

Aloinjertos y autoinjertos de ligamento cruzado anterior de la rodilla.

Estudio experimental en el perro⁽¹⁾

J. E. MINGUET BAIXAULI*, F. GOMAR SANCHO** y F. SAENZ LÓPEZ DE RUEDA***

* Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica. Hospital Valme. Sevilla.

** Unidad de Traumatología y Cirugía Ortopédica. Departamento de Cirugía. Universidad de Valencia.

*** Unidad de Traumatología y Cirugía Ortopédica. Departamento de Cirugía. Universidad de Sevilla.

Resumen.—Hemos realizado un trabajo de cirugía experimental en perros, en el que comparamos el comportamiento de los autoinjertos frescos de ligamento cruzado anterior de la rodilla (LCA), con lo aloinjertos criopreservados. Con la ayuda de una guía y trefinas, se extrae el LCA con sus inserciones, unido a un taco óseo en cada extremo. Los autoinjertos se reimplantan tras unos minutos en suero fisiológico. Los aloinjertos son sometidos a congelación y, almacenamiento a -80°C y descongelación rápida, antes de su implantación. Se realiza una fijación de los tacos óseos con tornillos de esponjosa de 6,5 mm, lo que nos permite prescindir de la inmovilización. Los animales se sacrifican a las 3, 6, 12, 24 y 36 semanas, realizando estudio vascular con técnica de transparencia de tejidos de Spalteholz y estudios histológicos. Se demuestra que ambos injertos sufren los mismos procesos biológicos de reparación. Células mesenquimales indiferenciadas y brotes capilares del receptor, invaden los componentes del injerto; se produce una diferenciación polarizada a osteoblastos en el hueso y a fibroblastos en el ligamento, que por mecanismo de sustitución por yuxtaposición, restauran un LCA similar al normal, bien vascularizado. Esta remodelación llega a las zonas profundas, en los autoinjertos a las 12 semanas y en los aloinjertos a las 24 semanas. A las 36 semanas, ambos injertos están maduros. No ha habido rechazo inmunológico. En nuestra opinión el aloinjerto de LCA, con hueso en sus extremos, puede ser el sustituto ideal para las roturas de LCA.

AUTOGRAFTS VERSUS ALLOGRAFTS OF ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT OF THE KNEE. EXPERIMENTAL STUDY IN DOGS

Summary.—Experimental surgery was performed on the dog to compare the behavior of fresh autografts with freeze-stored allografts of the anterior cruciate ligament (ACL). In both cases, drill holes were made at the ACL insertion sites with a cannulated bit and the ligament with a plug of bone attached to each end was extracted with the aid of a guide wire. Prior to implantation, autografts were immersed in a saline solution for a few minutes. Allografts deeply frozen to -80°C with liquid nitrogen were quickly thawed before surgery. At implantation, the bone plugs at the ends of the ligament were firmly anchored with 6,5 mm. cancellous bone screws, so immobilization of the animals was not necessary. Animals were killed at 3, 6, 12, 24 and 36 week after surgery. To study graft vascularity the tissue transparency technique developed by Spalteholz was employed. Both type of grafts underwent the same biological reconstruction process. Indifferentiated mesenchymal cells and capillar buds from the host tissues invaded the implant. Through a mechanism of creeping substitution induced by fibroblastic and osteoblastic differentiation, the grafts gradually took the appearance of normal, well-vascularized ACL. The remodeling process reached the innermost zones of the autografts in 12 weeks and the allografts in 24 weeks. Both type of groups showed a normal mature appearance 36 weeks after surgery. There were no signs of immunological rejection. In our opinion, the ideal substitution for repair of ACL injurie could be an allograft of the same ligament, removed with bone attached to each end.

Correspondencia:

Dr. JOSÉ MINGUET BAIXAULI
Génova, 6 - 3.º A
41010 Sevilla

(1) Este trabajo ha sido realizado en el Hospital de Valme y en el quirófano experimental de la Residencia Sanitaria «Virgen del Rocío» de Sevilla.

INTRODUCCIÓN

La gran complejidad de la estructura multiaxial del Ligamento Cruzado Anterior (LCA), lo hace único e insustituible (1). Su lesión implica destrucción intrínseca, con deshilachamiento de sus fibras, lo que imposibilita la sutura directa término-terminal, independientemente de la gran dificultad técnica de reproducir su estructura anatómica original y dejar una adecuada tensión.

Todos los sustitutos, biológicos y sintéticos, proporcionan una cuerda unidireccional, que lucha exclusivamente con la subluxación de los cóndilos femorales en los últimos grados de extensión, dejando una rodilla laxa el resto del balance articular. Son incapaces de sustituir a un ligamento formado por múltiples fascículos isométricamente distribuidos entre el cóndilo femoral externo y la superficie preespinal de la tibia, que con una forma helicoidal, intercambia tensiones, procurando una perfecta coaptación femorotibial a lo largo de todo el balance articular de la rodilla.

El sustituto perfecto para el ligamento cruzado anterior roto debería ser otro ligamento cruzado anterior homólogo, que conserve sus inserciones y parte del hueso de sus extremos para el anclaje firme.

Los buenos resultados de la revitalización de ligamentos tendinosos crioconservados (2-4), «a priori» deben obtenerse también con los injertos de ligamento cruzado anterior.

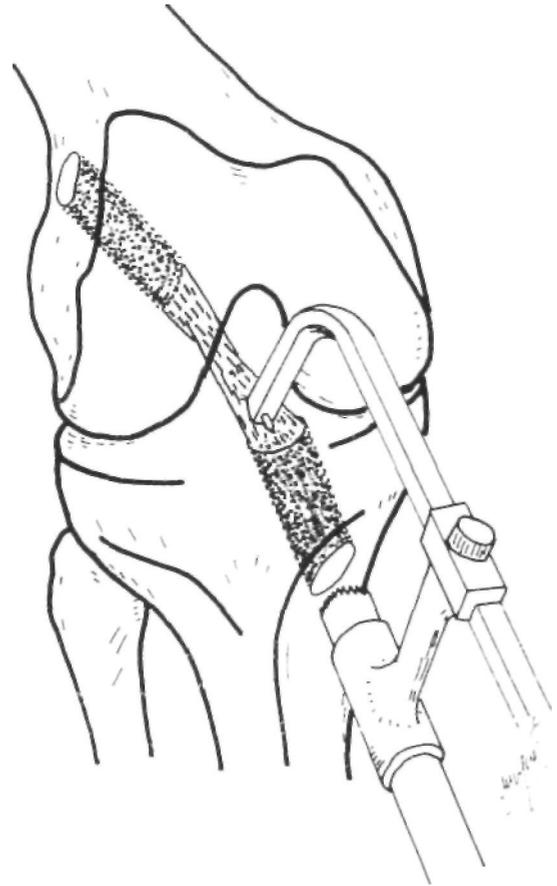


Figura 1. Dibujo que muestra el modo de extracción del LCA, con sus inserciones unidas a 2 tacos óseos.

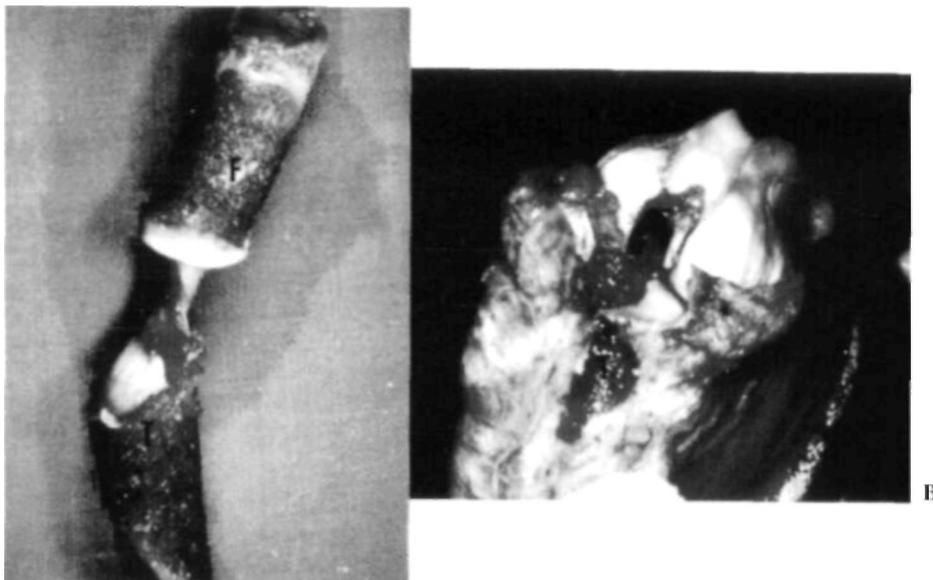


Figura 2. Cirugía. A) Injerto de LCA extraído, unido en sus inserciones a dos tacos óseos. B) Tras la extracción, quedan dos túneles óseos donde se ubicará el injerto. F=Femoral, T=Tibial.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la revitalización de aloinjertos crioconservados del ligamento cruzado anterior, y comprobar si podía mantenerse su compleja estructura anatómica.

Para valorar mejor los resultados se compararon los obtenidos con aloinjertos crioconservados y con autoinjertos frescos.

MATERIAL Y MÉTODO

Hemos realizado nuestro estudio experimental en 20 perros maduros de raza indeterminada, de ambos sexos, y con un peso entre 28 y 35 Kg. En primer lugar se realizó un estudio anatómico minucioso, que sirvió para elaborar una guía y trefina a medida, que unificaba todos los injertos. Con ellas se extrajo el ligamento cruzado anterior, con sendos cilindros de hueso en sus extremos (fig. 1), sin alterar las superficies articulares.

A todos los perros se les intervino ambas rodillas, alternando autoinjerto y aloinjertos. Se utilizó la misma técnica quirúrgica en todas las intervenciones, en condiciones rigurosamente asépticas.

Técnica quirúrgica

Bajo anestesia general se practicaba una incisión anterointerna en piel y planos profundos, con artrotomía anteromedial. Se luxada externamente el aparato extensor.

Con un punzón se marcaba el centro geométrico de la circunferencia, que abarca la inserción del LCA. Primero en tibia y luego en fémur. En este punto se anclaba el extremo puntiagudo, que constituía el centro de la guía de trefinas. Con la ayuda de un motor eléctrico de velocidad regulable, se introducía la trefina por metafisis proximal interna de tibia y cóndilo externo, labrando un cilindro de tejido esponjoso, en tibia y fémur, que quedarían unidos a cada extremo del LCA. Esto constituía el injerto osteoligamentoso, que sería similar en todos los perros. A su vez quedaban dos túneles similares en todos los perros, que constituían el lugar de ubicación de los tacos óseos del injerto (fig. 2).

En los autoinjertos, tras unos minutos en suero fisiológico, se reimplantaba en su lugar.

En los aloinjertos, el injerto se limpiaba con suero y se introducía en un tubo estéril hermético, con etiqueta de identificación. Se envolvía en una bolsa plástica y se introducía en un termo de Nitrógeno líquido a -196°C , para su congelación y transporte. Luego sería almacenado en un refrigerador eléctrico a -80°C , hasta su utilización en otro animal.

En el lecho del injerto extraído para crioconservación, se colocaba otro similar previamente crioconservado de 2 a 4 semanas. La descongelación se realizaba durante diez minutos a temperatura ambiente y luego 20 minutos en suero fisiológico a $30-40^{\circ}\text{C}$.

Tras el cierre por planos se colocó vendaje blando. Se administró antibioterapia preventiva con Cefonicid, durante 48 horas.

Todos los perros permanecieron en jaulas individuales, con el libre apoyo y movilidad de la extremidad intervenida.

Los animales se sacrificaron a las 3, 6, 12, 24 y 36 semanas. Antes del sacrificio, se realizaron Rx de ambas rodillas y se procedió a la técnica de perfusión vascular.

Estudio vascular

Para el estudio vascular utilizamos la técnica de Spalteholz, que comprende 2 etapas: 1) Perfusión de los materiales de contraste y 2) Transparencia de los tejidos.

1) Perfusión de contraste

Utilizamos una modificación de la técnica Rhineland (5). Bajo anestesia general, a través de una laparotomía longitudinal en línea media abdominal, se disecaron aorta y cava abdominales. Se canalizaron en el trayecto comprendido entre las renales y las circunflejas ilíacas, para mejor distribución del medio contraste.

Se utilizaron dos sistemas en Y de Uromatic de 3,5 mm de diámetro, para perfundir y drenar sin interrupción. Los medios de contraste se calentaron a 37°C y con la ayuda de un manguito de presión, se perfundieron a 150 mm de Hg. Se intentaba de este modo mantener la misma presión y temperatura de la sangre, para evitar vasoconstricciones que podrían alterar el estudio. Cada frasco de 500 cc contenía:

1.º) Solución salina con Heparina, para evitar trombos y Lidocaina al 2%, como anestésico de superficie y vasodilatador secundario.

2.º) Igual que el anterior, añadiendo 10 cc de tinta china.

3.º) Solución salina de Micropaque al 30% y 10 cc de tinta china.

4.º) Solución de Micropaque al 30% en formol al 10% y 10 cc de tinta china.

Tras perfundir el 3.º frasco, se sacrificaba al animal con 2 grs de Pentothal sódico y se perfundía el 4.º frasco a 180 mm Hg. Se ligaba la cava y se seguía la perfusión hasta que deja de entrar en contraste, entonces se ligaba la aorta.

Se aislaron ambas extremidades, con desarticulación de caderas. Se introdujeron en formol al 10%, durante 5 días. Después se congelaron para facilitar el corte con sierra circular, hasta aislar un bloque con el injerto en su interior.

Este bloque se descalcificó con Ac. fórmico al 10%, lo que nos permitiría el corte superficial progresivo cada 4 días, hasta conseguir una pieza de 5 o 6 mm de grosor, que comprendía el LCA y los tacos óseos.



Figura 3. Aloinjerto de 6 semanas. Transparencia con técnica de Spalteholz (x3). Injerto avascular. Tacos óseos delimitados por reacción vascular periférica. Ligamento cruzado anterior rodeado por importante trama vascular sinovial. F=Fémur, T=Tibia.

2) Transparencia de tejidos de Spalteholz

Las piezas descalcificadas, se introdujeron en agua oxigenada al 10%, para extraer restos hemáticos. Se deshidrataron en pases sucesivos de alcohol de concentración creciente.

Se introdujeron en Benceno puro y posteriormente se pasaba a una solución de Benceno más Bencilo benzoato, quedando la pieza transparente.

Se almacenaron en una mezcla de benzoato de bencilo y metil salicilato. Para trabajar con la pieza se introdujo en una cubeta de vidrio con metil salicilato, y se realizaron transparencias a 2, 3 y 5 aumentos.

Estudio histológico

Las piezas fueron posteriormente rehidratadas y cortadas en pequeños bloques para posterior inclusión en parafina para estudio histológico sobre secciones de 5 micras teñidas con hematoxilina y eosina.

RESULTADOS

Estudio clínico

Todos los perros recuperaron la marcha normal a partir de la 6.^a semana en ambos miembros. El balance articular pasivo fue completo a partir de la 6.^a semana, tanto en los autoinjertos como en los aloinjertos.

El test de Lachman era negativo en todas las rodillas intervenidas, lo que indicaba que el injerto era funcional. El cajón anterior neutro (CAN) fue positivo en tres aloinjertos de 6, 12, 24 semanas. Esto fue identificado con un CAN paradójico, debido a que para mejorar el abordaje de la inserción femoral del LCA, se desinsertaban algunas fibras proximales del ligamento cruzado posterior, de su inserción en el techo del espacio intercondíleo.

Estudio radiológico

La colocación de los tacos óseos y los tornillos de fijación fue normal en todas las rodillas, no se apreciaron cambios degenerativos, en la interlínea articular manteniendo la posición inicial, con perfecta fusión ósea al lecho a partir de la 3.^a semana.

Estudio macroscópico

Animales sacrificados a las 3 semanas

Los tacos óseos en los autoinjertos y aloinjertos estaban claramente definidos, sin contraste, avasculares, pero en íntimo contacto con el hueso receptor.

El LCA en los autoinjertos, estaba englobado por sinovial hipertrófica muy vascularizada. En los aloinjertos se apreciaba su estructura fibrilar conservada pero envuelto con sinovial hipertrófica sólo proximalmente, pero también muy vascularizada.

Animales sacrificados a las 6 semanas

El tejido óseo en ambos tipos de injertos estaba unido al túnel receptor por callo óseo, pero permanecía avascular.

El LCA, en los autoinjertos tenía aspecto normal, con coloración blanco nacarada, envuelto por una sinovial hipertrófica densa muy vascularizada. En los injertos estaba cubierto por una sinovial hipertrofia, similar a la observada en los autoinjertos de tres semanas, aunque con trama vascular menos desarrollada (fig. 3).

Animales sacrificados a las 12 semanas

Los tacos óseos, tanto en los autoinjertos como en los aloinjertos eran indiferenciables estructuralmente del tejido esponjoso normal. Se apreciaba ya un punteado de contraste y una trama vascular casi normal, aunque menos densa y más desordenada que en el hueso receptor.

El LCA, igualmente en ambos, autoinjertos y aloinjertos, tenía un aspecto normal, coloración blanco nacarada brillante, cubierto por una fina capa sinovial que dejaba ver su estructura y algún fino filamento de contraste sobre su superficie. Persistía además una sinovial hiperplásica, más evidente en los aloinjertos, que se separaba fácilmente del ligamento, amarrada al techo del espacio intercondíleo y a la almohadilla grasa. En los autoinjertos se observaba una red vascular periligamentosa

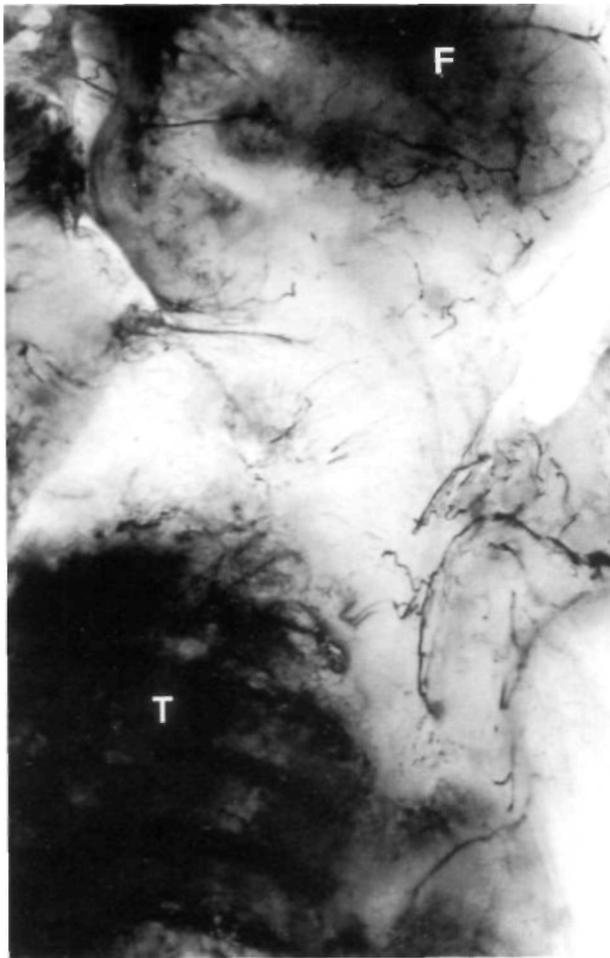


Figura 4. Aloinjerto de 12 semanas. Transparencia con técnica de Spalteholz (x5). Vasos regularmente distribuidos sobre el ligamento. Trama vascular sobre los tacos óseos. F=Fémur, T=Tibia.

siguiendo el eje longitudinal, semejante a la vascularización periligamentosa normal. En los aloinjertos existía una red vascular más transversal que correspondía a la vascularización sinovial, con vasos longitudinales (fig. 4). No se observaban vasos atravesando las inserciones ligamentosas.

Animales sacrificados a las 24 semanas

El tejido óseo de ambos injertos era igual al hueso receptor, con una estructura esponjosa trabecular clara y abundante trama vascular semejante al hueso receptor.

El LCA en todos los injertos, parecía un ligamento normal. Conservaba su grosor y la coloración blanco nacarada. Estaba cubierto por una fina capa sinovial transparente, que dejaba ver su estructura fibrilar y un abundante entramado vascular bien organizado en su eje longitudinal, con abundantes ramificaciones. Observábamos vasos procedentes de la almohadilla grasa y el techo del espacio intercondíleo, con una red vascular periligamentosa normal (fig. 5). La sinovial había evolucionado a dos capas perfectamente individualizadas, una fina y transparente y otra, separada de la anterior, como una estalactita colgando del techo del espacio intercondíleo, con poca entidad vascular, lo que nos sugería que estaba en período de atrofia (fig. 6).

Animales sacrificados a las 36 semanas

El tejido óseo de los injertos era similar al hueso receptor, con una red vascular normal. Del mismo modo, el LCA, tanto en los autoinjertos como en los aloinjertos, tenían un aspecto normal cubiertos por una fina capa sinovial que dejaba ver su estructura fibrilar y los vasos superficiales o periligamentosos eran de distribución normal.

No se encontraron alteraciones en las inserciones, ni en el cartílago articular ni en los meniscos, en ninguno de los animales.

Estudio histológico*Animales sacrificados a las 3 semanas*

Tanto en los autoinjertos como en los aloinjertos, el componente óseo estaba compuesto por trabéculas óseas muertas, con lagunas osteocíticas vacías. La médula ósea se presentaba necrótica, con reacción fibrosa. En algunas zonas periféricas había penetración de tejido de granulación, que in-



Figura 5. Aloinjerto de 24 semanas. Transparencia con técnica de Spalteholz (x3). Árbol vascular muy ramificado sobre el ligamento. Todo el injerto tiene una irrigación normal.

vacía los espacios medulares del hueso muerto y ya se observa aposición ósea en la superficie de alguna trabécula ósea muerta (fig. 7).

El LCA injertado era prácticamente acelular, y sólo en la periferia persistían algunas células, más abundantes en los autoinjertos. En ambos, autoinjertos y aloinjertos, la superficie del ligamento estaba cubierta por una gruesa membrana de sinovial hiperplásica, ricamente vascularizada, que era más densa en la vecindad de las inserciones (fig. 8). Esta reacción sinovial era más intensa en los autoinjertos.

Animales sacrificados a las 6 semanas

En ambos injertos permanecían las trabéculas óseas muertas, envueltas por una médula ósea fibrosa. En las zonas periféricas del injerto era evidente el depósito de hueso nuevo, sobre la superficie de las trabéculas muertas, en mayor extensión y profundidad que en el período anterior del estudio.

El LCA estaba recubierto por una gruesa capa sinovial muy vascularizada, que en los aloinjertos era de mayor volumen. En los autoinjertos, las zonas periféricas conservaban su población celular y sus fibras aparecían separadas y penetradas por una sinovial hiperplásica rica en vasos; la zona central mostraba las fibras íntegras, pero era acelular. En los aloinjertos, toda su estructura era acelular y no había penetración sinovial.

En las inserciones se conservaban las 4 zonas de transición, pero sin células.

Animales sacrificados a las 12 semanas

En el componente óseo, la penetración entre las trabéculas óseas, por parte de la médula hiperplásica, había alcanzado el centro del injerto. El refuerzo óseo de las trabéculas muertas alcanzaba gran parte de los injertos, un 80% en los autoinjer-

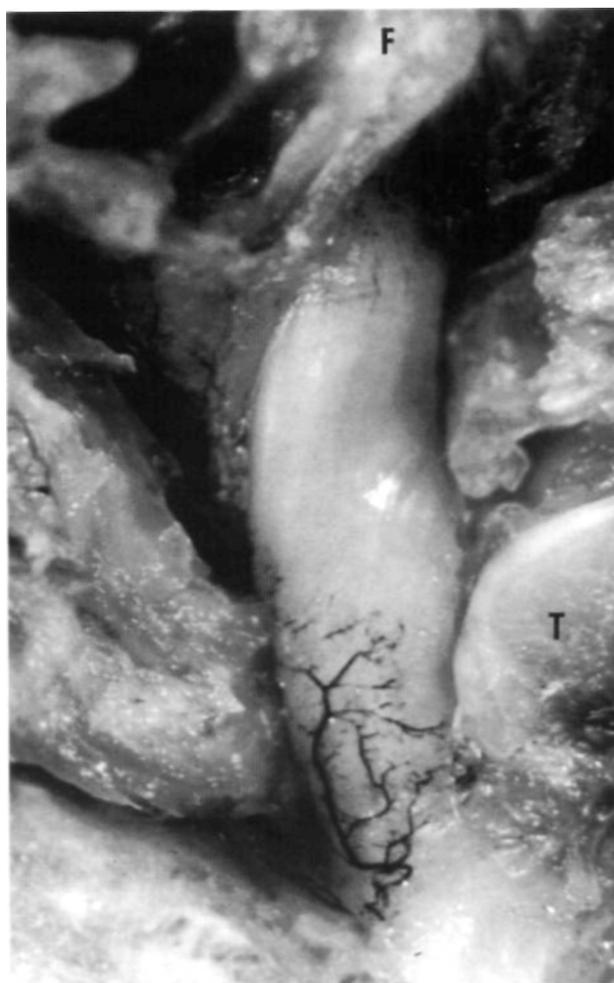


Figura 6. Aloinjerto de 24 semanas. Ligamento cruzado anterior de aspecto normal, bien vascularizado y masa sinovial atrófica por delante del ligamento. F=Fémur, T=Tibia.

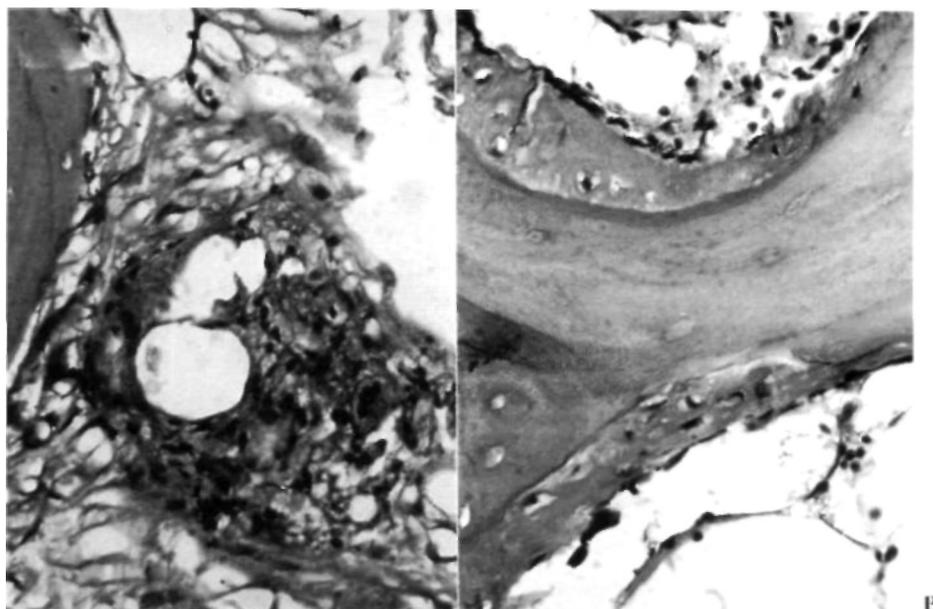


Figura 7. A) Yema vascular que ha penetrado en la médula fibrosa, rodeada de células mesenquimales indiferenciadas. B) Aloinjerto de 3 semanas, trabécula muerta rodeada de hueso neoformado (H-E, x200).

tos y un 60% en los aloinjertos. En los autoinjertos se observaba una clara remodelación ósea en las zonas más periféricas.

En la zona central de los aloinjertos de LCA, aparecían fibras acelulares, sin infiltración sinovial, mientras que en los autoinjertos se observaba mayor penetración en profundidad de brotes sinovial es con capilares y células mesenquimales indiferenciadas, que penetraban en la estructura de colágeno fragmentando sus fibras. La hiperplasia sinovial era aún muy evidente cubriendo toda la superficie del LCA, siendo mayor en los aloinjertos.

En las inserciones de los autoinjertos, había mayor diferenciación de las zonas de transición y había aumentado la población celular, iniciándose la columnización en el fibrocartilago no mineralizado.

Animales sacrificados a las 24 semanas

En el componente óseo apenas quedaban restos necróticos en la porción más central. La mayor parte del injerto está revitalizado tanto en su componente trabecular como medular, una estructura trabecular en gran parte madura.

El LCA estaba cubierto por una fina capa-atrónica sinovial. En el autoinjerto, la mayoría de los haces fibrilares presentan celularidad normal (fig. 9), sin embargo, había zonas de haces separados con gran infiltración de tejido conjuntivo laxo rica-

mente vascularizado. En los aloinjertos persistían, en la zona central, haces fibrilares acelulares con penetración de sinovial hiperplásica en las zonas más periféricas.

En la inserción se aprecia en los aloinjertos más celularidad, las fibras de Sharpey continuas, pero las zonas de transición difuminadas. En los autoinjertos, la inserción tenía un patrón histológico normal.

Animales sacrificados a las 36 semanas

El tejido óseo de ambos injertos está totalmente revitalizado, tanto en su componente trabecular como medular.

El LCA tenía una apariencia histológica normal. Apenas hay hiperplasia sinovial en la superficie del ligamento, que estaba cubierto por una fina capa-atrónica sinovial.

Las inserciones presentan una celularidad normal y las 4 zonas de transición.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran claras ventajas de la utilización de injerto de ligamento cruzado anterior respecto a otras técnicas.

La normal inserción de los ligamentos cruzados es necesaria para que estén bajo la tensión apro-

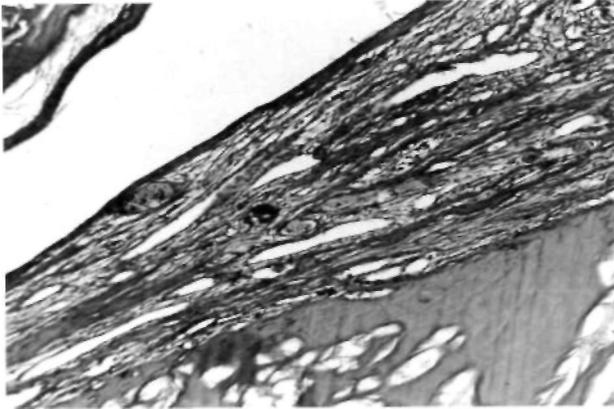


Figura 8. Aloinjerto de 3 semanas. Superficie del ligamento cubierta por una gruesa capa de sinovial hiperplásica, muy vascularizada (H-E, x 50).

piada, durante todo el balance articular de la rodilla (6, 7). Esto no se logra con la gran mayoría las técnicas sustitutivas empleadas, quedando un acortamiento de más de 1 cm, comparado con la longitud normal del LCA (8).

Shino (9) ha puesto de manifiesto, empleando aloinjertos tendinosos que el injerto necesita una adecuada tensión para su remodelación; un injerto que se queda laxo, presenta un importante retraso en su maduración, con persistencia de la hipervascularización sinovial, durante mucho más tiempo que en los injertos tensos, con hiper celularidad en su matriz y con núcleos y fibras de colágeno orientadas al azar.

En nuestro trabajo, por la metodología empleada, conseguimos una colocación isométrica, en su lugar de origen y con una tensión adecuada. Prueba de ello es que el test de Lachman era negativo en todas las rodillas.

Estudios de Enneking (10), muestran cómo los injertos esponjosos se reparan por adición de hueso nuevo sobre las superficies necróticas del injerto, sin perder fuerza mecánica, quedando de este modo asegurada la fijación biológica del injerto de LCA, en corto espacio de tiempo. Chiroff (11), con autoinjertos osteotendinosos de tendón patelar, con fijación a túnel óseo, comprueba que la incorporación del injerto al hueso estaba presente a las 4 semanas.

En los cortes histológicos, en el hueso, tanto de los autoinjertos frescos como de los aloinjertos congelados, encontramos a las 3 semanas, que el injerto había sufrido un proceso de necrosis avascular, pero ya en este periodo de seguimiento era evidente

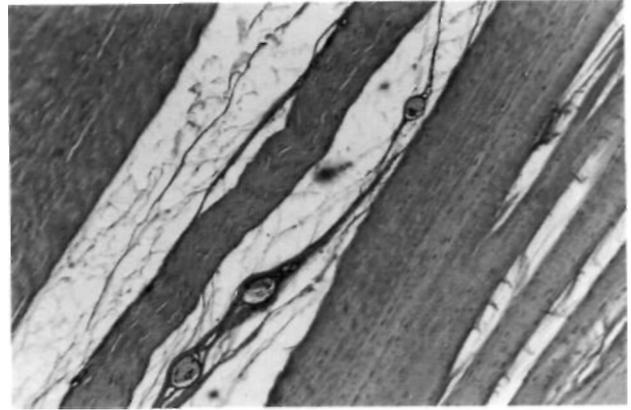


Figura 9. Aloinjerto de 24 semanas. Paquete de fibras con un infiltrado sinovial muy rico en vasos (H-E, x 50).

la puesta en marcha de la incorporación del hueso muerto, por el conocido fenómeno de «sustitución por yuxtaposición».

El primer paso es la formación de un callo entre el injerto y el huésped, que elimina las fuerzas de cizallamiento y favorece la invasión vascular. Algunas células periféricas del injerto, sobreviven al trasplante y ayudan a la formación del callo (12-18). Esto no se ha hecho patente en nuestro caso, por haber utilizado técnicas histológicas standar, pero la mayor rapidez con que se incorporaron el hueso del injerto autólogo apoyan esta idea.

Trueta (12) sugiere que los injertos esponjosos podían estar completamente revascularizados en dos semanas, por anastomosis entre los vasos del injerto y del receptor. Esto no ha podido ser confirmado en nuestro trabajo, pero lo cierto es que a las tres semanas ya hay una continuidad por callo óseo que demuestra un anclaje biológico del tejido injertado, que debe estar en relación con un buen anclaje mecánico.

Este anclaje sólido inmediato del injerto, nos permite prescindir de la inmovilización sin que el posible stress afecte a la formación y reorganización del tejido trasplantado (20, 21). Arnoczky (22), en un estudio experimental en perros, a los que no inmoviliza tras sustituir el LCA por un tejido de tendón patelar, sugiere que el injerto de tendón patelar es verdaderamente funcional dentro de la rodilla desde el primer momento, sin que interfiera la normal revascularización, proliferación celular y remodelación y reorganización de las fibras de colágeno, para formar un ligamento de normal apariencia. El hecho que no hayamos encontrados en nuestros animales lesiones cartilaginosas y me-

niscales, apoya la eficacia funcional del ligamento injertado hasta su total revascularización.

Los aloinjertos frescos tienen una importante respuesta inmune marcadamente celular y a veces humoral (23-27). Con la idea de reducir la respuesta inmunológica los aloinjertos de hueso han sido sometidos a gran variedad de técnicas físicas y químicas (10,24,28-30).

Múltiples trabajos avalan que el método idóneo y que menos altera el tejido injertado es la congelación (31, 32). Minami (33) y Shino (4) demostraron experimentalmente que el aloinjerto tendinoso, no muestra los antígenos de histocompatibilidad en el colágeno, pero sí en la células tendinosas, y comprobaron que la congelación y descongelación, al destruir las células, reduce la antigenicidad inmunológica celular, pero el almacén de colágeno permanece normal. Así, un aloinjerto de LCA con sus inserciones óseas, sirve solamente como una estructura inerte o como un andamio, sobre el que se produce una remodelación completa (8).

En nuestro caso, a los aloinjertos extraídos se les ha aplicado un proceso de congelación en profundidad, similar al utilizado en los bancos de tejidos, que disminuye su antigenicidad y facilita su conservación (34). No hemos utilizado ningún tratamiento inmunosupresor y en ningún caso encontramos una evidencia de rechazo inmunológico.

En los autoinjertos de 3 semanas de evolución, el ligamento presentaba una zona central absolutamente acelular, pero en las zonas periféricas habían células viables en forma de uso, de distribución irregular, que según Arnoczky (22) no está claro si proceden del injerto original o son de origen extrínseco. Su viabilidad dentro del injerto avascular, apoyaría la teoría de Lundborg (35), Manske (36) y Ginsburg (37), quienes afirman que la nutrición inicial de un injerto libre intraarticular, se produce por la difusión de nutrientes del tejido sinovial adyacente y del líquido sinovial. Townley (38), opina que la nutrición que aporta la membrana sinovial precede a la revascularización, por lo que propone, que el sustituto ligamentoso sea cubierto por un injerto libre de sinovial autóloga, el cual protegerá al implante del ácido hialurónico del líquido sinovial, que inhibe el crecimiento de los fibroblastos.

En los aloinjertos, las pocas células periféricas observadas en alguno de los ligamentos de 3 y 6 semanas, no parecen células vivas y son interpretadas como restos celulares, pendientes de ser fagocitados.

De todos modos, el injerto se ve envuelto en un corto espacio de tiempo, por un tejido conectivo fibroblástico de reparación, hiper celular y muy vascularizado, íntimamente adherido al ligamento y que corresponde a una hiperplasia sinovial; en ella se aprecian múltiples vasos microscópicos con contraste (fig. 8).

Este tejido conectivo laxo, tiene una gran capacidad plástica e invasiva y se comporta igual que los brotes de capilares y células mesenquimales indiferenciadas, observados en el mismo período, en la médula ósea, pero en el ligamento existe una diferenciación a fibroblastos. Así a las 6 semanas, en la zona periférica del ligamento pueden verse abundantes zonas de invasión vascular y celular, esparcidas por toda la longitud del injerto. Esto coincide con los hallazgos de Clancy (8), que lo define también, como un mecanismo de «sustitución por yuxtaposición». En las zonas de remodelación, aparecen células gruesas con núcleo ovals, que identificamos como macrófagos, creando vacuolas envueltas por fibras de colágeno, que son invadidas por grupos de fibroblastos, con núcleos alargados, que producen colágeno (8, 22). Este proceso de reparación y revascularización, que empieza por la periferia, progresa hacia el centro. En este período, la zona central del injerto continua avascular, sin células y las fibras muestran fragmentación del colágeno, conforme penetra el tejido de reparación.

Alrededor de las 12 semanas, en los autoinjertos y 24 semanas en los aloinjertos, este proceso de renovación se ve en la zona central avascular, que va siendo invadida por brotes capilares, con proliferación de células mesenquimales. Se observan áreas fibrilares celulares, alternando con otras de celularidad reducida.

A las 24 semanas, la mayor parte del ligamento presenta unos haces fibrilares ondulados, con distribución celular normal orientada en el eje longitudinal (fig. 9). Sólo en la zona central se observan haces fibrilares acelulares, separados por una infiltración sinovial muy celular y ricamente vascularizada.

Observamos el ligamento maduro, a las 36 semanas, cuando aparece completamente remodelado, con bandas de fibras de colágeno más anchas y menos vasos. Los fibroblastos son más estrechos, de distribución más uniforme y al igual que las fibras de colágeno, están ordenados paralelamente. Al igual que otros autores (4, 8, 22, 39), hemos encontrado que durante la fase de maduración, el número de células y vasos disminuía, hasta un nivel fisiológico.

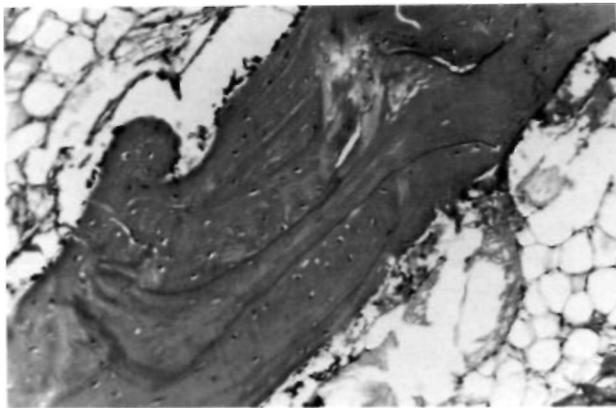


Figura 10. Aloinjerto de 36 semanas. Trabécula ósea muerta cubierta por abundante tejido óseo neoformado, con médula normal (H-E, x 100).

En nuestro estudio vemos, al igual que Nikolau (39) que tras un proceso de remodelación de la zona de inserción, se normalizan las cuatro zonas de transición (ligamento, fibrocartílago, mineralizado y hueso). Las fibras de colágeno van acompañadas de cantidades crecientes de sustancia intercelular amorfa y son continuas a lo largo de estas cuatro zonas, hasta su inserción en hueso, constituyendo las fibras de Sharpey (40). Esto proporciona una reducción óptima de la concentración de esfuerzos, en los lugares de inserción.

Es evidente, que con la extracción del LCA, queda interrumpida toda conexión vascular original. Pero en nuestro estudio microangiográfico encontramos, que los autoinjertos de 3 semanas y los aloinjertos de 6 semanas, presentan una amplia red vascular a todo lo largo del ligamento, de rápida instauración, que comenzó por los extremos del ligamento, como se aprecia en los aloinjertos de tres semanas. Pensamos que mamelones de células mesenquimales y abundantes yemas vasculares, se originan en ambos túneles óseos y en los restos de sinovial, para envolver al ligamento avascular y revitalizarlo.

En nuestras transparencias, llama la atención desde el principio, la existencia de múltiples conexiones entre los vasos intraóseos femorales y el entramado vascular sinovial del injerto, como si su vascularización derivara directamente de ellos. Al hablar de vasos intraóseos, no nos referimos a vasos que atraviesan el lugar de inserción, sino a los que emergen, tanto por el túnel femoral, como por la sinovial anterior, que crece entre el túnel y el reborde anterior del espacio intercondíleo. Este aporte fundamental y primario de los vasos intraóseos, concuerda con los hallazgos de Alm (41) y Clancy

(8), pero no, con los de Arnoczky (22) y Shino (4), para quienes el aporte vascular deriva, de la sinovial posterior y de la almohadilla grasa. Con la maduración del injerto, observamos cómo se atrofia la sinovial hiperplásica y disminuye el aporte de los vasos intraóseos, asumiendo el aporte vascular principal, la sinovial y la almohadilla grasa.

Algunos autores (4, 39, 41) consideran el injerto completamente revascularizado a las 8 semanas, pero en nuestro trabajo encontramos una vascularización periférica, que no corresponde a los vasos endoligamentosos, que se van formando y se hacen patentes a las 12 semanas en los autoinjertos y a las 24 semanas en los aloinjertos (8-14).

Según Cooper (40), Alm (41) y Nikolaou (39), algunos capilares intraóseos, atraviesan la inserción femoral y comunican con vasos endoligamentarios. En nuestro estudio, no hemos encontrado vasos, que crucen la inserción desde el fémur y la tibia al ligamento, coincidiendo en esto con otros autores (42, 43). Consideramos, como Scapinelli (44), que el lugar de inserción actúa como una barrera para el crecimiento de yemas capilares, porque su capa de fibrocartílago es avascular y no requieren vasos para su nutrición.

Otros trabajos apoyan que el aporte vascular completo al tendón patelar, proviene del plexo peripatelar y no hay contribución de la inserción tibial, pues es una zona avascular (8, 14, 37). Por ello, cuando un tercio del tendón patelar es transferido con la inserción tibial intacta, para sustituir al LCA, según la técnica de Jones (45), el tendón transferido es avascular y se comporta como un injerto libre. Por ello Clancy (46) modificó la técnica, dejando unido el injerto a un pedículo de la almohadilla grasa y de sinovial.

En nuestro estudio microangiográfico, encontramos que la zona media de los ligamentos injertados, al igual que en el LCA normal, se aprecia menos vascularizada. Esto fue descrito en los trabajos de Zahm (47), Alm (41), Arnoczky (42) y Shino (4), quienes estudiando la vascularización normal del LCA en perros, describen que los vasos intrínsecos son más numerosos en las cercanías de las inserciones del ligamento y disminuyen en tamaño y número en la parte media, que aparece menos vascularizada. Zahm (47) sugirió que, el cruce o enrollamiento de los 2 ligamentos cruzados, uno sobre otro, en la rodilla intacta, comprimiría los vasos en la porción media. Si esto fuera así, se afectaría también la vascularización del ligamento cruzado posterior, en la zona de roce y esto no sucede.

Hay que tener en cuenta, que este contacto entre ambos ligamentos cruzados, sólo se produce durante los movimientos de flexión y rotación tibial interna. Además estos ligamentos contactan con un nivel más alto, en la unión del tercio medio y proximal del LCA.

El LCA tiene un movimiento intrínseco de enroscamiento sobre su eje, durante la flexión de la rodilla, en el que participan todas sus fibras. Pensamos que esto explica mejor la zona media menos vascularizada, pues es el sitio donde las fibras se entrecruzan unas sobre otras. A esto se añade, que además del aporte vascular primario, en los extremos del ligamento, los vasos periligamentarios e intraligamentarios se anastomosan con vasos intraóseos y periósticos, lo que aumenta la irrigación en ellos (8, 41).

Evidentemente, esta zona media del ligamento aparece bien vascularizada durante el período de remodelación, ya que los vasos corresponden a la sinovial hiperplásica, que lo envuelve. Cuando el injerto ha madurado y ha desaparecido la hipervascularidad periférica, quedan los vasos endoligamentarios y periligamentarios definitivos, algunos de los cuales, debido a su calibre, no se rellenan de contraste, por lo que no se aprecian en las transparencias, pero se ven histológicamente.

Hemos encontrado una mayor proliferación sinovial en el extremo proximal del LCA y al igual que Alm (41), observamos que el número y calibre de las arterias, es mayor en el extremo proximal, que en el extremo distal del ligamento. Creemos que esto es debido a que el extremo distal del ligamento está cubierto por el ligamento yugal o intermeniscal y por la grasa infrapatelar.

Los cambios vasculares de la superficie del injerto, podrían ser una evidencia suficiente, de que la remodelación se aproxima a la madurez. Observamos que existe una relación directa entre la hipervascularización de la hiperplasia sinovial y los procesos de remodelación histológica. Así en las primeras 6 semanas, la sinovial se hiperplasia con importante crecimiento vascular y comienzan los cambios histológicos periféricos. A las 12 semanas, disminuye la hiperplasia sinovial, a la par que aumenta la celularidad fibrilar y la vascularización intrínseca del injerto. La sinovial se normaliza y desaparece la hipervascularización alrededor de las 24 semanas de evolución, cuando el aspecto histológico del injerto es similar al del LCA normal. En las rodillas de 36 semanas sólo quedan los restos atróficos de aquella sinovial hiperplásica. Esto también fue observado por Shino (1988) (9), al

comparar los hallazgos histológicos y artroscópicos en aloinjertos tendinosos en humanos.

En nuestro estudio encontramos que los aloinjertos crioconservados de LCA en el perro, siguen los mismos procesos de revascularización, infiltración de células mesenquimales y remodelación, que los autoinjertos frescos, pero más desordenados y lentos (8, 12, 41). Creemos que el retraso en los procesos biológicos de maduración de los aloinjertos, es debido a factores de tipo inmunológico, cuya influencia hemos visto en los aloinjertos hasta las 12 semanas. Esto se ha hecho patente en dos perros, uno de 6 semanas y otro de 12 semanas, en los que hemos encontrado pequeños focos de linfocitos, pero como un fenómeno muy aislado y sin influenciar los procesos de reparación. De hecho, a partir de las 24 semanas, los aloinjertos evolucionan igual que los autoinjertos, lo que confirma los hallazgos de Shino (4, 48) y Nikolaou (39).

Como hemos visto, durante el proceso de remodelación, no se afecta toda la estructura del ligamento a la vez, lo que pondría al injerto, en un momento de máxima debilidad, con incapacidad de asumir su función. Mientras existe una remodelación periférica, los haces fibrilares centrales permanecen acelulares pero compactos. Una vez restablecidos los paquetes fibrilares periféricos, el proceso avanza en profundidad, hasta restablecer todo el ligamento progresivamente. Esto concuerda con los resultados de los estudios biomecánicos de Shino (4) y Nikolaou (39), en los cuales tanto los autoinjertos como los aloinjertos, a las 8 semanas parten de una resistencia a la rotura, equivalente al 49,7% el LCA normal, que va aumentando en períodos sucesivos, hasta llegar a las 36 semanas, al 89,5%. De este modo, el injerto permanece funcional durante el proceso de maduración, asumiendo una función estabilizadora, lo cual resulta un estímulo para su remodelación (9, 20-22).

El resultado final es un LCA igual al original, tanto estructuralmente como funcionalmente, que permanece activo a lo largo de todo el balance articular de la rodilla.

Una característica importante del LCA normal, se escapa al presente estudio. Se trata de la sensibilidad propioceptiva del LCA. Creemos que su importancia requiere un estudio aparte y múltiples aportaciones serán necesarias.

La posible aplicación en la clínica humana de los aloinjertos de LCA, requeriría posiblemente, perfeccionar algunos aspectos técnicos específicos y una perfecta organización de bancos de tejidos.

Bibliografía

1. **Furman W, Marshall JL, Girgis FG.** The anterior cruciate ligament. A functional analysis based on post-mortem studies. *J Bone Joint Surg* 1976; 58A: 179-85.
2. **Peacock EE, Madden JW.** Human composite flexor tendon allografts. *Ann Surg* 1967; 166: 624-9.
3. **Neviaser SJ, Neviaser RJ, Neviaser TJ.** The repair of chronic massive ruptures of the rotator cuff of the shoulder by use of a freeze-dried rotator cuff. *J Bone Joint Surg* 1978; 60A: 681-4.
4. **Shino K, Kawasaki T, Hirose H, Gotoh I, Inoue M, Ono K.** Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogeneic tendon graft: an experimental study in the dog. *J Bone Joint Surg* 1984; 66B: 672-81.
5. **Rhineland FW.** Circulation of bone. In: «The biochemistry and physiology of bone», Vol. 2, «Physiology and pathology». Bourne GH Edit. New York: Academic Press. 1972; 2-77.
6. **Kennedy JC, Weinberg HW, Wilson AS.** Anatomy and function of the anterior cruciate ligament as determined by clinical and morphological studies. *J Bone Joint Surg* 1974; 56A: 223-35.
7. **Girgis FG, Marshall JL, Monajem ARS.** The cruciate ligaments of the knee joint. Anatomical, functional and experimental analysis. *Clin Orthop* 1975; 106: 216-31.
8. **Clancy W, Narechania RG, Rosenberg TD, Gmeiner JG, Wisnefske DD, Lange TA.** Anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in rhesus monkeys. A histological, microangiographic and biomechanical analysis. *J Bone Joint Surg* 1981; 63A: 1270-84.
9. **Shino K, Inoue M, Horibe S, Nagano J, Ono K.** Maturation of allograft tendons transplanted into the knee. An arthroscopic and histological study. *J Bone Joint Surg* 1988; 70B: 556-60.
10. **Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G.** Physical and biological aspects of repair in dog cortical bone transplants. *J Bone Joint Surg* 1975; 57A: 237-52.
11. **Chiroff RT.** Experimental replacement of the anterior cruciate ligament. A histological and micrographical study. *J Bone Joint Surg* 1975; 57A: 1124-7.
12. **Brown KLB, Cruess RL.** Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg* 1982; 64A: 270-9.
13. **Abbott LC, Schottstaedt ER, Saunders JB, Bost FC.** The evaluation of cortical and cancellous bone as grafting material. A clinical and experimental study. *J Bone Joint Surg* 1947; 29A: 381-414.
14. **Kenzora JE.** The osteocyte: living, dying, dead. A histologic, functional study. *Proceedings of the Orthopaedic Research Society. J Bone Joint Surg* 1972; 54A: 1126.
15. **Ray RD.** Vascularization of bone grafts and implants. *Clin Orthop* 1972; 87: 43-48.
16. **Kenzora JE, Steele RE, Yosipovitch ZH, Glimcher MJ.** Experimental osteonecrosis of the femoral head in adult rabbits. *Clin Orthop* 1978; 130: 8-46.
17. **Urist MR.** Osteoinduction in undemineralized bone implants modified by chemical inhibitors of endogeneous matrix enzymes. *Clin Orthop* 1972; 87: 132-7.
18. **Urist MR, Mclean FC.** Osteogenic potency and new bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg* 1952; 34A: 443-76.
19. **Deleu J, Trueta J.** Vascularization of bone grafts in the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg* 1965; 47B: 319-29.
20. **Krippaehne WW, Hunt TK, Jackson DS, Dunphy JE.** Studies on the effect of stress on transplants of autologous and homologous connective tissue. *Am J Surg* 1962; 104: 267-72.
21. **Klein L, Lunseth PA, Aadalen RJ.** Comparison of functional and non-functional tendon grafts. Isotopic measurement of collagen turnover and mass. *J Bone Joint Surg* 1972; 54A: 1745-53.
22. **Arnoczky SP, Tarvin GB, Marshall JL.** Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog. *J Bone Joint Surg* 1982; 64A: 217-24.
23. **Bonfiglio M, Jeter WS, Smith CL.** The immune concept: Its relation to bone transplantation. *Ann New York Acad Sci* 1955; 59:417-33.
24. **Chalmers J.** Transplantation immunity in bone grafting. *J Bone Joint Surg* 1959; 41B: 160-79.
25. **Burwell RG.** Studies in the transplantation of bone. The capacity of fresh and treated homograft of bone evoke transplantation immunity. *J Bone Joint Surg* 1963; 45B: 386-401.
26. **Bassett CAL.** Clinical implications of cell function in bone grafting. *Clin Orthop* 1972; 87: 49-59.
27. **Langer F, Czitron A, Pritzker KP, Gross AE.** The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *J Bone Joint Surg* 1975; 57A: 216-20.
28. **Burwell RG, Gowland G.** Studies in the transplantation of bone. The immune responses of lymph nodes draining components of fresh homogenous bone treated by different methods. *J Bone Joint Surg* 1962; 44B: 131-48.
29. **Heiple KG, Chase SW, Herndon CH.** A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *J Bone Joint Surg* 1963; 45A: 1593-1616.
30. **Tomford WW, Mankin HJ.** Investigational approaches to articular cartilage preservation. *Clin Orthop* 1983; 174: 22-7.
31. **Graham WC, Smith DA, McGuire MP.** The use of frozen stored tendons for grafting: an experimental study. *J Bone Joint Surg* 1955; 37A: 624.
32. **Burchardt H.** The biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 1983; 174: 28-42.
33. **Minami A, Ishii S, Ogino T, Oikawa T, Kobayashi H.** Effect of the immunological antigenicity of the allogeneic tendons on tendon grafting. *Hand* 1982; 14: 111-9.
34. **Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE.** 1983 bone bank procedures. *Clin Orthop* 1983; 174: 15-21.
35. **Lundborg G, Frank F.** Experimental intrinsic healing of flexor tendons based upon synovial fluid nutrition. *J Hand Surg* 1978; 3:21-31.
36. **Manske PR, Whiteside LA, Lesker PA.** Nutrient pathways to flexor tendons using hydrogen washout technique. *J Hand Surg* 1978; 3: 32-6.
37. **Ginsburg JH, Whiteside LA, Piper TL.** Nutrient pathways in transferred patellar tendon used for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 1980; 8: 15-8.

38. **Townley CO, Fumich RM, Shall LM.** The free synovial graft as a shield for collagen ingrowth in cruciate ligament repair. *Clin Orthop* 1985; 197: 266-71.
39. **Nikolau PK, Seaber AV, Clisson RR, Ribbeck BM, Basstt I FH.** Anterior cruciate ligament allograft transplantation: Long-term, histology, revascularization and operative technique. *Am J Sports Med* 1986; 14: 348-60.
40. **Cooper RR, Misol S.** Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study. *J Bone Joint Surg* 1970; 52A: 1-20.
41. **Alm A, Ekslrom II, Cillquist J, Slromberg B.** The anterior cruciate ligament. A clinical and experimental study on tensile strength, morphology and replacement by patellar ligament. *Acta Chir Scand* 1974; Suppl 445: 5-49.
42. **Arnoczky SP, Rubin RM, Marshall JL.** The microvasculature of the cruciate ligaments and its response to injury. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg* 1979; 61 A: 1221-9.
43. **Marshall JL, Arnoczky SP, Rubin RM, Wickiewicz TL.** Microvasculature of the cruciate ligaments. *Phys Sports Med.* 1979; 7: 87-91.
44. **Scapinelli R.** Studies on the vasculature of the human knee joint. *Acta Anat* 1968; 70: 305-31.
45. **Jones KC.** Reconstruction of the anterior cruciate ligament using the central one third of the patellar ligament. A follow-up report. *J Bone Joint Surg* 1970; 52A: 1302-8.
46. **Clancy WG.** Anterior cruciate ligament functional instability. A static intraarticular and dynamic extra-articular procedure. *Clin Orthop* 1983; 172: 102-6.
47. **Zalim II.** Die ligamenta decessata in gesunden und arthrotischen kniegelenk des hundes. *Kleinterpraxis* 1965; 10: 38-47.
48. **Shino K, Kimura T, Hirose H, Inoue M, Ono K.** Reconstruction of the anterior cruciate ligament by allogeneic tendon graft: an operation for chronic ligamentous insufficiency. *J Bone Joint Surg* 1986; 68B: 739-46.