

# Revista Española de Cirugía Osteoarticular

Año 11 - Tomo 11

Número 62

Valencia, marzo-abril 1976

*Rev. Esp. de Cir. Ost.*, 10, 63-88 (1976).

CLÍNICA QUIRÚRGICA UNIVERSITARIA. VALENCIA

Director: Prof. GOMAR

## Estructura y metabolismo del cartílago articular

F. ARGUELLES SANGINÉS

### RESUMEN

Se hace una revisión bibliográfica sobre el cartílago articular, haciendo especial referencia a su estructura y metabolismo.

Aconsejamos para su estudio diversas técnicas, algunas de las cuales han sido realizadas en nuestro Servicio, como son la microscopía óptica y electrónica, la autorradiografía y el «scanning» del cartílago articular.

### SUMMARY

A review of the literature about some aspects of articular cartilage is made with special interest on its structure and metabolism. The following techniques are described: optical and electronical microscopy, radioautography and scanning electronical microscopy that we have used in our Department.

El cartílago articular constituye un único y diferenciado tejido cuyas características estructurales, bioquímicas y metabólicas eran hasta hace pocos años virtualmente desconocidas.

Con la introducción del microscopio se establece la verdadera estructura histológica del tejido, pudiendo comprobar, ya antes del pasado siglo, que el cartílago contiene un elevado porcentaje celular (KOLLIKER, 1853; LEIDY, 1849), una peculiar respuesta a los colorantes (HUNTER,

1743), sin existencia de linfa, sangre o nervios (PAGET, 1853) y sin casi poder de regeneración (LEIDY, 1849). El carácter polianiónico de sus formaciones hizo difícil aplicar colorantes histológicos normales y llevar a cabo estudios metabólicos. La complejidad de sus componentes imposibilitó su separación e identificación por medio de técnicas histológicas normales así como la degradación por métodos químicos. La insolubilidad en el agua de la fracción del colágeno, así como la marcada viscosidad

y el carácter hidrófilo de la proteína polisacárida, desalentaría a los pioneros de la bioquímica del cartílago articular, hasta los trabajos más recientes de DZIEWIATKOWSKI (1954), COLLINS y cols. (1961 y 1965), CHRISTMAN y SOUTHWICK (1962), MANKIN (1968), MEACHIM (1969) y FREEMAN (1973), entre otros.

### Estructura del cartílago articular

Una de las características más particulares del cartílago articular es la preponderancia estructural de los materiales extracelulares (BARNETT y DAVIES, 1961; DAVIES, BARNETT, COCHRAN y PALFREY, 1962). La mayor parte de la masa celular corresponde a formaciones proteínicas macromoleculares. Otros autores han efectuado un recuento celular o determinaciones del DNA, pudiendo comprobar las considerables variaciones dependientes de las especies, del lugar anatómico, de la técnica de estudio y de la edad del animal.

Los estudios experimentales en el conejo adulto sobre el recuento celular, arroja cifras de  $2 \times 10^5$  células/mm<sup>3</sup>, cifra considerablemente mucho menor que la densidad celular de otros tejidos.

Las investigaciones realizadas con el microscopio óptico, determinaron cuatro zonas distintas en el tejido cartilaginoso adulto, haciendo constar las diferencias no sólo en su distribución sino también en la morfología celular dentro de cada zona. La descripción clásica de estas zonas iniciada con los trabajos de COLLINS (1949), promulgada por MANKIN (1968) y admitida por FREEMAN (1973), se muestra esquemáticamente en la fig. 1, correspondiendo a:

I. *Zona superficial, tangencial o deslizante*: Consistente en células aplanadas o marcadamente ovoideas colocadas proximales a la superficie con el eje celular

mayor dispuesto en paralelo con respecto al margen articular. Igualmente hay fibras colocadas tangencialmente a la superficie. La parte más superficial de esta zona ha sido denominada «superficie laminar» o «lámina splendens».

II. *Zona intermedia o de transición*: Las células son gruesas y ovoideas con una orientación más o menos desordenada. Las fibras se encuentran entrelazadas y plegadas en «malla».

III. *Zona profunda o radial*: Las células tienden a ser redondas, pequeñas y basófilas, colocadas en cortas columnas irregulares de 4 a 8 células perpendiculares a la superficie de la cavidad articular. Las fibras se encuentran dispuestas en una malla apretada y son predominantemente radiales al cartílago articular.

IV. *Zona calcificada*: Compuesta por pequeñas células irregulares con núcleos picnóticos, situadas en espacios lacunares y rodeadas por incrustaciones masivas cálcico-apatíticas. Esta última zona, está separada de la anterior por una fina y ondulada línea azul por los colorantes hematoxilina-eosina, designada por COLLINS (1949), y FAWNS y LANDELLS (1953), como «tide mark». La exacta naturaleza de esta área basófila en el margen de la zona de calcificación es desconocida pero existen diversas teorías que la definen como una compleja asociación entre la superficie expuesta a las sales cálcicas y un incremento local en la concentración de mucopolisacáridos.

Periféricamente, el área articular de la articulación sinovial, en donde el cartílago articular, membrana sinovial junto con la unión de la cápsula articular y el periostio, ha sido llamada «zona marginal de transición» (FREEMAN, 1973).

El cartílago en animales maduros es totalmente avascular, aneural y alinfático

(BARNETT, DAVIES y McCONNALL, 1961). Contrariamente en animales inmaduros la presencia de canales en el cartílago induce a pensar en su ocupación por vasos sanguíneos procedentes del núcleo epifisario que proporcionan poca, si alguna, materia nutritiva a los condrocitos.

En el cartílago articular procedente del cóndilo femoral del hombre se ha podido comprobar que la zona I ocupa alrededor del 5-10 por 100, las zonas II y III entre el 40-45 por 100 y la zona IV el 5-10 por 100 del espesor total del cartílago. Estos valores son aproximados y existen considerables diferencias con el correspondiente al de otras articulaciones.

La superficie del cartílago articular no está recubierta por pericondrio en animales adultos y tampoco tiene una capa sinovial o se ve una reflexión de la misma (MEACHIM, GHADIALLY y COLLINS, 1965; SILBERBERG, 1968; WEISS, ROSEMBERG y HELFET, 1968). Los estudios con el microscopio electrónico han fracasado al querer mostrar alguna forma de membrana límite (MEACHIM, 1967). Sin embargo, se ha descrito una zona de fibras colágenas apretadas y colocadas tangencialmente que corren en paralelo y ligeramente subyacentes a la superficie (DAVIES, BARNETT, COCHRAN y PALFREY, 1962). Esta zona de la que originalmente se pensó fuera un cartílago hialino duro y libre de colágena, se llamó «lámina splendens» (BARNETT, DAVIES y MAC CONNALL, 1961), consistente en una malla desordenada de delicadas fibras de colágena de aproximadamente 350 Å de espesor, malla, entre las que se encuentran las referidas fibras de 40 a 120 Å de diámetro. La zona es deficiente en polisacáridos comparada con zonas más profundas (BALAZS, BLOOM y SWANN, 1966; LOEWE, 1965), creyéndose que realiza una función protectora.

El examen macroscópico del cartílago articular sugiere que la superficie es ex-

traordinariamente suave pero con estudios histológicos o ultramicroscópicos se aprecian hundimientos, depresiones e irregularidades (MEACHIM, GHADIALLY y COLLINS,

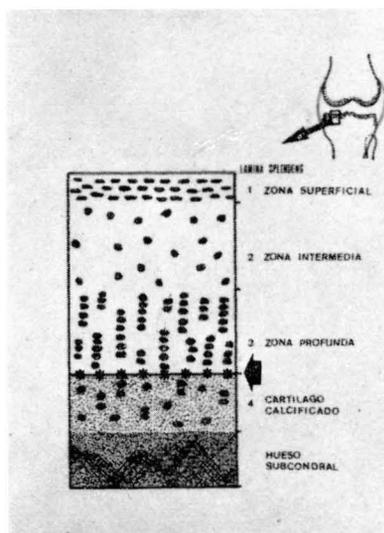


FIG. 1. — Representación esquemática de las zonas del cartílago articular. La flecha indica la zona de «tide mark».

1965). Estudios más recientes realizados por WALKER y cols. (1968 y 1969) usando el microscopio electrónico demostraron claramente una zona irregularmente arrugada, creyendo estos autores que se trata de un complejo sistema de lubricación de líquido sinovial atrapado y condensado. Los trabajos de ARGÜELLES y RENU (1975) (figs. 2 y 3), nos muestran a «scanning» microscopía electrónica y confirman, los estudios realizados por los autores anteriormente mencionados, sobre el aspecto que nos muestra la superficie del cartílago articular.

Durante mucho tiempo se ha sabido que el cartílago articular contiene fibras colágenas, responsables en gran parte de la rigidez de la estructura (BENNINGHOFF, 1925; FAWNS y LANDELLS, 1953). La colocación de estas fibras colágenas ha sido

objeto de considerables estudios y especulaciones.

Ya en 1925, BENNINGHOFF demostró histológicamente que las fibras colágenas forman hatillos colocados en arcos. Se pensó que las fibras estaban ancladas en la zona de cartilago calcificado para correr luego verticalmente hacia la superficie a través de la zona radial, doblando oblicuamente en la zona de transición para seguir la orientación tangencial de la capa de deslizamiento y luego doblándose de nuevo perpendicularmente para volver a la zona calcificada. Se pensaba que los condrocitos se encontraban entre las ramas de estas arcadas, colocados en grupos llamados «condronas». Los arcos de BENNINGHOFF del cartilago adulto se pueden visualizar

con el microscopio de contraste de fases (BROWER y HSU, 1969), pensándose que realizaban un importante papel en la elasticidad de la superficie articular, proporcionando un sistema de resistencias de tensión similar al de un viejo colchón de muelles.

El cartilago articular humano del adulto es de tipo hialino y tiene una matriz homogénea, «ground glass» y requiriéndose técnicas especiales para demostrar la textura fibrosa en la matriz (MAXIMON y BLOOM, 1948). Las fibras no han sido fácilmente visualizadas con los métodos histológicos usuales, probablemente a causa de las tinciones catiónicas empleadas o por aquellas que han sido enmascaradas por sustancias amorfas polisacáridas. Este pro-

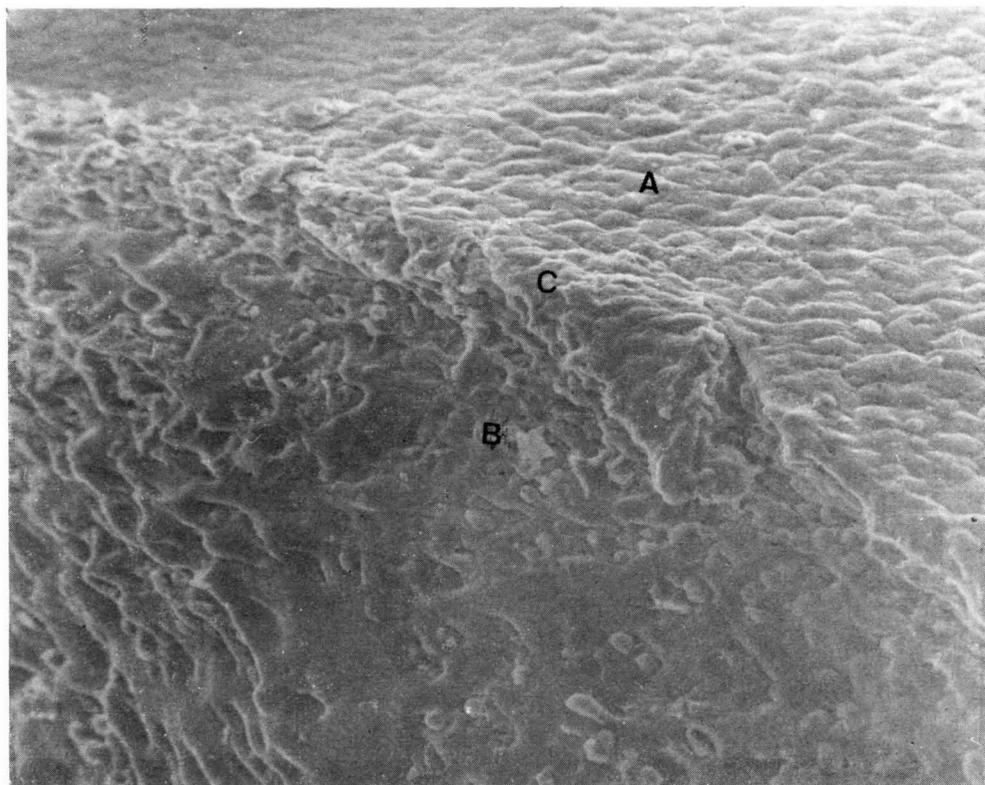


FIG. 2. — «Scanning» del cartilago articular de conejo inmaduro (x 925). Sección sagital del corte: A, zona superficial del cartilago. B, zona interior del cartilago. C, límite del corte.

blema técnico se ha visto solucionado, evitando parcialmente el empleo de estas sustancias amorfas (por ejemplo, con alcali-dihidro) o por el uso de luz polarizada o microscopía en contraste de fases.

La microscopía electrónica ha confirmado la presencia de numerosas fibras, teniendo muchas de ellas la característica morfológica de la colágena. Las fibras de colágena se presentan en bandas de electrodensidad alineadas transversalmente al eje axial de las fibras y el patrón formado por una secuencia consecutiva de bandas de repetición, repetidas igualmente a intervalos regulares con una periodicidad de 64 nm. (640 Å) a lo largo de la longitud de la fibra (BONI y MONTELEONE, 1957).

En el cartílago articular de la rodilla

de algunos adultos las fibras de colágena miden aproximadamente de 30 a 80 nm. de diámetro (WEISS, ROSEMBERG y HELFET, 1968). En adición al tipo usual de bandas de fibras de colágena, el cartílago articular del adulto humano, ocasionalmente, contiene colecciones de anchas fibras de colágena de unos 150 nm. o más de diámetro, con prominentes bandas periódicas.

Esta especial matriz pericelular es debida a las fibras de colágena típicas y contrasta en textura con las fibras más gruesas de la matriz intercelular que forman el tamaño y volumen del cartílago articular.

Con la introducción del microscopio electrónico, algunos investigadores han demostrado una desorganización mayor de

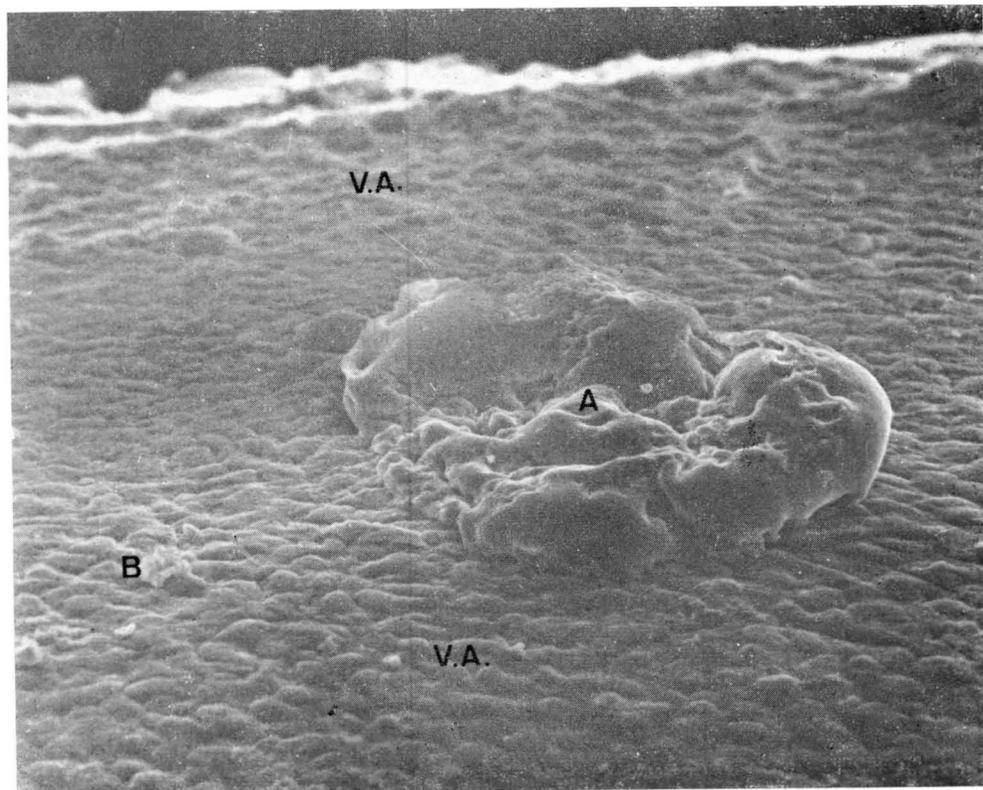


FIG. 3. — «Scanning» de cartílago articular de conejo inmaduro (x 1.350). Zona superficial en su vertiente articular (V. A.) (A), conglomerado de líquido sinovial (B), detritus celular.

las fibras, virtual ausencia de arcos continuos y carencia de organización de la condrona (CAMERON y ROBINSON, 1958; MCCONNAILL, 1951; LITTLE, PIMM y TRUETA, 1958). El diámetro de la fibra y la distancia entre las adyacentes parecen incrementar con la profundidad desde la superficie articular (MAROUDAS y BULLOUGH, 1968).

Se ha postulado que la colocación de estas fibras sirve realmente como una importante ayuda para la elasticidad.

Respecto a los condrocitos del cartílago articular, podemos decir en líneas generales que parecen células del tejido conectivo al microscopio óptico y electrónico. Morfológicamente difieren desde las formas redondas y ovaladas hasta las aplanadas, dependiente de la zona en donde se encuentran. Su tamaño puede oscilar hasta las 20 micras en su diámetro más largo (BARNETT, DAVIES y MACCONNAILL, 1961).

Su núcleo es a menudo excéntrico, redondeado y fuertemente basófilo con los colorantes hematoxilina-eosina, midiendo entre 4 y 6 micras de diámetro (MANKIN y BARON, 1965).

La estructura celular al microscopio electrónico ha sido extensamente estudiada en los últimos años, en especial por DAVIS y cols. (1962), SILBERBERG y cols. (1961 y 1964), SILBERBERG (1968), MEACHIM (1967), entre otros. Las características varían considerablemente, dependiendo de donde se encuentra la célula, pero la célula típica de la zona de transición muestra un núcleo excéntricamente situado, a menudo reniforme o de modo lobulado con uno o más nucléolos prominentes. La membrana celular está bien definida. Generalmente hay un destacado aparato de Golgi con apretadas laminillas agranulares con dilataciones, pequeñas vesículas y vacuolas. En la zona correspondiente al complejo aparato de Golgi, existen grandes vacuolas que no contienen mucho material amorfo así como fibrillas intracelulares. Hay numerosas mi-

tocondrias (SILBERBERG, 1968) y el retículo endoplásmico está bien desarrollado con numerosas cisternas cuyo contenido tiene más electrodensidad que el material que las rodea (SILBERBERG y cols., 1961 y 1964).

Pequeñas vesículas picnóticas están a menudo presentes en el citoplasma, particularmente en la superficie celular (WEISS, ROSEMBERG y HELFET, 1968). Se ven con frecuencia gotas de lípidos a través del citoplasma (COLLINS, GHADIALLY y MEACHIM, 1965) y hay numerosas agregaciones de glucógeno que en algunas células forman grandes depósitos. Se han observado filamentos intracitoplasmáticos y cuando están presentes en número excesivo parece tener correlación con la degeneración de las células (MEACHIM y ROY, 1967). Se puede ver ocasionalmente un microtúbulo.

La membrana plasmática, aunque bien definida, es de irregular contorno pero a diferencia de los osteocitos, no muestra largos procesos protoplasmáticos en condiciones normales. Sin embargo, si se aprecian procesos cortos, a modo de huellas (SILBERBERG, 1968) e impresiones con un patrón ondulado, se sugiere que ha habido una descarga reciente de contenido vacuolar de la superficie (WEISS y cols., 1968). Inmediatamente alrededor de la célula hay un halo que ha demostrado ser rico en mucopolisacáridos pero pobre en colágeno.

Las características de las células en otras zonas pueden diferir considerablemente. Las células planas y alargadas de la zona superficial muestran un tanto menor desarrollado el retículo endoplásmico con grandes y abundantes cisternas. Las mitocondrias son pequeñas y el aparato de Golgi forma numerosos sáculos aparentemente aplanados y desprovistos de material refringente.

En las capas más profundas, las células muestran con frecuencia signos de degeneración y los filamentos citoplasmáticos intracelulares son más abundantes.

La muerte de las células se puede ver en cualquier zona pero es más frecuente en las zonas radial y calcificada. En animales adultos, las células de las capas basales no incorporan citidina <sup>3</sup>-H, indicador de síntesis del RNA y sugiriendo que están muertas o en fase inerte (MANKIN, 1963).

Una de las áreas de mayor confusión en el pasado ha estado relacionado con la proliferación cinética de los condrocitos. Las figuras mitóticas que se habían observado en el cartílago articular de los animales jóvenes sugirió que, por lo menos durante la fase de síntesis neta de crecimiento, se produce la reproducción celular por los métodos normales (ELLIOTT, 1936; MANKIN, 1962; MANKIN, 1968). Con el cese de crecimiento en longitud y el cierre de la epífisis, los condrocitos del cartílago articular adoptan una apariencia inerte, no comprobándose figuras mitóticas en el cartílago articular normal de animales adultos; bajo estados de tensión anormal, como es el daño lacerativo (MANKIN, 1962 y 1968), o la ligera compresión (CRELIN y SOUTHWICK, 1960 y 1964), las figuras mitóticas se ven ocasionalmente pero en el cartílago articular normal humano del adulto no hay evidencia de actividad de mitosis en los condrocitos. A medida que el animal envejece, las células del cartílago se presentan con un nucléolo irregularmente formado, creyendo algunos autores que presentaban evidencia de una división por amitosis (MANKIN, 1963).

Este misterioso proceso se consideraba como una importante característica en el metabolismo del cartílago al envejecer, a pesar de diversas incontingencias en su teoría básica cuando se revisó a la luz del moderno conocimiento genético (MANKIN, 1963).

Los estudios de incorporación de timidina y las determinaciones citofotométricas en el cartílago articular adulto han frac-

sado al querer demostrar evidencia en la síntesis del DNA. Estos experimentos deben sugerir que la división por amitosis no ocurre y no hay compensación entre la muerte de las células normales y la atricción sufrida con la edad. Tal concepto debe predecir que la cantidad de células en el cartílago articular decrecería con la edad y esto se ha demostrado que es cierto en conejos (MANKIN, 1963) y ganado vacuno (ROSENTHAL, BOWIE y WAGONER, 1941). Estudios similares con material humano han indicado, sin embargo, que hay poca o ninguna disminución en la cantidad de células, aun en edades avanzadas (MEACHIM y COLLINS, 1962; STOCKWELL, 1967). Estos estudios son todavía inexplicables.

Debería señalarse que, al contrario que en otras células de otros tejidos, tales como cerebro o músculo, el condrocito del cartílago articular parece que en la madurez desconecta el contacto que existe con la síntesis del DNA en vez de romperlo (MANKIN, 1970). Así, bajo indicaciones como son la acromegalia, la ligera compresión continua, la osteoartritis, la célula del cartílago es capaz de volver a un estado condroblástico y presentar la división por mitosis. Los resultados de tal actividad han sido en cierto modo contrariantes, pues la respuesta es limitada y parece insuficiente para reparar los defectos lacerativos en la superficie (MANKIN, 1970), o regenerar el cartílago destruido por la osteoartritis u otros procesos patológicos.

#### Nutrición del cartílago articular

La fuente de los materiales nutritivos para el cartílago articular ha sido uno de los mayores rompecabezas relacionado con este tejido. Dado que el tejido es avascular, se ha pensado que la mayoría de los materiales nutritivos se difunden por la estructura desde el líquido sinovial que

baña la superficie del cartílago, pero la evidencia de este hecho fue divulgada por VIRCHOW (1863), motivando opiniones divergentes. En 1920, STRANGEWAYS demostró que la única fuente de nutrición del cartílago articular era el líquido sinovial y los trabajos de COLLINS (1965), llegaban a la misma conclusión. Por otro lado, los estudios de difusión de colorantes de BROVER, AKAHOSHI y ORLIC (1962), así como otros empleando diversos substratos (MAROUDAS, BULLOUGH y SWANSON, 1968), confirman este punto de vista. Sin embargo, en los últimos veinte años, INGELMARK y SÄÄF (1948), EKHOLM (1951) y MCKIBBEN y HOLDSWORTH (1966), presentaron evidencia experimental de que por lo menos una porción de los materiales que entran en el cartílago articular llegan por difusión de la zona más distal del hueso y de la placa epifisaria. En una revisión general de estos trabajos realizados en animales inmaduros, en el que la zona calcificada no está bien formada, las capas basales del cartílago articular están particularmente alimentadas por difusión de mamelones vasculares del núcleo epifisario. Sin embargo, cuando aparece la zona de «tide mark», la deposición de sales de apatita en la zona calcificada, deben de limitar considerablemente este tipo de difusión, siendo el pensamiento actual respecto a este problema, que es muy poca, si alguna, la nutrición que cruza del hueso basilar después de alcanzarse la madurez.

### Composición química del cartílago articular

Una de las características del cartílago articular es su estado de hiperhidratación. Las diversas valoraciones del contenido acuoso en el cartílago oscilan entre el 65 por 100 y el 85 por 100. La mayor parte de este agua está en forma de gel en combinación con los mucopolisacáridos, pu-

diendo ser extraída bien por desecación o calentamiento (al contrario que en el hueso, en el que el alto porcentaje de agua está estrechamente ligado a las fibras de colágena o al cristal cálcico). La concentración disminuye muy ligeramente con la edad pero parece estar incrementada en el cartílago de las articulaciones con osteocondritis (LINN y SOKOLOFF, 1965; BOLLET, 1967; BOLLET y NANCE, 1966).

Algunos estudios han sugerido que el comportamiento elástico del cartílago articular depende en gran parte del contenido en agua (ELMORE, SOKOLOFF, NORRIS, CARMECI, 1963; SOKOLOFF, 1963), pero estas conclusiones pueden ser considerablemente modificadas por la presencia de cationes bivalentes o trivalentes (SOKOLOFF, 1963).

La concentración de electrolitos es esencialmente la misma que la que encontramos en los líquidos intracelular y extracelular de los tejidos (EICHEBERGER, AKENSON y ROMA, 1958; MILES y EICHEBERGER, 1964), con dos excepciones: las concentraciones del sulfato, tanto libre como ligado, son extraordinariamente altas (ANDERSON, LUDOWIEG, HARPER y ENGLEMAN, 1964; MANKIN y LIPPIELLO, 1969; SMITH, PETERS y SERAFINI-FRACASSINI, 1967), como se puede adelantar a la vista de la concentración del polisacárido sulfatado; y hay un incremento en la concentración de sodio que sirve como el principal catión de la estructura polianiónica. Los estudios de MAROUDAS y cols. (1968a, 1968b y 1969) han indicado que los electrolitos atraviesan la estructura del cartílago rápidamente pero el coeficiente de difusión es aproximadamente del 40 por 100 del de una solución acuosa. La velocidad de difusión es igual en el cartílago fresco que en tejido obtenido de autopsia, indicando éste que el proceso es más pasivo que dependiente de la actividad celular. De acuerdo con experimentos adicionales, la di-

fusión depende primariamente de la carga de densidad fijada y la fijación del medio líquido. Las moléculas no lo atraviesan tan rápidamente y la glucosa tiene un coeficiente de difusión aproximadamente del 30 por 100 del de una solución acuosa. Los colorantes catiónicos atraviesan más rápidamente que los aniónicos indicando la afinidad por la estructura polianiónica y la importancia de predecir la velocidad de difusión (KANTOR y SCHUBERT, 1957).

Más del 50 por 100 del peso en seco del cartilago articular y alrededor de un 90 por 100 del contenido de proteína está en forma de colágeno. A pesar de los repetidos intentos de separar esta molécula químicamente de la proteína polisacárida ha llevado siempre al fracaso en producir un colágeno puro (MILLER, VANDERKORST y SOKOLOFF, 1969; SCHUBERT, 1964).

Se ha demostrado que la mayor parte del colágeno del cartilago articular es insoluble en el agua o ácido diluido y sólo se puede extraer del 1 por 100 al 2 por 100 en soluciones 5-molar de guanidina hidrocloreica. La composición aminoácida parece ser idéntica a la de otros colágenos aunque una reciente aportación de MILLER, VANDERKORST y SOKOLOFF (1969), sugieren una mayor cantidad de hidroxilina. MATHEWS (1965), indica que hay una compleja interacción de ácidos mucopolisacáridos y colágeno que es bastante estable y probablemente asociada con una cadena de interacciones entre los condroitinsulfatos y las fibras de colágena. La estabilidad del complejo parece depender de fuerzas electrostáticas e incrementa con el aumento en longitud de la cadena polisacárida.

La distribución y tamaño de las fibras de colágena varían según el nivel estudiado. En algunas áreas se han visto fragmentos desagrupados, menores y más solubles con el microscopio electrónico y que consideran algunos autores que representan fragmentos tropocolágenos (CAMERON y RO-

BINSON, 1958). La mayoría de las fibras, considerablemente mayores, varían entre los 250 Å a más de 900 Å de anchura, mostrando una agrupada y periódica muestra de colágeno nativo (SILBERBERG, 1968).

La mayor parte de los componentes sólidos orgánicos del cartilago articular, son las proteínas polisacáridas. El núcleo proteínico varía considerablemente en tamaño y composición aminoácida, pero la unidad básica se presume que sea de unos 4.000 Å de largo con 60 cadenas laterales de polisacáridos (MUIR, 1964; SCHUBERT y HAMMERMAN, 1968).

Los estudios de SCHUBERT y cols. (1964 y 1968) han demostrado que las proteínas polisacáridas son heterogéneas y pueden ser separadas por ultracentrifugación en dos grupos principales, con propiedades físicas y químicas diferentes (PP-L y PP-H).

La molécula de PP-L ha sido subdividida en una serie de materiales de características ligeramente variadas. La molécula polisacárida consiste en una cadena de unidades repetidas de glicosaminglicanos (GAG), siendo esta expresión la preferida por algunos autores por ser la más descriptiva.

El número de unidades sacáridas en una macromolécula puede oscilar entre 50 y 50.000 (SCHUBERT, 1964). En el cartilago articular sólo se han encontrado tres de las muchas unidades GAG y éstas son: — Chondroitin-4 sulfato (N-acetil-galactosamina con  $SO_4^-$  en la posición 4-carbón y ácido glucorónico).

— Chondroitin-6 sulfato (N-acetil-glucosamina con  $SO_4^-$  en la posición 6-carbón y ácido glucorónico).

— Sulfato de queratina (N-acetil-glucosamina con  $SO_4^-$  en la posición 6-carbón y galactosa).

La larga cadena de moléculas polisacáridas está unida al centro proteínico por un enlace O-glucósido-serina y la unión se

piensa que está formada por un glucoronil-galactosil-galactosil-xililil serina (RODEN, 1968; HELTING y RODEN, 1968).

Las proteínas polisacáridas no están distribuidas difusamente por el cartílago sino que se encuentran en altas concentraciones rodeando las células, «áreas perilanguares o zonas territoriales» (LOEWE, 1965; BARLAND, JANIS y SANDSON, 1966; STOCKWELL y SCOT, 1967). La concentración decrece en la porción más superficial de la zona deslizante y es también significativamente menor en las regiones interterritoriales, excepto el sulfato de queratina que esta primordialmente localizado en dichas zonas. El más preponderante en el cartílago articular: el condroitin-6 sulfato. La concentración de condroitin-4 sulfato se incrementa en tejidos embrionarios pero disminuye rápidamente en el período postnatal y puede bajar lentamente en edades avanzadas.

El sulfato de queratina se presenta en concentraciones muy bajas en el cartílago joven (KUHN y LEPELMANN, 1958) pero lentamente aumenta con la edad y cuenta con un pequeño porcentaje de GAG (HOFMAN y MASHBURN, 1967), al contrario que el cartílago costal en donde hay un rápido y progresivo crecimiento del sulfato de queratina con la edad (KAPLAN y MEYER, 1959).

Las proteínas sacáridas tienen un cierto número de propiedades físicas y químicas consideradas como importantes para la elasticidad de la superficie articular y probablemente ayudan a proporcionar agua para la lubricación de la superficie. Estas propiedades están relacionadas con la viscosidad, la capacidad de fijación del agua y el carácter polielectrolítico de esta compleja macromolécula.

Como indicábamos anteriormente, la proteína polisacárida está íntimamente unida al colágeno y puede servir para dirigir y mantener la posición espacial de la pro-

teína fibrosa y posiblemente prevenir la calcificación (HOWEL y cols., 1969).

Otra propiedad conferida al cartílago articular por los polisacáridos es la de la coloración metacromática (QUINTARELLI, 1968; SPICER, HORN y LEPI, 1967). Tinciones como el azul de alcian, azul de toluidina, celeste A, violeta cristal y otros, sirven de cationes a la proteína polianiónica polisacárida.

Pequeños cristales de la tinción polimerizan en una situación espacial dictada por la situación de los sulfatos disponibles y con una concentración y colocación críticas que cambiarán el espectro de la luz transmitida del color ortocromático al color metacromático. Este fenómeno es selectivamente para los polisacáridos y puede usarse como un indicador de la concentración y distribución de este material dentro del cartílago (SPICER, HORN y LEPI, 1967).

Otros materiales orgánicos se encuentran en pequeñas cantidades en el cartílago articular. Entre ellos se incluyen el ácido siálico, probablemente en forma de sialoproteína y seguidamente en combinación con los complejos proteínicos polisacáridos (HERRING, 1968). En adición a COLLINS y cols., (1965) y GHADIALLY y cols. (1965), describieron lípidos en las células y en la estructura del cartílago humano, detectables por los colorantes específicos solubles en las grasas. La concentración es muy baja, siendo desconocida la exacta naturaleza y siendo menor al 4 por 100 del peso del cartílago mojado (STOCKWELL, 1967).

También se han descrito enzimas en el cartílago articular como veremos en su metabolismo.

#### Metabolismo del cartílago articular

Hasta hace aproximadamente 20 años se sabía poco del metabolismo del cartílago

articular. Los primeros estudios se referían a medidas de la actividad respiratoria, sugiriendo que el cartilago tenía una baja proporción metabólica (BYWATERS, 1937). Posteriormente aportaciones a estos datos señalaron que la proporción por unidad de masa era realmente baja pero a causa de la esparcida población celular era considerablemente más alta que la encontrada en otros tejidos (DICKENS WEIL-NALHERBE, 1936).

Diversos estudios sobre la glicolisis en tejidos cartilagosos han demostrado la presencia de la mayoría de los enzimas glicolíticos en grandes cantidades (KRANE, PARSONS y KUNIN, 1967; LUTWAK-MANN, 1940).

El cartilago articular ha demostrado ser relativamente tolerante a altas concentraciones de cianuro potásico (MANKIN y ORLIC, 1964), solo afectando mínimamente, por cortos períodos de privación de oxígeno pero muy sensiblemente al monoiodoacetato.

Estos datos referidos, más el descubrimiento de una alta concentración de ácido láctico sugirió que la muestra metabólica es consistente con el carácter avascular del tejido y que el camino anaerobio está bastante bien definido.

Recientes estudios de KRANE, PARSONS y KUNIN (1967) en el cartilago epifisario, demostraron que este tejido tiene un bajo consumo de oxígeno, una alta producción anaerobia de lactato y carácter anaerobio al componente láctico-deshidrogenasa. Aunque estos datos se aplican a un tipo de cartilago diferente, parece que el cartilago articular tiene un modelo similar.

Los primeros investigadores adelantaron la perspectiva de que las células del cartilago estaban inertes y que ocurría poca actividad sintética. Hace casi 20 años, estudios con radiosulfato, indicaban sorprendentemente una rápida actividad por lo menos de uno de los componentes de la

estructura. Estos estudios han sido ampliados por bastantes investigadores, entre los que nos incluimos.

El condrocito, como muchas de las células del tejido conectivo, soporta múltiples procesos y actividades sintéticas. Se ha demostrado que hay por lo menos tres tipos de actividad sintética mantenida por el condrocito, siendo realizadas estas funciones por una misma unidad celular y que todas ellas ocurren simultáneamente en períodos muy cortos de tiempo (CAMPO y DZIEWIATKOWSKI, 1962; STROMINGER, 1964). Las tres funciones incluyen la síntesis de la proteína polisacárida y colágeno, la síntesis del polisacárido (y su polimerización) y finalmente la sulfatación del polisacárido.

La síntesis de la proteína del protein-polisacárido y el colágeno, parece coincidir con el plan «standard» de la genética molecular. El mensaje es llevado desde el DNA nuclear al ribosoma por el mensajero RNA; los aminoácidos llevados por S-RNA están reunidos en el ribosoma en cadenas de colágeno o moléculas proteínicas; la unidad proteínica completada es vertida al exterior. Estudios empleando puromicina, potente inhibidor de la síntesis proteínica (que actúa interfiriendo la condensación amino-acil-S-RNA), han demostrado una completa inhibición de incorporación de aminoácido en la célula en un corto período de tiempo (ADMSON, GLEASON y ANAST, 1964). Cuando la actinomicina-D, inhibidor del mensajero RNA, es presentado al tejido *in vitro*, la actividad sintética continúa sin aparente decadencia, aproximadamente seis horas y luego cesa (el espacio de seis horas es compatible con la vida del mensajero RNA en otros tejidos).

Todos estos estudios soportarían la validez del concepto de que por lo menos esa porción de la actividad sintética de la célula destinada a la síntesis de la proteína

se produce por un camino genético «standard».

Un segundo proceso complejo sintético, realizado por la célula, es el de la síntesis y polimerización de los polisacáridos. La formación de esta macromolécula se realiza a través de unos complejos estadios en lo que una molécula de glucosa está vinculada al difosfatouridina (UDP) y a través de los muchos caminos enzimáticos se convierte en difosfato de uridina N-acetil-galactosamina.

El ácido glucorónico está sintetizado a través de la glucosa por un sistema similar, usando también UDP y los dos azúcares están unidos por un eslabón de éter para formar la primera unidad del dímero glucosaminglicano del polímero.

Se ha encontrado una cantidad de enzimas asociadas con estos procesos complejos e incluyen difosfoquinasa-nucleósido, UDP glucosa-pirofosforilasa, UDP glucosa-deshidrogenasa y una variedad de transferasas e isomerasas (STROMINGER, 1964).

La tercera actividad es la de sulfatación que es la adición de un sulfato a los lugares apropiados del polisacárido. El método es bastante diferente al de los otros dos procesos sintéticos y envuelve una combinación de ATP y sulfato libre para formar 3-fosfoadenosin 5-fosfosulfato, conocido como «sulfato activo» (D'ABRAMO y LIPMANN, 1957; PASTERNAK, 1960). Una molécula de sulfato de esta materia de alta energía se encuentra vinculada a la molécula de N-acetilgalactosamina en la posición C<sub>4</sub> ó C<sub>6</sub> (STROMINGER, 1964).

Como indicamos anteriormente, hicimos referencia de que existe evidencia para sugerir que toda la molécula de la proteína polisacárida está sintetizada casi simultáneamente por la célula (DORFMAN, 1964). Puede haber algún retraso en la sulfatación temporalmente (GODMAN y LANE, 1964; PERLMAN, TESLER y DORFMAN,

1964), pero recientes estudios bioquímicos sugieren que éste es mínimo.

Los estudios con microscopio electrónico de GODMAN y LANE (1964) demostraron autorradiográficamente que el radio-sulfato está ligado y concentrado en las vesículas yuxtannucleares del aparato de Golgi del condrocito, a los tres minutos de la presentación en la célula.

Una de las técnicas más útiles para la determinación cuantitativa de la actividad metabólica del tejido, consiste en utilizar trazadores isotópicos específicos para los productos macromoleculares de síntesis. De este modo, la velocidad de síntesis y degradación puede ser determinada por la síntesis proteínica experimentalmente, por destello espectrométrico del cartilago marcado con glicina-H<sup>3</sup> (MANKIN y ORLIC, 1964); los polisacáridos se pueden estudiar similarmente después de su exposición al radio-sulfato o acetato marcado C<sup>14</sup> o glucosamina C<sup>14</sup>.

Se han realizado varios experimentos de este tipo demostrando que:

- Las velocidades de síntesis son rápidas y lineales con el tiempo.
- Son más rápidas en animales inmaduros pero después de la decadencia inicial se mantiene constante a pesar de la edad.
- Están inhibidos por el cortisol (MANKIN y CONGER, 1966a y 1966b), así como una serie de antimetabólicos.
- Están moderadamente incrementados por un corto período de tiempo por daño lacerativo.
- Son más rápidos en cartilago de articulaciones osteoartríticas.

Estudios de degradación de la superficie articular han demostrado que, una vez incorporados, ambos, glicina-H<sup>3</sup> (DE LUCA y GILBER, 1968) y SO<sup>4</sup> tiene una rápida velocidad de desaparición con una vida media en el cartilago articular de animales adultos de unos ocho días. Estudios recien-

tes han demostrado que estos datos describen el comportamiento metabólico de una «fracción rápida» de la proteína polisacárida y que es mayor que un cuarto del contenido total de este material en el cartílago articular (MANKIN y LIPPIELLO, 1969). Esto sugeriría que la velocidad de degradación del tejido es extraordinariamente rápida y lejos en exceso de lo que se puede considerar como necesario para compensar la normal atricción. La rapidez de ambas velocidades de síntesis y degradación de un tejido que probablemente experimenta sólo una mínima pérdida atriccional, sugiere la presencia de un sistema activo de reformación.

Durante muchos años se ha sabido, se ha conocido que existen ciertos enzimas que actúan degradando la matriz del cartílago articular. La papaína, ha demostrado histológicamente que causaba una pérdida de la basofilia y de la metacromasia, así como una depleción profunda de la proteína polisacárida a través de análisis bioquímicos (THOMAS, 1964).

Se supone que esta enzima actúa sobre el núcleo proteínico de la proteína polisacárida. También sabemos igualmente que la vitamina A, a grandes dosis, tiene un profundo efecto condrolítico, semejante al observado con la papaína (FELL y DINGLE, 1964). Se pensó que esto ocurría por activación o estimulación de los lisosomas y la descarga de sus contenidos proteolíticos en la matriz.

La hialuronidasa, enzima muy frecuente en muchos tejidos, también provoca la degradación del cartílago pero probablemente actúa para dividir la cadena de polisacáridos, dejando el núcleo de la proteína intacto (MUIR, 1964).

Los sistemas enzimáticos descritos, sugieren un sistema de reformación capaz de «dar la vuelta» a una gran fracción del cartílago articular relativamente en poco tiempo (MANKIN y LIPIELLO, 1969). La

finalidad de este sistema es todavía desconocido pero una posible explicación es que sería necesaria para mantener la alta afinidad normal por el agua de la proteína polisacárida (MANKIN, 1970).

### Metabolismo del S<sup>35</sup>

En la investigación del cartílago articular han sido utilizados diferentes radioisótopos para el estudio de sus diferentes aspectos de crecimiento, regeneración y metabolismo. De esta forma, la actividad reproductora de los condrocitos, la condrogénesis, ha sido estudiada mediante la timidina-H<sup>3</sup> por KEMBER (1960), TONNA y cols. (1961 y 1962), MANKIN (1962 a y b; 1963 a y b), MANKIN y ORLIC (1964), PUIG ROSADO (1971) y GARCÍA PENALVA (1972).

El metabolismo proteico del condrocito que es su principal función, ha sido estudiado mediante la incorporación de aminoácidos marcados, bien en uno de sus carbonos, bien en uno de sus hidrógenos, como por ejemplo, la glicina-C<sup>14</sup> (MANKIN y CONGER, 1966 a y b) o la glicina-H<sup>3</sup>.

Un estudio particular es el estudio del metabolismo de los mucopolisacáridos sulfatados mediante la introducción en el cartílago, tanto *in vitro* como *in vivo*, del S<sup>35</sup> (McELIGOT y COLLINS, 1960; MEACHIM y COLLINS, 1962).

### El sulfato S<sup>35</sup>

Desde 1949, en que la incorporación del sulfato marcado con S<sup>35</sup> en cortes de tumores y de cartílago fue demostrada por LAYTON, esta técnica se ha mostrado excelente en el estudio de las sustancias fundamentales, en particular la del cartílago articular.

Posteriormente, diversos autores han

estudiado y completado esta técnica, demostrando que era la célula activa la que captaba el  $S^{35}$  y lo incorporaba a su metabolismo y, en particular, como en el caso

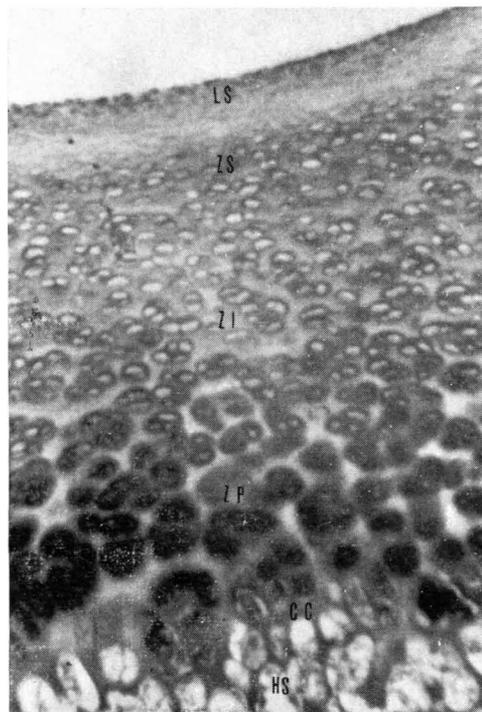


FIG. 4. — Estratificación del cartílago articular, mostrando la incorporación del  $S^{35}$ . El ennegrecimiento de la pieza indica su incorporación, especialmente en el estrato profundo. LS, «lámina splendens». ZS, zona superficial. ZI, zona intermedia. ZP, zona profunda. CC, cartílago calcificado. HS, hueso subcondral.

del condrocito, el radioisótopo era captado e incorporado en la síntesis de las proteínas azufradas y mucopolisacáridos sulfatados, especialmente el condroitinsulfato (LAYTON, 1951 y 1952; BOSTROM, 1954; McELLIGOTT y COLLINS, 1960).

Así pues, el  $S^{35}$  marca selectivamente los condrocitos vivos, no así los condrocitos necróticos ni las vivas de la serie osteoblástica.

El empleo de otros isótopos (amino-

ácidos marcados) para el estudio del metabolismo proteico del condrocito, puede dar lugar a fuentes de error. Así, la glicina- $H^3$ , por ejemplo, es menos específica que el  $S^{35}$ , ya que una parte de aquélla entra a formar parte de las purinas del metabolismo del RNA.

No va a existir aquí el problema de la emisión beta, en lo que respecta a la impresión de la película fotográfica, aunque sin embargo, este isótopo tiene el inconveniente de poseer un factor de desintegración por día bastante alto ( $f_d = 0'008$ ), con una vida media de ochenta y siete días, lo que hay que tener en cuenta al tiempo de usarlo en la autorradiografía.

El azufre radiactivo se emplea normalmente bajo la forma de sulfato sódico ( $^{35}SO_4Na_2$ ). El isótopo  $S^{35}$  tiene características similares al tritium. Emite radiaciones beta negativas de baja energía, aunque la energía máxima de radiación, 0'167 MeV., es algo mayor que la del tritio. La energía media de radiación es de 0'05 MeV., y la penetración máxima de la radiación en agua es de 0'3 milímetros.

El sulfato radiactivo puede ser incorporado en el cartílago *in vivo* o *in vitro* sin que por esto último el condrocito pierda capacidad de captación del isótopo, pues se ha demostrado que incluso hasta veinticuatro horas después de la muerte del organismo, las células cartilaginosas presentan aún gran parte de su capacidad de sintetizar mucopolisacáridos (MEACHIM y COLLINS, 1962).

La medición del isótopo incorporado en el cartílago puede hacerse mediante conteo con un contador Geiger-Müller lo que supondría el empleo de técnicas especiales con la consiguiente destrucción del cartílago (BOSTROM y cols., 1953), o bien mediante el empleo de las técnicas autorradiográficas, que si bien no es un método totalmente cuantitativo, tiene la ventaja de conservar intacta la preparación

histológica y permitir la identificación topográfica del isótopo (figs. 4 y 5) ARGÜELLES, 1976).

El autorradiograma ha mostrado que el cartílago articular normal presenta tres zonas claramente diferenciadas con distinta actividad en cuanto a la incorporación del sulfato radiactivo:

1. Las células superficiales presentan una escasa o nula capacidad de síntesis del condroitinsulfato.

2. La región fijadora del sulfato comprende la zona situada entre el estrato superficial y la zona de cartílago calcificado, es decir, corresponde aproximadamente los estratos intermedio y profundo del cartílago articular. Esta última región presenta la máxima capacidad de fijación del  $S^{35}$ .

3. Las células del cartílago calcificado no tienen actividad para la fijación del  $S^{35}$ , por lo que carecen de capacidad de síntesis del condroitinsulfato.

Todo esto ha sido negado recientemente por MANKIN y LIPPIELLO (1969), los cuales encuentran que la distribución del  $S^{35}$  en el cartílago articular, lo mismo que su desaparición (la cuarta parte al cabo de los ocho días), está uniformemente reparado por todo el cartílago.

El isótopo aparece primero en los condrocitos y después de dos horas se presenta en la sustancia fundamental y al cabo de los seis días sólo se encuentra en la matriz.

La captación del  $S^{35}$  y por lo tanto la síntesis de los mucopolisacáridos disminuye en diversas circunstancias: déficit vitamínico (hipoavitaminosis A y C), diversos agentes antiinflamatorios (ácido salicílico, salicilatos, fenilbutazonas), algunos venenos celulares comunes (compuestos cianhídricos, yodo-acetato), el calor excesivo y por la simple inmovilización de una articulación.

Por el contrario, aumenta la captación

del  $S^{35}$  por parte del cartílago, la acción de la hormona del crecimiento (STH), hormona tirotrópica e insulina.

#### La sulfatación en el condrocito

Por medio de técnicas autorradiográficas, diversos autores han demostrado en el cartílago embrionario de la rata que el radiosulfato es concentrado y almacenado sólo en las vesículas yuxtannucleares del aparato de Golgi, por secreción condrocítica, a los tres minutos de su administración. De esta zona, las vacuolas emigran periféricamente y se alojan en la subcorteza. Sus contenidos sulfatados son entonces descargados a la matriz extracelular. La marca aparece frecuentemente locali-

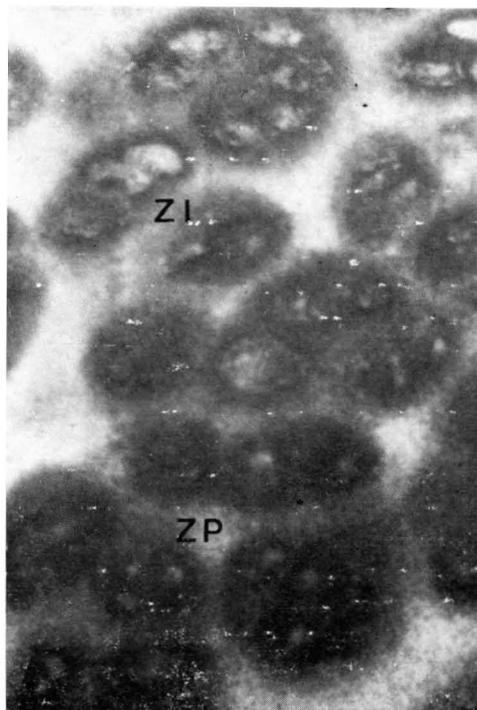


FIG. 5. — Detalle de la figura 4, correspondiente al estrato intermedio y profundo. Gran actividad del  $S^{35}$ .

zada en un denso contenido de las grandes vacuolas. La localización del radiosulfato no es detectable en otras organelas. Los gránulos metacromáticos hialuronidasensitivos intracelulares se encuentran principalmente en las células periféricas rodeándolas, raramente yuxtannucleares al Golgi.

La captación en el cartilago articular del sulfato  $S^{35}$ , ya sea *in vivo* o *in vitro*, es generalmente la consecuencia de la síntesis de los principales sulfomucopolisacáridos, condroitinsulfato A y C.

El radiosulfato es primero concentrado en los condrocitos en forma de condroitinsulfato (DZIEWIATKOWSKI, 1951).

Este producto es después secretado hacia la matriz extracelular (BELANGER y LEBLOND, 1946) como una compleja proteína sulfomucopolisacárida (CAMPO y DZIEWIATKOWSKI, 1962). Una teoría aceptada es que la síntesis del polisacárido a través de los intermediarios del nucleótido uridina, así como la esterificación del sulfato por transferencia enzimática de 1-3-fosfoadenosina-5-fosfosulfato al polisacárido u oligosacárido-receptores, se produce intracelularmente. Ni la exacta naturaleza del aceptor sulfato, ni el tipo de unión del mismo, así como la sulfatación es aún conocida.

#### Ultraestructura de la secreción condrocítica

Una vez comenzada la formación de la matriz, el amplio aparato de Golgi de los condroblastos muestra numerosas y grandes vesículas con un denso contenido. Este es depositado en una extensa área próxima al núcleo, donde el hipertrofiado aparato de Golgi constituye un relativo centro cromóforo de reducida intensidad (GODMAN y LANE, 1964). Vacuolas de semejante clase han sido visualizadas periféricamente alrededor de las células y que alcanzando la

periferia se rompen y liberan sus contenidos, dando al perfil de la célula un aspecto de indentación irregular. Pequeñas vesículas con un contenido menos denso es también descargado en la superficie celular. La parte basófila del protoplasma es ocupado por el retículo-endoplásmico-rugoso que presenta unas cisternas muy dilatadas. Son especialmente prominentes los depósitos de glucógeno en las células proliferantes del área central y también en los condrocitos hipertroficados de la placa epifisaria. Se encuentran también unas formaciones quísticas en el citoplasma de secreción condroblástica, delimitados por una doble membrana, cuyos contenidos son también arrojados al exterior (GODMAN y LANE, 1964; GODMAN y PORTER, 1960; GODMAN, 1962).

#### Localización del radiosulfato

Entre los trabajos de DZIEWIATKOWSKI (1951), BELANGER y LEBLOND (1946), AMPRINO (1955) y los más recientes de GODMAN y LANE (1964), se deduce que en todos los especímenes analizados dentro de las tres horas y treinta minutos después de la administración del radiosulfato, el aspecto histológico y el radiograma son semejantes. El pericondrio y los condroblastos proliferativos superficiales presentan pocos granos. La radiactividad aumenta progresivamente, más evidente en la zona epifisaria, con intensa actividad de la zona precolumnar y en la de células hipertroficadas proximales. La proliferación de los condrocitos en el centro de la epífisis, justo a nivel de la zona proximal en donde los condrocitos vuelven a apilarse en columnas, se comprueba un conteo superior de granos que en la zona columnar y en el de células hipertroficadas. Los condrocitos degenerativos así como la zona de células hipertroficadas, examinadas una hora después de la administración del isó-

topo, incorporan relativamente poco sulfato, pero donde mayor actividad hay es en las células del pericondrio.

Sea cual fuere el tiempo tomado después de los 10 minutos, se comprueba alguna variación en la distribución de los granos, dependiente de la categoría de los condrocitos. Algunas células que están más avanzadas se ha podido comprobar que la marca está más dispersada mientras que otras células más retrasadas presentan gránulos concentrados principalmente sobre las áreas centrales del Golgi, lo que indica una asincronía de la función entre los condrocitos de la misma clase.

Precozmente, a los tres minutos de la exposición del radiosulfato «in vitro», ya sea después de un «pulsing» de 90 se-

gundos o después de tres minutos, en un medio conteniendo  $S^{35}O_4$ , el isótopo es concentrado en el condrocito. Aproximadamente el 80 por 100 de los granos se encuentran en las células comparado con la matriz adyacente. El 50 por 100 de los mismos es ya localizable en la región yuxtannuclear y en el aparato de Golgi, a través del microscopio electrónico. Este ha sido el lugar de mayor radiactividad que progresivamente comienza a disminuir después de 30 segundos. La mayoría de estos granos se han encontrado en el componente vesicular del aparato de Golgi. En los primeros estadios, los granos han sido localizados no sólo en las grandes vesículas sino también entre las pequeñas. Los autorradiogramas tomados de los especímenes,

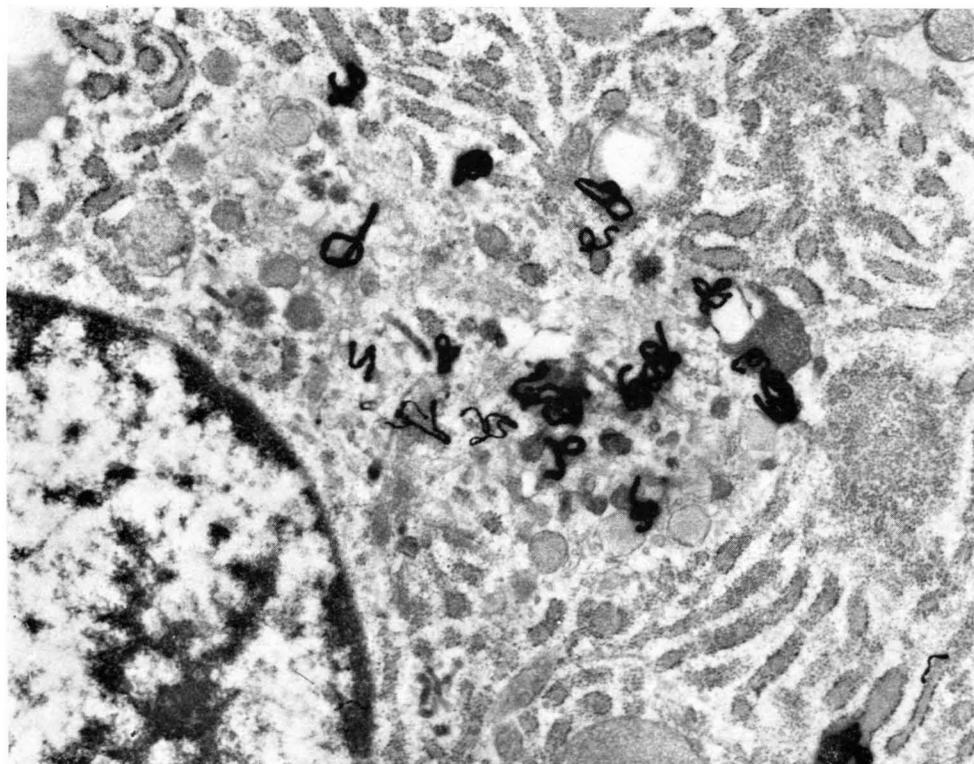


FIG. 6. — Condrocito de cartilago articular, estrato profundo (x 30.780). Intensa actividad celular, mostrando el aparato de Golgi en sus vacuolas gran afinidad por el isótopo a los 20 minutos de incorporación.

en la primera hora del marcaje, demuestran que muchos de los granos se colocan excéntricamente en relación con el centro de las vacuolas grandes, pudiéndose comprobar que la mayor radiactividad se ha localizado en la periferia de las mismas, más que en su interior. En los intervalos tardíos, los granos están normalmente cubriendo los centros o el denso contenido de las vacuolas (GODMAN y LANE, 1964).

Entre la hora y las tres horas y treinta minutos, intervalo seguido a la inyección del radiosulfato, los granos que cubren los márgenes celulares o la periferia se hacen especialmente prominentes, constituyendo

alrededor del 50 por 100 de los granos contenidos en el condrocito, al cual parecían rodear. Estos también originados a partir de las vacuolas situadas en la periferia celular o adyacentes a la cortical, cuyas vacuolas ya fueron descritas por GODMAN y PORTER (1960) y GODMAN (1962) forman un manto continuo alrededor del condrocito. Estas, así como otras vacuolas destacadas con contenidos densos similares, son dirigidas desde la zona yuxtanclear del Golgi de forma centrífuga. Los granos que cubren la matriz no parecen tener una ordenación especial o selectiva o relacionada con las fibrillas.

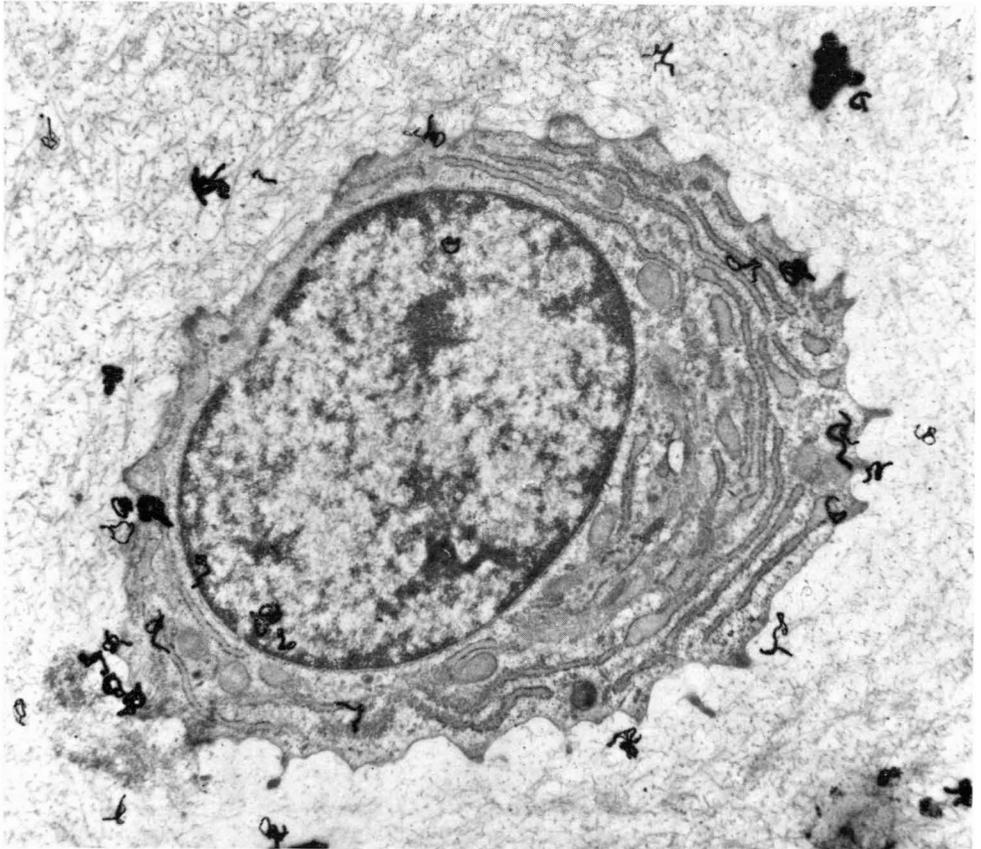


FIG. 7. — Condrocito de cartilago articular, estrato profundo (x 16.750). Obsérvese la radiactividad producida por el  $S^{35}$  a los 20 minutos de incorporación y 20 minutos de desmarca. Las glicoproteínas sulfatadas se encuentran vertidas ya al espacio extracelular.

La aparente ausencia de radiactividad en la superficie del retículo endoplásmico rugoso y los contenidos de las cisternas parece evidente, sin embargo, los trabajos de MARTÍNEZ, ARGÜELLES, CERVERA y GOMAR SANCHO (1976) (figs. 6 y 7), determinan con autorradiografía de alta resolución, no sólo la ultraestructura condrocítica sino también la biodinámica del  $S^{35}$  y sus lugares de glicosilación, demostrando que la fijación precoz del radiosulfato no sólo se realiza en el aparato de Golgi sino también en el sistema retículo endoplásmico rugoso.

#### Tránsito de la marca

El radiosulfato es captado, transportado y acumulado en la zona central del aparato de Golgi en un intervalo de tres minutos. Aproximadamente el 20 por 100 de los granos se encuentran ya en la cápsula o en la matriz alrededor de los condrocitos activos a los tres minutos de la exposición del isótopo. A los 30 minutos, y en mayor grado a los 60 minutos, hay un incremento en el número de los granos en las células periféricas o en la matriz circundante y semejante disminución se produce en el aparato yuxtannuclear del Golgi. Más de la tercera parte de los granos se encuentran localizados en la matriz a la hora de la exposición del radiosulfato y a las quince horas representa el 50 por 100.

Estos datos muy significativos nos muestran la dinámica del radiosulfato intracelular, su fijación precoz y acumulación en las vesículas del aparato de Golgi, lo mismo que los movimientos de los materiales sulfatados desde allí a las células periféricas donde son descargadas al espacio extracelular.

Los recientes trabajos de FORTEZA y colaboradores (1973) empleando aminoácidos y azúcares marcados, nos muestran

los lugares de biosíntesis y transporte intracelular de las proteínas y glicoproteínas en los fibroblastos de embrión de pollo. Si bien para el  $S^{35}$  no se ha demostrado una biodinámica tan detallada como la de estos autores, lo que sí es evidente y está

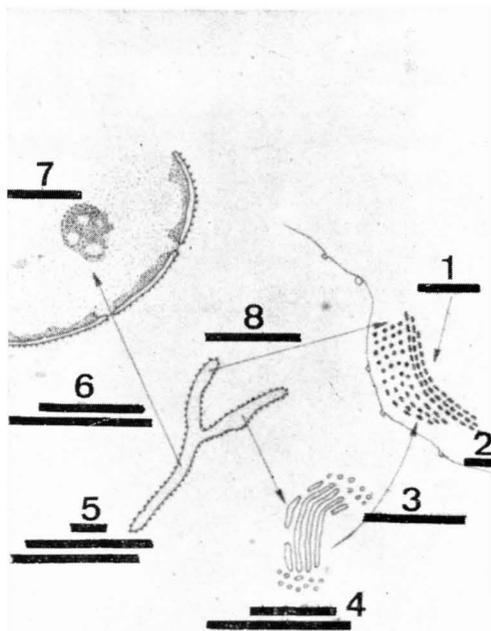


FIG. 8. — Biodinámica de los aminoácidos marcados según el esquema de FORTEZA y colaboradores (1973) semejante al del  $S^{35}$ . 1, colágena. 2, membrana. 3, glicoproteínas. 4, aparato de Golgi : Glicosilación tardía. 5, RER : Glicosilación precoz. 6, proteínas ribosómicas. 7, nucléolo. 8, procolágena.

demostrado por la mayoría de los autores es la localización del radioisótopo en el aparato de Golgi como almacenador del producto (sulfatación), (fig. 8).

La matriz del cartílago articular es marcadamente permeable al ión sulfato (CAMPO y DZIEWIATKOWSKI, 1962) que es rápidamente fijado y acumulado en los condrocitos. La selectividad permeable de estas células para captar y retener el sulfato permanece todavía oscuro. El proce-

dimiento del transporte en la membrana celular requiriendo ATP fue postulado por WHITEHOUSE y BOSTROM en 1962.

### Síntesis de los sulfomucopolisacáridos

La síntesis de los sulfomucopolisacáridos, actualmente sulfatación, se produce casi inmediatamente a la presentación del sulfato, siendo la radiactividad del condroitinsulfato detectada por los condrocitos muy precozmente. Para WHITEHOUSE y BOSTROM (1962) sería a los cinco minutos, mientras que para THORP y DORFMAN (1963) se produce a los diez minutos de la incorporación.

Esta fracción del condroitinsulfato intracelular es químicamente similar a la de la matriz, pero menos sulfatada. Por otro lado, el proceso de sulfatación actúa independientemente de la biosíntesis de los polisacáridos. La sulfatación, transformación de sulfato activo en adenosin 3'-fosfato 5'-fosfosulfato en un aceptor, es una reacción catalizada por la fosfosulfakinasa (SUZUKI y STROMINGER, 1960). Los mucopolisacáridos, condroitinsulfatos, condroitina, heparina (ADAMS, 1959) así como oligo y monosacáridos (SUZUKI y STROMINGER, 1960), pueden servir de aceptores en los sistemas celulares libres, hecho que no es evidente si la sulfatación tiene lugar en las células por esterificación de unidades mono o bien oligosacáridas y su consiguiente polimerización; o por esterificación de unidades semejantes que son añadidas a las cadenas de sulfomucopolisacáridos; o por esterificación del polímero polisacárido preformado. La evidencia habla a favor de estas dos últimas posibilidades (DORFMAN, 1963), pero no de una forma definitiva.

Se desconoce si todas las uniones se realizan de la misma forma. Aunque la mayoría de los autores señalan la virtual abolición de la radiactividad por la

hialuronidasa testicular, las observaciones de GODMAN y LANE (1964) muestran que una pequeña parte del material marcado permanece después de la acción de la hialuronidasa, de la misma forma que otros autores sugieren que puede haber un pequeño enzima resistente al residuo del enlace sulfatado en las células.

El esquema de la incorporación del sulfato marcado a una molécula aceptora se muestra claramente en los trabajos de MARTÍNEZ y cols. (1975).

### La autorradiografía en el estudio del cartílago articular

Desde la última década del siglo pasado se han realizado multitud de trabajos para estudiar la aplicación biológica de la radiactividad y su estudio por métodos fotográficos.

Una de las primeras autorradiografías que fueron realizadas intencionadamente por los esposos CURIE en 1896, fue parte del material que los llevó a descubrir la radiactividad. Por aquellos años, HENRI BECQUEREL, estudiando lo que él creía que eran fenómenos de fluorescencia, expuso una película cubierta con un papel negro bajo un cristal de sulfato de uranio, comprobando al revelar la película la silueta tenue del cristal. La naturaleza del fenómeno no se comprendió por completo hasta que los esposos CURIE demostraran la existencia de la radiactividad del uranio. El primer uso sistemático de la autorradiografía fue para buscar la radiactividad de los minerales (DE HEVESY, 1961).

La primera aplicación biológica del método fue realizada por E. S. LONDON en el Instituto Imperial de Medicina Experimental de San Petersburgo, en 1904 (BOYD, 1955). Ese mismo año LONDON publica un artículo en una revista francesa y otros dos en revistas rusas, explicando su trabajo y mostrando autorradiografías del

cuerpo de una rana que había sido expuesto a las emanaciones del radium.

BELANGER en 1946, describe el método para localizar los elementos radiactivos en secciones histológicas de tejidos con una emulsión fotográfica. El método ha sido empleado por PELC (1947), DONIACH y colaboradores (1950), NORRIS y colaboradores (1955), JOFTES (1963) y particularmente en nuestro Servicio por PUIG ROSADO (1971) y GARCÍA PENALVA (1972) en trabajos sobre cartílago articular.

#### A. Definición y concepto

El término de autorradiografía o radioautografía se refiere a cualquier método por el que la distribución de la radiactividad contenida en o sobre un objeto se reproduce exactamente de tal forma que puede ser visualizada. El producto de esta técnica se llama autorradiograma.

Los factores fisiológicos, bioquímicos y metabólicos determinan la selección del isótopo: para estudios del tiroides, yodo radiactivo; para DNA y estudios de reproducción celular, timidina tritiada; hierro o cromo radiactivo para los glóbulos rojos; estroncio o calcio para la calcificación ósea; azufre radiactivo ( $S^{35}$ ) para el metabolismo de los sulfomucopolisacáridos, etc.

Los isótopos de baja energía como el tritium o el carbono 14, que aportan una resolución excelente, presentan la dificultad del alcance limitado de sus radiaciones en el tejido y en la emulsión. En el tejido su alcance es por lo general tres veces mayor que en la emulsión.

El método de administración del isótopo y el intervalo hasta el sacrificio del animal vienen determinados por las condiciones experimentales en que se trabaja. Como norma general este intervalo ha de ser, siempre que sea posible, más corto que la vida media del isótopo. Esto es aplicable también al tiempo que se emplea

en las técnicas histológicas necesarias.

Las técnicas histológicas, en general, son adecuadas para la tinción, con la salvedad de que los reactivos no deben disolver los componentes tisulares marcados con el isótopo.

Los fijadores corrientes son, por lo general, de uso satisfactorio para la autorradiografía. Si por alguna circunstancia no lo fueran, se puede usar acetona o se puede congelar la pieza (HOLT y colaboradores, 1951; ARNOLD, 1954).

Si la tinción se hace antes de aplicar la emulsión y el tejido no se protege con una capa protectora, el revelado fotográfico subsiguiente decolora la tinción. Si se usan emisiones de mediana o alta energía, se puede añadir la capa protectora por inmersión de las preparaciones en celoidina antes de proceder a la aplicación de la emulsión. La capa protectora, sella la preparación e impide que la tinción se decolore al revelar la pieza.

Sin embargo, el tritium es un emisor tan débil que aun una capa de una micra reduce enormemente la cantidad de radiación que llega a impresionar la emulsión. Por esta razón y porque cualquier capa interpuesta entre el tejido y la emulsión reduce la resolución, es preferible no usar capa protectora al manejar el tritium. Entonces se invierte el orden y se procede a teñir la preparación después de haber revelado y fijado la autorradiografía.

*Técnicas autorradiográficas.* — Existen básicamente cinco técnicas:

1.<sup>a</sup> *Aposición.* Se trata del primero y más simple de los métodos. Se coloca la pieza en contacto con la película con un poco de presión y protegido de la luz. Después de la impresión, la pieza se quita y la película se revela. Sus inconvenientes son obvios; es muy difícil conseguir una correlación de la radiografía con la pieza a nivel microscópico y la resolución no es muy buena.

2.<sup>a</sup> *Montaje*. Esta técnica consiste en montar el corte histológico sobre un chasis con emulsión nuclear en vez de hacerlo sobre un portaobjetos corriente. Tiene la ventaja de que ambos, corte histológico y película, permanecen unidos y la desventaja de que la película ha de ser revelada a través de la pieza.

3.<sup>a</sup> «*Stripping film*». Película desplegable. Se trata del método empleado en el presente trabajo. PELC (1947), tuvo la ingeniosa idea de invertir la técnica de montaje y adosar la emulsión a la pieza histológica. Esto se efectúa despegando la emulsión del soporte temporal de cristal sobre el que viene pegada de fábrica y flotándola en un baño de agua. El corte histológico montado sobre su portaobjetos se sumerge bajo la película y se saca de modo que queden superpuestos. Cuando la emulsión se seca, se adhiere fuertemente al portaobjetos y al corte ya que al perder agua encoge. La resolución es excelente y la imagen radiográfica retiene su relación original con la pieza. La única desventaja es la dificultad de aprender la técnica.

4.<sup>a</sup> *Técnica del pintado*. La emulsión no impresionada se funde y se pinta sobre los cortes histológicos con un pincelito. Sus ventajas son la buena resolución que se obtiene y la perfecta aposición de ambas imágenes, radiográfica e histológica. Sus desventajas estriban en la facilidad con que aparecen burbujas al pintar y en el diferente espesor de la emulsión (BELANGER y LEBLOND, 1946).

5.<sup>a</sup> *Técnica de la inmersión*. Es la modificación más reciente (ARNOLD, 1954; JOFTES, 1963). Consiste en la inmersión del portaobjetos con la preparación ya montada en un baño de la emulsión nuclear líquida virgen. Esta técnica elimina el problema de las burbujas, es rápida pero requiere la obtención de capas de emulsión de espesor constante.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, J. B. (1959) : Effect of chondroitin on the uptake of radioactive sulphate into chondroitin sulphate. *Biochem. et Biophys. Acta* 32, 559-561.
- ADAMSON, L. ; GLEASON, S., y ANAST, C. (1964) : Sulphate incorporation by embryonic chick bone. *Biochem. et Biophys. Acta* 83, 262.
- AMPRINO, R. (1955) : On the incorporation of radiosulfate into cartilage. *Experientia*, 15, 65.
- ANDERSON, C. E. ; LUDOWIEG, J. ; HARPER, H. A. y ENGLEMAN, E. P. (1964) : The composition of the organic component of human articular cartilage. *J. Bone J. Surg.*, 46-A, 1176.
- ARGÜELLES SANGINÉS, F. y RENAU PIQUERAS, J. (1975) : El «scanning» del cartílago articular inmaduro. Comunicación personal.
- ARGÜELLES SANGINÉS, F. (1976) : Estudio experimental sobre los efectos de la sinovectomía sobre el cartílago articular del conejo inmaduro. Tesis doctoral. Valencia.
- ARNOLD, J. S. (1954) : An improved technic for liquid emulsion autoradiography. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 85, 113.
- BALAZS, E. A. ; BLOOM, G. D. y SWANN, D. A. (1966) : Fine structure and glycosaminoglycan content of the surface layer of articular cartilage. *Fed. Proc.*, 25, 1813.
- BARLAND, J. ; JANIS, R. y SANDSON, D. A. (1966) : Immunofluorescent studies of human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 25, 156.
- BARNETT, C. ; DAVIES, D. V. y MAC CONAILL, M. A. (1961) : Synovial joints their structure and mechanics. Springfield, Ill. Charles C. Thomas, Publisher.
- BARNET, C. H. ; COCHRANE, W. y PALFREY, A. J. (1963) : Age changes in articular cartilage of rabbits. *Ann. Rheum. Dis.*, 22, 389.
- BELANGER, L. F. y LEBLOND, C. P. (1946) : A method for locating radioactive elements in tissues by covering histological sections with a photographic emulsion. *Endocrinology*, 39, 8.
- BELANGER, L. F. (1959) : Observations on the manifestations of osteolathyrism in the chick. *J. Bone Joint Surg.*, 41-B, 581.
- BENNINGHOFF, A. (1925) : Form und bau der gelenkknorpel in ihren beziehungen zur funktion. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.*, 76, 43.
- BOLLET, A. J. y NANCE, J. L. (1966) : Biochemical findings in normal and osteoarthritic articular cartilage. II. Chondroitinsulfate concentration and chain length, water, and ash content. *J. Clin. Invest.*, 45, 1170.
- BOLLET, A. J. (1967) : Polysaccharide metabolism and osteoarthritis. *Advances Intern. Med.*, 13, 33.

- BONI, A. y MONTELEONE, J. (1957) : L'ultrastruttura della cartilagine articolare in condizioni normali e in alcune condizioni patologiche. *Astro. Trauma*, 25, 279.
- BOSTROM, H. y MANSSON, B. (1953) : Factors influencing the exchange of the sulfate group of the chondroitinsulfuric acid of cartilage in vitro. *Arkiv. f. Kemi.*, 6, 23-37.
- BOSTROM, H. (1954) : On the sulfate exchange of sulfomucopoly-saccharides. In connective tissue in health and disease. pp. 97-102. Copenhagen, Munksgaard.
- BOYD, G. (1955) : Autoradiography in Biology and Medicine. Academic Press. Inc. New York.
- BROWER, T. D. ; AKAHOSHI, Y. y ORLIC, P. (1962) : The diffusion of dyes through articular cartilage in vivo. *J. Bone Joint Surg.*, 44-A, 456.
- BROWER, T. D. y HSU, W.-Y. (1969) : Normal articular cartilage. *Clin. Orthop.*, 64, 9.
- BYWATERS, E. C. L. (1937) : The metabolism of joint tissues. *J. Path. Bact.*, 44, 247.
- CAMERON, D. A. y ROBINSON, R. A. (1958) : Electromicroscopy of epiphyseal and articular cartilage matrix in the femur of the newborn infant. *J. Bone Joint Surg.*, 40-A, 163.
- CAMPO, R. D. y DZIEWIATKOWSKI, D. D. (1962) : Intracellular synthesis of protein polysaccharides by of bovine costal cartilage. *J. Biol. Chem.*, 237, 2729.
- CHRISTMAN, O. D. y SOUTHWICK, W. O. (1962) : Sulfate metabolism in cartilage. III: Effect of various adjuvants of sulfate exchange in cartilage slices. *J. Bone Joint Surg.*, 44-A, 464.
- COLLINS, D. H. (1949) : The pathology of articular cartilage and spinal disease. Ed. Arnold and Co. London.
- COLLINS, D. H. y MEACHIM, C. (1961) : Sulfate ( $^{35}\text{SO}_4$ ) fixation by human articular cartilage compared in the knee and shoulder joints. *Ann. Rheum. Dis.*, 20, 117.
- COLLINS, D. H. ; GHADIALLY, F. N. y MEACHIM, G. (1965) : Intracellular lipids of cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 24, 123.
- CRELIN, E. S. y SOUTHWICK, W. O. (1960) : Mitosis of chondrocytes induced in the knee joint articular cartilage of adults rabbits. *Yale J. Biol. Med.*, 33, 234.
- CRELIN, E. S. y SOUTHWICK, W. O. (1964) : Changes induced by sustained in the knee joint articular cartilage of adult rabbits. *Anat. Rec.*, 149, 113.
- D'ABRAMO, F. y LIPMANN, F. (1957) : The formation of adenosine 3'phosphate-5'phosphosulphate in extracts of chick embryo cartilage and its conversion into chondroitin sulfate. *Biochem. Biophys. Acta*, 25, 211.
- DAVIES, D. V. ; BARNETT, C. H. ; COCHRAN, W. y PALFREY, A. (1962) : Electron microscopy of articular cartilage in the young adult rabbit. *Ann. Rheum. Dis.*, 21, 11.
- DE HEVESY, G. (1961) : Becquerel-Curie Memorial Lecture. Segundo discurso anual en la serie de Nuclear Pioneer. Sociedad de Medicina Nuclear. Pittsburg, junio.
- DE LUCA, S. y GILBERT, J. E. (1968) : Biosynthesis of chondroitin sulfate. II. Incorporation of sulfate  $^{35}\text{S}$  into microsomal chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.*, 243, 2725.
- DICKENS, F. y WEIL-MALHERBE, H. (1936) : Metabolism of cartilage. *Nature*, 138, 30.
- DONIACH, I. y PELC, S. R. (1950) : Autoradiograph technique. *Britis J. Radiol.*, 23, 184.
- DORFMAN, A. (1963) : The effects of adrenal hormones on connective tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 56, 698.
- DORFMAN, A. (1964) : Metabolism of acid mucopolysaccharides. In connective tissue : intercellular macromolecules. Boston. Little, Brown & Co., 155.
- DZIEWIATKOWSKI, D. D. (1951) : Isolation of chondroitin sulfate- $^{35}\text{S}$  from articular cartilage of rats. *J. Biol. Chem.*, 189, 187.
- DZIEWIATKOWSKI, D. D. (1954) : Effect of age on some aspects of sulfate metabolism in the rat. *J. Exp. Med.*, 99, 283.
- DZIEWIATKOWSKI, D. D. (1956) : Some aspects of the metabolism of chondroitin sulfate  $^{35}\text{S}$  in the rat. *J. Biol. Chem.*, 223, 239.
- EICHELBERGER, L. ; AKESON, W. H. y ROMA, M. (1958) : Biochemical studies of articular cartilage. I. Normal values. *J. Bone Joint Surg.*, 40-A, 142.
- EKHOLM, R. (1951) : Articular cartilage nutrition. *Acta Anat.*, vol. 11, supp., 15.
- ELMORE, S. M. ; SOKOLOFF, L. ; NORRIS, G. y CARMECI, P. (1963) : The nature of «imperfect» elasticity of articular cartilage. *J. Appl. Physiol.*, 18, 393.
- ELLIOT, H. C. (1936) : Studies on articular cartilage. I. Growth mechanisms. *Amer. J. Anat.*, 58, 127.
- FAWNS, H. T. y LANDELLS, I. W. (1953) : Histochemical studies of rheumatic conditions. Observations of the fine structures of the matrix of normal bone and cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 12, 105.
- FELL, H. B. y DINGLE, J. T. (1964) : Studies on the mode of action of excess of vitamin A : G. Lysosomal proteases and the degradation of cartilage matrix. *Arthritis Rheum.*, 7, 398.
- FORTEZA BOVER, G. ; HERNÁNDEZ FAGO, J. y MARTÍNEZ RAMÓN, A. (1973) : Citología molecular de la biosíntesis del colágeno. Editorial Facta. Valencia.
- FREEMAN, M. A. R. (1973) : Adult articular cartilage. Sir Isaac Pitman and Sons. Ltd. Oxford.
- GARCÍA PENALVA, A. (1972) : Estudio experimental de la acción de la cortisona sobre el cartilago articular. Tesis doctoral. Valencia.
- GHADIALLY, F. N. ; MEACHIM, G. y COLLINS, D. H. (1965) : Extracellular lipid in the

- matrix of human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 24, 136.
- GODMAN, G. C. y PORTER, K. R. (1960) : Chondrogenesis, studies with the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 8, 719.
- GODMAN, G. C. (1962) : In transactions of conference on biology of connective tissue cells. Arthritis and Rheumatism Foundation. New York.
- GODMAN, G. C. y LANE, N. (1964) : On the site of sulfation in the chondrocyte. *The Jour. of Cell. Biol.*, V, 21, 353.
- HELTIN, T. y RODEN, L. (1968) : The carbohydrate-protein linkage region of chondroitin-6-sulfate. *Biochim. Biophys.*, Acta 170, 301.
- HERRING, G. M. (1968) : The chemical structure of tendon, cartilage, denting and bone matrix. *Clin. Orthop.*, 60, 261.
- HOFFMAN, P. y MASHBURN, T. A. (1967) : Protein polysaccharide of bovine cartilage. II. The relation of keratin sulfate and chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.*, 22, 3805.
- HOLMES, W. C. (1924) : The influence of variation in concentration on the absorption spectra of dye solutions. *Ind. Eng. Chem.*, 16, 35.
- HOLT, M. W. y WARREN, S. (1951) : Radioautographic solubility studies of I 131 and P 32 in frozen dehydrated tissues. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 76, 4.
- HOWELL, D. S. ; PITA, J. C. ; ALTMAN, R. ; MEULLER, F. y MADRUGA, J. (1969) : Micropuncture studies of interstitial fluid from articular cartilage of growing rabbits. Paper read at annual meeting of A. R. A., Junio. Boston, Mass.
- HUNTER, W. (1743) : On the structure and diseases of articulating cartilage. *Phil. Trans. B.*, 42, 514.
- INGELMARK, B. E. y SÄÄF, J. (1948) : Ueber die ernahrung des gelenknorpels und die bildung der gelenkflüssigkeit unter verschiedenen funktionellen verhältnissen. *Acta Orthop. Scand.*, 17, 303.
- JOFTES, D. L. (1963) : Radioautography, principles and procedures. *J. Nucl. Med.*, 4, 143.
- KANTOR, T. G. y SCHUBERT, M. (1957) : The difference in permeability of cartilage to cationic and anionic dyes ; *J. Histochem. Cytochem.*, 5, 28.
- KAPLAN, D. y MEYER, K. (1959) : Aging of human cartilage. *Nature*, 183, 1267.
- KEMBER, N. F. (1960) : Cell division in endochondral ossification. A study of cell proliferation in rat bones by the method of tritiated thymidine autoradiography. *J. Bone Joint Surg.*, 42-B, 824.
- KOLLIKER, A. (1853) : A manual of human study histology, vol. 1, Sydenham Society. London.
- KRANE, S. ; PARSONS, V. y KUNIN, A. S. (1967) : Studies of the metabolism of epiphiseal cartilage. In Basset, C. A. L., editor : Cartilage degradation and repair. Washington, D. C., N. A. S. - N. R. C., 1967.
- KUHN, R. y LEPPELMANN, H. J. (1958) : Galaktosamin und glucosamin im knorpel in abhängigkeit vom lebensalter, *Leibig Ann. Chem.*, 611, 254.
- LANDELLS, J. W. (1957) : The reactions of injured human articular cartilage. *J. Bone Joint Surg.*, 39-B, 548.
- LAYTON, L. L. (1951) : Effect of cortisone upon chondroitin sulfate synthesis by animal tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N. Y.)*, 76, 596.
- LAYTON, L. L. (1952) : Effect of cortisone upon tissue synthesis of acid mucopolysaccharide. *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wissenschaft.*, 8, 74.
- LEIDY, J. (1849) : On the intimate structure and history of articular cartilage. *Amer. J. Med. Sci.*, 17, 277.
- LINN, F. C. y SOKOLOFF, L. (1965) : Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. *Arthritis Rheum.*, 8, 481.
- LITTLE, K., PRimm, L. H. y TRUETA, J. (1958) : Osteoarthritis of the hip : on electron microscope study. *J. B. J. Surg.*, 40-B, 123.
- LOEWE, G. (1965) : Localization of chondromucoproteins in cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 24, 528.
- LUTWAK-MANN, C. (1940) : Enzyme systems in articular cartilage. *Biochem. J.*, 34, 517.
- MANKIN, H. J. (1962a) : Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. II. Repair in immature cartilage. *J. Bone Joint Surg.*, 44-A, 688.
- MANKIN, H. J. (1962b) : Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. I. Growth and immature cartilage. *J. Bone Joint Surg.*, 44-A, 682.
- MANKIN, H. J. (1963a) : Localization of tritiated cytidine in articular cartilage of immature and adult rabbits after intraarticular injection. *Lab. Invest.*, 12, 543.
- MANKIN, H. J. (1963b) : The calcified zone (basal layer) of articular cartilage of rabbits. *Anat. Rec.*, 145, 73.
- MANKIN, H. J. (1963c) : Localization thymidine tritiated in articular cartilage of rabbits. III. Mature articular cartilage. *J. Bone Joint Surg.*, 45-A, 529.
- MANKIN, H. J. y ORLIC, P. A. (1964) : A method of estimating the «health» of rabbit articular cartilage by assays of ribonucleic acid and protein synthesis. *Lab. Invest.*, 13, 465.
- MANKIN, H. J. y BARON, P. A. (1965) : The effects of aging on protein synthesis in articular cartilage of rabbits. *Lab. Invest.*, 14, 658.
- MANKIN, H. J. y CONGER, K. A. (1966a) : The effect of cortisol on articular cartilage of rabbits. *Lab. Invest.*, 15, 794.
- MANKIN, H. J. y CONGER, K. A. (1966b) : The acute effects of intraarticular hydrocortisone

- on articular cartilage in rabbits. *J. Bone Joint Surg.*, 48-A, 1383.
- MANKIN, H. J. (1968) : The effect of aging on articular cartilage. *Bull. New York Acad. Med.*, 44, 545.
- MANKIN, H. J. y LIPPIELLO, L. (1969) : The turnover of the matrix of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg.*, 51-A, 1591.
- MANKIN, H. J. (1970) : The articular cartilages : A review. *A. A. O. S. : Instructional Course Lectures*, 204.
- MAROUDAS, A. y BULLOUGH, P. (1968a) : Permeability of articular cartilage. *Nature*, 219, 1260.
- MAROUDAS, A. y BULLOUGH, P. (1968b) : The permeability of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg.*, 50-B, 166.
- MAROUDAS, A.; MUIR, H. y WINGHAM, J. (1969) : The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. *Biochim. Biophys.*, 177, 492.
- MARTÍNEZ RAMÓN, A.; FORTEZA BOVER, G.; HERNÁNDEZ YAGO, J. y KNECHT ROBERTO, F. (1974) : Autorradiografía y ultraestructura celular. Editorial Facta. Valencia.
- MARTÍNEZ RAMÓN, A.; ARGÜELLES SANGINÉS, F.; CERVERA, J. y GOMAR SANCHO, F. (1976) : Los lugares de sulfatación en los condrocitos del cartilago articular del conejo. Estudio por autorradiografía cuantitativa de alta resolución. Comunicación personal.
- MATHEWS, M. B. (1965) : The interaction of collagen and acid mucopolysaccharides : a model for connective tissue. *Biochem. J.*, 96, 710.
- MAXIMOW, A. A. y BLOOM, W. (1948) : A textbook of histology, 5th edn, p. 118. Saunders, Philadelphia.
- MC CONNAILL, M. A. (1951) : The movements of bone and joints. 4. The mechanical structure of articulating cartilage. *J. Bone Joint Surg.*, 33-B, 251.
- MC ELLIGOTT, T. F. y COLLINS, D. H. (1960) : Chondrocyte function of human articular and costal cartilage compared by measuring the in vitro uptake of labelled ( $^{35}\text{S}$ ) sulfate. *Ann. Rheum. Dis.*, 19, 31.
- McKIBBEN, B. y HOLDSWORTH, F. S. (1966) : The nutrition of immature joint cartilage in the lamb. *J. Bone Joint Surg.*, 48-B, 793.
- MEACHIM, G. y COLLINS, D. H. (1962) : Cell counts of normal and osteoarthritic articular cartilage in relation to the uptake of sulfate ( $^{35}\text{S}$ ) in vitro. *Am. Rheum. Dis.*, 21, 45.
- MEACHIM, G.; GHADIALLY, F. N. y COLLINS, D. H. (1965) : Regressive changes in the superficial layer of human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 24, 23.
- MEACHIM, G. (1967) : The histology and ultrastructure of cartilage. In Bassett, C. A. L., editor : Cartilage degradation and repair, Washington, D. C., N. A. S. - N. R. C.
- MEACHIM, G. y ROY, S. (1967) : Intracytoplasmic filaments in the cells of adult human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 26, 50.
- MEACHIM, G. (1969) : Age changes in articular cartilage. *Clin. Orthop.*, 64, 33.
- MILES, J. S. y EICHELBERGER, L. (1964) : Biochemical studies of human cartilage during the aging process. *J. Amer. Geriat. Soc.*, 12, 1.
- MILLER, E. J.; VANDERKORT, J. K. y SOKOLOFF, L. (1969) : Collagen of human articular and costal cartilage. *Arthritis Rheum.*, 12, 21.
- MUIR, H. (1964) : Chemistry and metabolism of connective tissue glycosaminoglycans (mucopolysaccharides). In Hall, editor : International review of connective tissue research, New York. Academic Press Inc., volumen 2, 101.
- NORRIS, W. P. y WOODDRUFF, L. A. (1955) : The fundamentals of radioautography. *Ann. Rev. Nuclear Soc.*, 5, 297.
- PAGET, J. (1853) : Healing of injuries in various tissues. In lectures on surgical pathology, vol. 1. London.
- PASTERNAK, C. A. (1960) : The synthesis of 3'phospho-adenosin 5'phosphosulfate by mouse tissues : sulfate activation in vitro and vivo. *J. Biol. Chem.*, 235, 438.
- PELC, S. R. (1947) : Autoradiograph technique. *Nature*, 160, 749.
- PERLMAN, R. L.; TELSER, A. y DORFMAN, A. (1964) : The biosynthesis of chondroitin sulfate by a cell free preparation. *J. Biol. Chem.*, 239, 3623.
- PUIG, A. (1971) : Estudio con  $\text{H}^3$ - Timidina de la condrogénesis post-fetal de los huesos largos. Tesis doctoral. Valencia.
- QUINTARELLI, G. (1968) : Methods for the histochemical identification of acid mucopolysaccharides : a critical evaluation. In Quintarelli, G. editor : The chemical physiology of mucopolisaccharides. Little Brown & Co., 199. Boston.
- RODEN, L. (1968) : The protein carbohydrate linkages of acid mucopolysaccharides. In Quintarelli, editor. The chemical physiology of mucopolysaccharides. Little & Brown. Boston.
- ROSENTHAL, O.; BOWIE, M. A. y WAGONER, G. (1941) : Studies on the metabolism of articular cartilage. II. Respiration and glycolysis of cartilage in relation to its age. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 17, 221.
- SCHUBERT, M. (1964) : Intercellular macromolecules containing polysaccharides. In connective tissue : intercellular macromolecules. Little, Brown & Co., 119. Boston.
- SILBERBERG, R.; SILBERBERG, M.; VOGEL, A. y WETTSTEIN, W. (1961) : Ultrastructure of articular cartilage of mice of various ages. *Amer. J. Anat.*, 109, 251.

- SILBERBERG, R.; SILBERBERG, M. y FEIR, D. (1964) : Life cycle of articular cartilage cells: an electromicroscopic study of the hip joint of the mouse. *Amer. J. Anat.*, 114, 17.
- SILBERBERG, R. (1968) : Ultrastructure of articular cartilage in health and disease. *Clin. Orthop.*, 57, 233.
- SMITH, J. W.; PETERS, T. J. y SERAFINI-FRACASSINI, A. (1967) : Observations in the distribution of the protein polysaccharide complex and collagen in bovine articular cartilage. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 2, 129.
- SOKOLOFF, L. (1963) : Elasticity of articular cartilage : Effect of ions viscous solutions. *Science*, 141, 1055.
- SPICER, S. S.; HORN, R. G. y LEPI, T. J. (1967) : Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. In Wagner, B. M. y Smith, D. E. editors. *The connective tissue*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- STOCKWELL, R. A. (1967) : The cell density of human articular and costal cartilage. *J. Anat.*, 101, 753.
- STOCKWELL, R. A. y SCOTT, J. E. (1967) : Distribution of acid glycosaminoglycans in human articular cartilage. *Nature*, 215, 1376.
- STRANGEWAYS, T. S. P. (1920) : Observations on the nutrition of articular cartilage. *Brit. Med. J.*, 1, 661.
- STROMINGER, J. L. (1964) : Nucleotide intermediates in the biosynthesis of heteropolymeric polysaccharides. In *connective tissue : intercellular macromolecules*. Little, Brown & Co., 139. Boston.
- SUZUKI, S. y STROMINGER, J. L. (1960) : Enzymatic sulfation of mucopolysaccharides in hen oviduct. *J. Biol. Chem.*, 235, 257.
- THOMAS, L. (1964) : The effects of papain, vitamin A and cortisone in cartilage matrix in vivo. In *connective tissue : intercellular macromolecules*. Little, Brown & Co. Boston.
- THORP, F. K. y DORFMAN, A. (1963) : Citados por GODMAN, G. C. y LANE, N. en su artículo : On the site of sulfation in the chondrocyte. *J. Cell Biology*, 21, 353. 1964.
- TONNA, E. A. y CRONKITE, E. P. (1961) : Cell response to fracture studied with tritiated thymidine. *J. Bone Joint Surg.*, 43-A, 532.
- TONNA, E. A. y SHELLABARGER, C. J. (1962) : An autoradiographic study of rat femora 9 months after administration of thymidine tritiated. *Anat. Record*, 142, 329.
- VIRCHOW, R. (1863) : *Die krankhaften geschwülste* I. Berlín. Citado por EKHOLM, R. (1951).
- WALKER, P. S.; DOWSON, D.; LONGFIELD, M. D. y WRIGHT, V. (1968) : Boosted lubrication in synovial joints by fluid enlargement and enrichment. *Ann. Rheum. Dis.*, 27, 512.
- WALKER, P. S.; SIKORSKI, J.; DOWSON, D. y LONGFIELD, M. D. (1969) : Behavior of synovial fluid on surfaces of articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 28, 1.
- WEISS, C.; ROSEMBERG, L. y HELFET, A. (1968) : An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. *J. Bone Joint Surg.*, 50-A, 663.
- WHITEHOUSE, M. W. y BOSTROM, H. (1962) : The effect of some anti-inflammatory drugs on the metabolism of connective tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 11, 1175.