa en estat fresc.