

CLÍNICA QUIRÚRGICA UNIVERSITARIA. VALENCIA

Estudio experimental sobre los efectos de la sinovectomía en el cartílago articular del conejo inmaduro

FRANCISCO ARGÜELLES SANGINÉS

Director : Prof. GOMAR GUARNER

RESUMEN

Hemos realizado experimentalmente la sinovectomía de la rodilla en el conejo inmaduro, de 21 días de edad, de un peso comprendido entre los 350-455 gramos y de raza New Zeland.

Se emplean en total 37 conejos, repartidos en cinco series, utilizando una de las rodillas para la intervención y la otra como testigo.

La primera serie ha consistido en realizar un estudio histológico del cartílago articular durante el período de las ocho semanas siguientes a la operación. Se valoran las alteraciones estructurales de dicho cartílago haciendo especial referencia a las alteraciones metacromáticas de la sustancia fundamental.

En la segunda serie se estudia el proceso de la regeneración sinovial, según técnica histológica, durante las ocho semanas de la sinovectomía.

En las series tercera y cuarta, se valoran cualitativa y cuantitativamente las modificaciones de incorporación del radiosulfato en el cartílago articular post-sinovectomía, siguiendo técnica autorradiográfica y densitométrica, en las seis semanas siguientes a la intervención.

En la serie quinta, se muestran las alteraciones biodinámicas del S^{35} en el condrocito del cartílago articular, por medio de la microscopía electrónica. Se establece el patrón de incorporación en el condrocito normal y se compara con los condrocitos del cartílago articular correspondientes a las rodillas operadas a los 7, 14, 21 y 28 días subsiguientes a la sinovectomía.

Finalmente se hace la discusión global de las cinco series basándonos en los resultados obtenidos en cada una de ellas.

SUMMARY

The effects of synovectomy upon the immature rabbit's articular cartilage have been studied. The present work consists of 5 series: On the first one the metachromatic changes of cartilage matrix were studied. The second series dealt with synovial membrane regeneration. The qualitative changes of S^{35} cartilage uptake were the subject of the third series and quantitative measurement of these changes was undertaken on the fourth series. The fifth series studied the pathways of S^{35} inside the postsynovectomy chondrocyte.

Introducción

La tinción metacromática

Histoquímicamente se la puede definir como la tinción de un componente tisular de forma que el espectro de absorción del complejo colorante-tejido resultante, difie-

re lo suficientemente del correspondiente al colorante original y de sus complejos tisulares ordinarios como para dar un notable contraste de color (BARKA y ANDERSON, 1967).

Aunque se atribuye a EHRlich en 1897 el que definió por primera vez el término

de metacromasia, parece ser que con anterioridad ya se había observado (PEARSE, 1960). El hecho es que a través de estos años se ha suscitado el concepto, la problemática y los resultados de esta tinción.

Desde las primitivas investigaciones de LISON en 1935, se ha demostrado que los colorantes de estructura y características tintoriales diferentes, pueden presentar metacromasia. Sin embargo, en general, la metacromasia se evalúa con colorantes catiónicos. Como tal tinción, puede estar producida por una amplia variedad de colorantes a la que LISON completaría con una extensa gama de ellos.

Histológicamente, una reacción de tinción se considera metacromática cuando un colorante tiñe selectivamente una estructura celular con diferente color de aquel que tiene la disolución del colorante diluido (PEARSE, 1960). Así, si una preparación de mesenterio de rana se tiñe con una disolución diluida de azul de toluidina, las células cebadas se tiñen en rojo púrpura (metacromasia) mientras que las otras estructuras se tiñen en azul (ortocromasia).

Para fines prácticos, la metacromasia se limita a los efectos observados con los colorantes del grupo tiacina únicamente; sin embargo, aquí se refiere a un cambio de color azul a rojo a través del violeta que aparece cuando los tejidos se tiñen en soluciones acuosas diluidas de colorantes de este grupo. Con las tiacinas, el mecanismo subyacente de producción de metacromasia se comprende mejor que con los colorantes difenil-metano (violeta de metilo) o azinas (rojo congo). La metacromasia de los difenil-metanos es histoquímicamente importante sólo en el caso del amiloide (BARKA y ANDERSON, 1967).

Mecanismo. — No se conoce el mecanismo exacto de la metacromasia. MICHAELIS (1947), MICHAELIS y GRANICK (1947), observaron que el espectro de absorción de

soluciones acuosas, de colorantes potencialmente metacromáticos, cambiaba con las variaciones en la concentración, temperatura, pH, etc. (KELLY, 1956a). El cambio de color de la solución colorante, que es análoga a metacromasia, es causada por la polimerización de las moléculas del colorante. Basados en esta analogía se han propuesto diversos mecanismos de la metacromasia tisular que revisaremos conjuntamente (WISLOCKI, BUNTING y DEMPSEY, 1947; SYLVEN, 1950 y 1954; KELLY, 1956a, 1956b y 1956c; SZIRMAI y BALAZS, 1958; STOCKINGER, 1958; SCHUBERT y HAMERMAN, 1968).

Durante mucho tiempo se ha sugerido que la metacromasia con los colorantes de tiacina se debía a la formación de tautómeros de los colorantes empleados que poseen espectros de absorción diferentes del original, pero los trabajos de MICHAELIS y GRANICK (1947), introdujeron el concepto de formación de polímeros. La forma monomérica del colorante es azul o violeta, los dímeros y trímeros son progresivamente más violetas y los polímeros, rojos o rosados. La polimerización del sustrato, con el que se combina el colorante, induce a la polimerización del colorante y de aquí, la metacromasia. Esta es una explicación mucho más satisfactoria que la dada por LISON en 1935, quien creyó que era una reacción específica para los ésteres superiores del ácido sulfúrico (mucopolisacáridos ácidos). Años más tarde se demostraba que las vainas de mielina daban fuerte metacromasia con el azul de toluidina en cortes congelados y que no podía deberse a los ésteres del ácido sulfúrico. En ausencia de otra explicación, es posible que sean responsables los grupos fosfato de la fosfoditolina o la dipalmitoglicerofosforiletanolamina, esto es, la cefalina.

Algunos autores comprobaron que la metacromasia demostrable en las vainas nerviosas, en cortes parafinados, era rever-

sible por la hialuronidasa. No hay pruebas de que los mucopolisacáridos ácidos se encuentren en el tejido nervioso. La hipótesis de LISON sobre la metacromasia debe modificarse por el descubrimiento de MICHAELIS (1947), de que los glúcidos altamente polimerizados producen efectos metacromáticos en virtud de sus grupos carboxilos manifestando igualmente que sus superpolímeros de metafosfato se comportan de forma similar en las células de la levadura.

Por otro lado, las macromoléculas que contienen radicales electronegativos y muestran una carga superficial negativa periódica, captan moléculas colorantes, de tal suerte, que puede darse una interacción entre estas moléculas; esta interacción depende probablemente de fuerzas del tipo «van der Waal» o de uniones —H polimerizadas de esta forma. Las moléculas colorantes presentan un máximo de absorción metacromática muy similar a aquel visto en soluciones colorantes concentradas. Las moléculas de agua juegan un papel de escaso valor en la polimerización de moléculas colorantes.

La mayoría de las observaciones experimentales son compatibles con este concepto del mecanismo de la metacromasia. Esta conclusión es válida, en el sentido de que los radicales sulfatados están altamente ionizados y son los principales afectados en las reacciones metacromáticas. Sin embargo, un determinado número de carbohidratos que contienen radicales sulfatados, así como determinados componentes no hidrocarbonados, como son los metafosfatos (WIAME, 1946), ácidos nucleicos (WEISSMANN, CARNES, RUBIN y FISCHER, 1952), y polipéptidos (EDELHOCH, 1958), encuentran metacromasia.

Alteraciones histoquímicas. — Los polisacáridos no metacromáticos pueden hacerse metacromáticos por la introducción de radicales negativos. La sulfatación y fos-

fatación pueden conferir propiedades metacromáticas a varias mucoproteínas (KRAMER y WINDRUM, 1955). El grado de metacromasia depende principalmente, de la naturaleza de radicales negativos. Aumentan al orden siguiente:

Carboximetil < Carboxil < Fosfato < Sulfato

Otros factores que también influyen son: la concentración de radicales negativos, pH, concentración iónica, temperatura, tiempo de tinción, constante dieléctrica del disolvente, etc. (WALTON y RICHETTS, 1954). Todos estos factores afectan, ya a la disociación de los radicales, ya a la polimerización de las moléculas del colorante o a ambas. Las proteínas básicas que pueden unir grupos negativos también influyen en la metacromasia y pueden suprimirla *in vitro*. La metilación también hace desaparecer la metacromasia.

De estas observaciones parece ser que la metacromasia no puede ser atribuida a un solo componente o grupo químico. Por otro lado los mucopolisacáridos ácidos juegan un papel eminente en la tinción metacromática.

La metacromasia intensamente alcohol-resistente puede ser tomada como evidencia firme de la presencia de mucopolisacáridos ácidos sulfatados. La carencia de tinción metacromática no excluye necesariamente la presencia de mucopolisacáridos ácidos; se piensa que es necesario que la concentración de ácido hialurónico sea por lo menos de 0'5 a 1 por 100 para que la tinción metacromática pueda ser visible microscópicamente.

Variaciones de técnica. — Existen controversias sobre la técnica exacta que debería emplearse para la demostración de la metacromasia. SYLVEN (1950), mantenía que la técnica de la tinción metacromática era el único método selectivo para la observación de los ésteres del ácido sulfúrico.

Contrariamente diversos autores utilizan, pues, otros métodos de tinción metacromática sin comprender que producen mezclas entre verdaderas y falsas variaciones metacromáticas del color. LISON (1935), propuso la elección de dos métodos: teñir durante largo tiempo en soluciones muy diluidas y montar en agua, o teñir durante breve tiempo en una solución más fuerte y deshidratar en alcohol. El alcohol reduce progresivamente la forma metacromática de los colorantes de tiazina o la forma ortocromática, *in vitro*, o en cortes tisulares. Por todo ello existe un punto en que desaparece toda la metacromasia y es la que SYLVEN consideró como falsa. Sabemos ahora que la metacromasia que obtuvo se debía probablemente al glúcido polimerizado (mucoproteína) pero no hay necesidad de caracterizarla con esta base como falsa.

Con los colorantes específicos, la tinción metacromática es rojo-violeta y la tinción ortocromática es azul. La metacromasia más fuertemente alcohol-resistente es dada por los mucopolisacáridos ácidos sulfatados y la técnica casi tiene un valor diagnóstico para estos componentes.

Los mucopolisacáridos ácidos no sulfatados dan una metacromasia mucho menos intensa. En los cortes de tejido, el DNA no es metacromático mientras que el RNA es débilmente metacromático. Estas tinciones metacromáticas son más susceptibles a la extracción alcohólica.

La metacromasia, después de la sulfatación, indica la presencia de mucopolisacáridos neutros o mucoproteínas. Los métodos microespectrofotométricos pueden usarse para la determinación cuantitativa de la metacromasia y el grado de la misma puede ser medido por el índice metacromático:

E metacromático / E ortocromático (KELLY, 1956).

Respecto al método recomendado, no está universalmente aceptado ya que las

opiniones divergen en particular sobre la técnica de deshidratación. Algunos autores consideran que la tinción es verdaderamente metacromática solamente si resiste la deshidratación alcohólica, distinguiéndose así la «metacromasia alcohol-resistente» de la «alcohol-lábil».

La metacromasia débil desaparece con el tratamiento alcohólico. Por ello es aconsejable la deshidratación alcohólica previa visión al microscopio óptico para observar las débiles estructuras metacromáticas alcohol-lábiles.

Se aconseja para el estudio de la metacromasia el empleo de colorantes químicamente puros. Si en un material a estudiar la sustancia fundamental es altamente ortocromática, una solución colorante de pH 3 ó 4 tiende a suprimir la tinción metacromática.

Entre las técnicas empleadas para la tinción metacromática destacan las de PEARSE (1960) y las de BARKA y ANDERSON (1967), empleadas en el presente trabajo.

Varietades.—Según MICHAELIS (1947), es posible reconocer dos variedades de metacromasia en histoquímica. Este autor demostró que el azul de toluidina tenía un espectro de absorción con tres bandas: alfa, beta y gamma. La forma alfa monomérica, es azul; la dimérica beta, es violeta y la polimérica gamma, es roja. Igualmente encontró que el cambio de agua a alcohol ocasionaba reaparición de la forma monomérica (ortocromática) y estableció categóricamente que es más seguro montar los objetos en agua si se necesita decidir si una sustancia se tiñe meta u ortocromáticamente.

A la vista de las observaciones prácticas puede establecerse que no es sólo la presencia de alcohol la que restaura la forma monomérica sino la presencia de alcohol junto con agua.

Si un corte contiene un mucopolisacárid-

do ácido se tiñe con azul de toluidina para desarrollar metacromasia, toda o la mayoría de ella se invertirá con el paso usual de alcoholes de 70 por 100 y absoluto a xilol. Si por otra parte el corte pasa de agua a xilol, permanece la metacromasia. Si se coloca ahora el corte en alcohol absoluto no aparece inversión a la forma ortocromática; sin embargo, la provisión de agua sobre el porta, humedecido en alcohol ocasiona la pérdida instantánea de la metacromasia.

El mecanismo exacto por lo que las mezclas alcohol-agua afectan la metacromasia, es todavía desconocido.

La sinovectomía: Sus alteraciones sobre el cartílago articular del conejo inmaduro

La sinovectomía fue introducida a principios de siglo para el tratamiento de las lesiones articulares. MIGNON (1900), realiza la primera sinovectomía en una rodilla artrítica no tuberculosa, acreditando sus resultados (MIGNON, 1964). Posteriormente MURPHY (1916) y SWEET (1923 y 1938), la introduce en los Estados Unidos empleándola en rodillas artríticas inflamatorias. Entra en desuso en los siguientes años esta técnica quirúrgica, reapareciendo de nuevo en la década pasada para el tratamiento de la artritis reumatoidea (GEENS, 1969).

Con el empleo de esta intervención se abrirían nuevos horizontes para el conocimiento, todavía oscuro e incompleto, sobre los efectos de la sinovectomía en las estructuras articulares, esto es, en la membrana sinovial y en el cartílago articular.

Hasta entonces, la valoración de los resultados de la sinovectomía se habían basado en las alteraciones producidas durante el curso clínico de la enfermedad, consideraciones aportadas casi exclusivamente en lo que respecta a la regeneración sino-

vial (KEY, 1925; WOLCOTT, 1927 y 1938; MITCHELL y CRUESS, 1967a; MITCHELL, 1969), pero no, sobre las alteraciones del cartílago articular.

MITCHELL y CRUESS (1967b), refieren los cambios producidos histológicamente en el cartílago articular en animales de experimentación, trabajo ampliado por GALWAY y CRUESS en 1972. Las conclusiones de estos trabajos señalan que:

A. Existe una disminución de la tinción metacromática en el cartílago articular, debido a la degradación enzimática de la proteína polisacárida de la sustancia fundamental.

B. No existen alteraciones morfológicas en el condrocito.

C. Se produce una regeneración completa de la sinovial.

D. Existen una serie de cambios enzimáticos endógenos después de realizada la sinovectomía.

Alteraciones de la metacromasia.—Los recientes trabajos de GALWAY y CRUESS (1972), confirman en el estudio histológico, una pérdida de la tinción metacromática en el cartílago articular después de realizada la sinovectomía. Los resultados se realizan comparando la rodilla testigo con la operada, empleando conejos inmaduros de la raza New Zeland. De sus conclusiones se puede observar que a partir del quinto día de la intervención se ve una zona de abstención metacromática en las regiones más superficiales del cartílago, tanto en la zona de carga como en la de no carga. La pérdida metacromática, aumenta en profundidad hacia el décimo día y se hacía visiblemente máxima entre los 15 y 30 días. Entre los 30-45 días se produce una recuperación metacromática que va evolucionando hacia la normalidad, excepto en algunos casos. La recuperación total de la tinción metacromática se obtiene a

los 60 días en que ya no existen diferencias con la pieza testigo.

Valores semejantes se encuentran también en las experiencias de MITCHELL y CRUESS (1967b).

Estas observaciones sobre la disminución metacromática del cartilago en sus tres zonas se interpretaron como indicativas de la degradación de la matriz durante el período de regeneración de la membrana sinovial. Estos cambios fueron completamente reversibles ya que la apariencia histológica del cartilago y la sinovial regenerada eran completamente normales.

Para MITCHELL y CRUESS (1967b), la pérdida de la metacromasia había sido interpretada como inducida por la pérdida del condroitinsulfato del cartilago asociada a la degradación de la matriz.

Otros autores como HIRSCH (1944), COLLINS y Mc ELLIGOTT (1960) y BENDIT y FRENCH (1952), señalan que esta alteración metacromática era indicio de la degradación de la matriz, encontrando evidencia bioquímica para suponer tal interpretación (LUCY, DINGLE y FELL, 1961).

BOLLET, HANDY y STURGILL (1963), estudian el cartilago de una articulación osteoartítica observando la correlación entre esta pérdida metacromática y la disminución del condroitinsulfato, a lo que BOLLET y NANCE (1966), consideran como alteración en la cadena larga de los mucopolisacáridos.

Los estudios histoquímicos-enzimáticos de GALWAY y CRUESS (1972), demuestran la actividad catepsínica y de la fosfatasa ácida en los condrocitos en sus capas superficial y profunda en los animales a los que se les practicó la sinovectomía. En el material de control no se encontró actividad. Sin embargo, en la rodilla operada la actividad catepsínica había sido más notable entre los 7-15 días de la operación, tanto en la zona superficial como en la intermedia. La catepsina mostró una activi-

dad indiferente a partir de los 30 días.

Por el contrario la fosfatasa ácida se había encontrado en el estrato profundo del cartilago a las 72 horas de la intervención, mientras que en el lado testigo no se evidenciaba este enzima. Esta actividad se encuentra en todo el cartilago los días 7, 10 y 15 de la operación.

La tasa de actividad de la esterasa no específica, revela ocasionalmente una débil actividad a los 7 y 10 días de la sinovectomía.

La mayor actividad de la catepsina y de la fosfatasa ácida se ha comprobado que corresponde al mayor grado de la pérdida metacromática.

CURTIS y KLEIN (1965), han podido comprobar la disminución del contenido de hexosamina paralelamente al contenido de la pérdida metacromática en el cartilago articular osteoartítico.

La alteración de las características de la tinción en el cartilago articular postsinovectomía han sido muy similares a las que parecen representar las lesiones iniciales de la artritis degenerativa. De estos trabajos se deduce que las alteraciones producidas en la vecindad de la articulación por la sinovectomía, no han sido suficientes como para provocar cambios morfológicos en la estructura del cartilago; más aún, cuando se ha obtenido una regeneración histológica normal de la sinovial.

COLLINS y Mc ELLIGOTT (1960), refieren que tras la sinovectomía el cartilago articular limita su capacidad de regeneración, demostrando MEACHIM (1963), que existe un incremento en la captación del S^{35} cuando se realiza la escarificación del cartilago articular o, en nuestro caso, se practica la sinovectomía. Aunque dichos autores creen que el cartilago articular es incapaz de regenerarse, tras la agresión articular y considerando que la integridad estructural del cartilago se pierde o rompe, GALWAY y CRUESS (1972), demuestran que

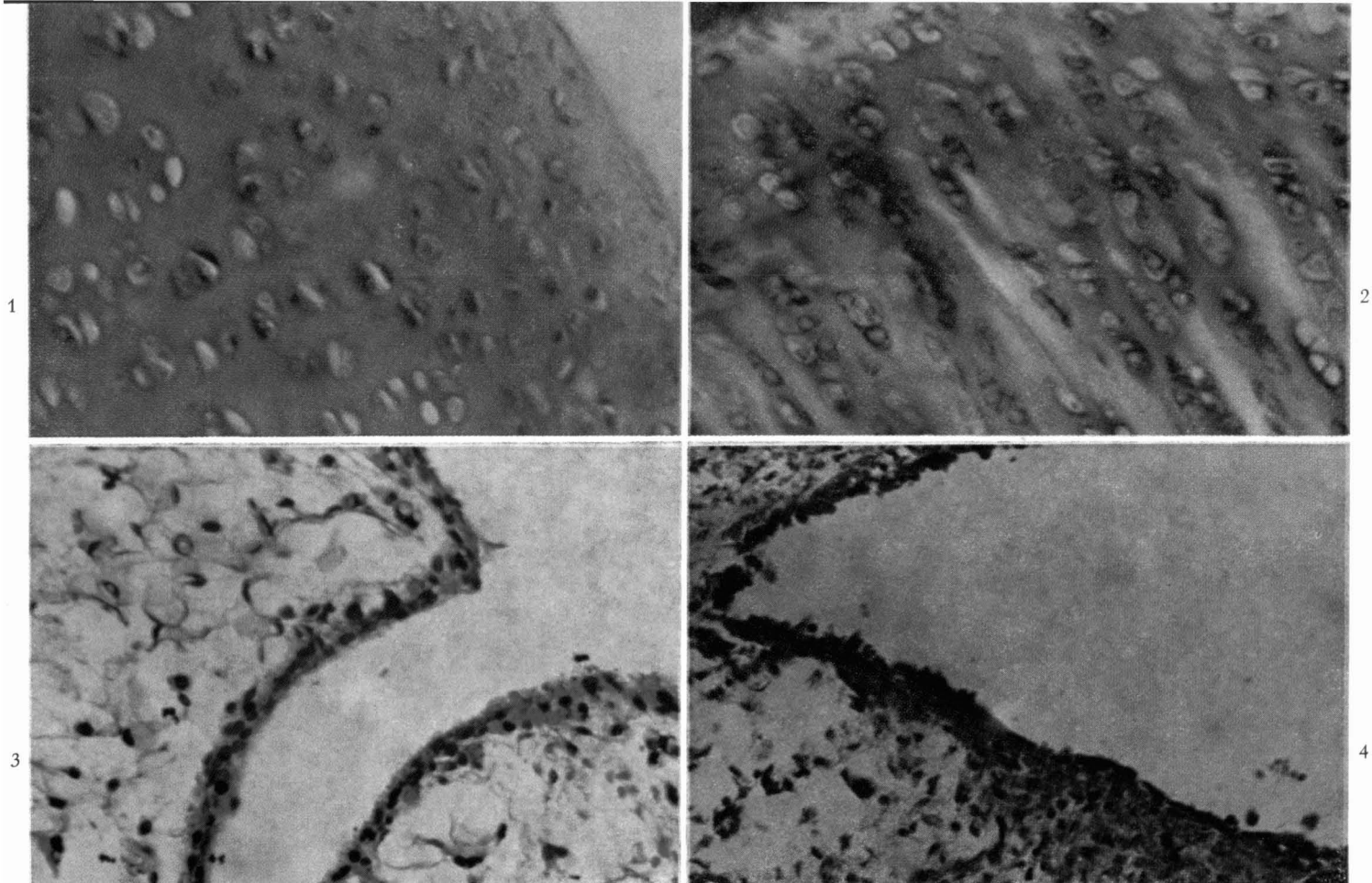
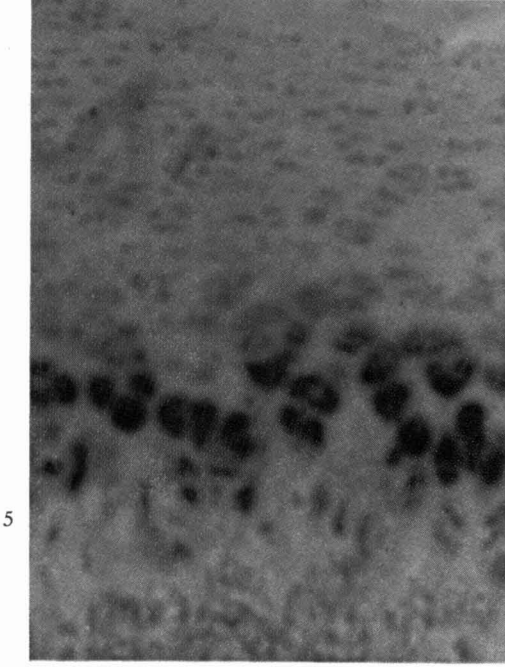
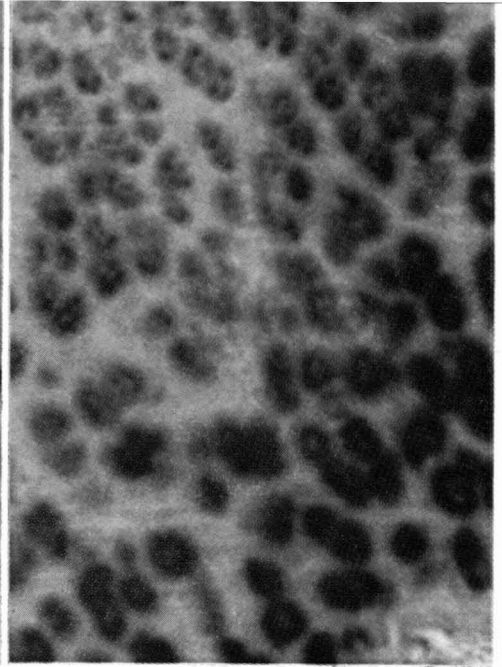


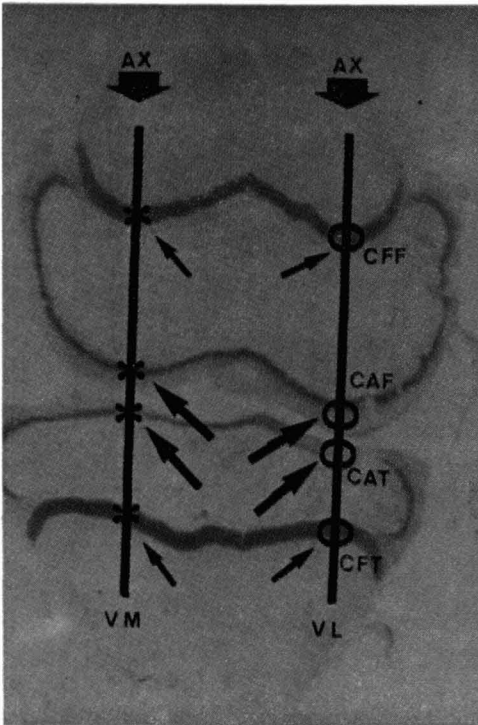
FIG. 1. — Cartílago articular conejo inmaduro. Azul de toluidina ($\times 100$). Pieza testigo. Sustancia fundamental de aspecto normal y teñida uniformemente. Metacromasia normal. ● FIG. 2. — Cartílago articular de conejo inmaduro. Azul de toluidina ($\times 250$). Pieza correspondiente a las tres semanas de la sinovectomía. La sustancia fundamental se encuentra con zonas de fisuración y resquebrajamiento intercelular y pérdida de la metacromasia. ● FIG. 3. — Membrana sinovial normal. Hematoxilina-eosina ($\times 250$). Pieza testigo. Zona superficial con una o dos capas de células bien definidas. Zona profunda muy vascularizada. Vellosidades de base ancha y abundantes adipocitos. ● FIG. 4. — Membrana sinovial a los veintiún días de la sinovectomía. Azul de toluidina ($\times 250$). Mayor incremento celular que en el testigo y que en intervalos anteriores. Los núcleos celulares son más ovalados u ovoideos que en estadios anteriores.



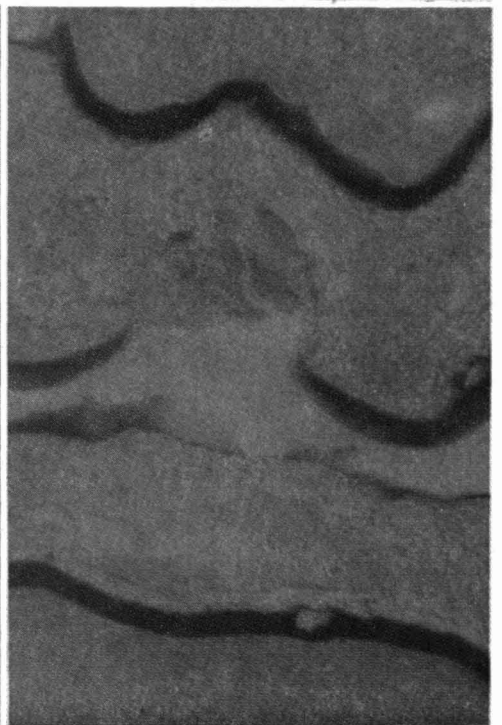
5



6



7



8

Fig. 5. — Autorradiografía: Cartílago articular (pieza testigo). Verde de metilo pironina ($\times 250$). Intensa incorporación del radiosulfato en el estrato profundo del cartílago y, en menor cantidad, en el estrato intermedio. ● FIG. 6. — Autorradiografía: Cartílago articular (pieza correspondiente a los veintidós días de la sinovectomía). Verde de metilo pironina ($\times 400$). La incorporación del radiosulfato es máxima con respecto a todos los intervalos tomados. La distribución alcanza a todos los estratos del cartílago articular. ● FIG. 7. — Método de barrido de la pieza con el densitómetro según un eje axial (AX), que pasa por las zonas de carga femoro-tibiales. Las flechas indican los lugares de medición. (CFF): Cartílago fisario femoral. (CAF): Cartílago articular femoral. (CAT): Cartílago articular tibial. (CFT): Cartílago fisario tibial. (VL): Vertiente lateral. (VM): Vertiente medial. Pieza testigo. Incorporación normal del isótopo S^{35} . ● FIG. 8. — Densitometría: Pieza correspondiente a los veintidós días de la sinovectomía. Obsérvese la intensa incorporación del radiosulfato en el cartílago articular, que sería máxima con respecto a todos los intervalos.

el cartílago articular es capaz de repararse elaborando nueva matriz a través de los condrocitos.

Contrariamente, MITCHELL y CRUESS (1967b), demuestran que tras la intervención no existe alteración en la afinidad del S^{35} en los condrocitos. Sin embargo, las experiencias de GALWAY y CRUESS (1972), comprueban en su serie que la captación del radiosulfato en los animales operados era mayor que en los testigos, datos aportados igualmente, años antes por SPICER y BRYANT (1958).

Existen evidencias de que el cartílago articular no sólo se rellena de esta nueva matriz después de la agresión articular sino que es capaz de aumentar la síntesis de la colágena en el proceso reparativo (REPO y MITCHELL, 1960).

COELHO y CHRISMAN (1960), demuestran que las pérdidas del sulfato en el cartílago son realizadas a través de un sistema enzimático-endógeno contrariamente a las observaciones de ZIFF, GRIBERZ y PALLUTO (1960) y LUŠCOMBE (1963), que consideran que se realiza a través de un sistema enzimático-exógeno.

Algunos autores refieren que la hialuronidasa puede ser la responsable de las pérdidas del condroitinsulfato de la matriz del cartílago en las artritis degenerativas. Esta pérdida se pone de manifiesto histológicamente por una disminución de la tinción metacromática de la matriz.

Es evidente que el concepto de que los enzimas endógenos del condrocito son activados para provocar tales cambios, sigue siendo hoy en día discutido.

ALÍ y EVANS (1969), correlacionan la catepsina «C» con la actividad esterásica mientras que FESSEL y CHRISMAN en 1964 publican un cálculo de la degradación enzimática de las condromucoproteínas en las células del cartílago articular humano.

WOESSNER (1967), demuestra que la catepsina «D» se ha presentado en el car-

tílago en suficiente cantidad como para ser efectiva, llevando a cabo el papel degradativo postulado por este autor.

Aunque la fosfatasa ácida no ha sido específicamente la causante de la degradación del cartílago, ha sido puesta en evidencia por incremento de la actividad enzimática del lisosoma (GALWAY y CRUESS, 1972). Se supone que la actividad enzimática demostrada, no es más que una manifestación de la hidrolasa ácida endógena, esterasa y actividad catepsínica, ocasionada por la alteración de la articulación, subsiguiente a la sinovectomía.

Algunos autores consideran que la catepsina y la hidrolasa ácida serían el mecanismo responsable de la degradación de la matriz y que iría asociada a una pérdida de la metacromasia, mientras que otros autores consideran que el líquido sinovial puede tener cualidades enzimáticas inhibitorias (GOMAR, 1973).

La hemartrosis experimental ha demostrado que no produce alteración de la metacromasia, causa que para algunos autores era la responsable de esta modificación de tinción.

Los hallazgos experimentales recogidos de la revisión bibliográfica confirman que los enzimas condrocíticos de naturaleza proteolítica son los responsables de la degradación de la matriz, concomitantes con la pérdida de la tinción metacromática postsinovectomía y que esta degradación continúa hasta la regeneración completa de la sinovial.

La valoración de los cambios enzimáticos sugiere que las alteraciones histológicas en el cartílago articular pueden ser mediadas por la activación de los enzimas lisosómicos endógenos del condrocito, particularmente la catepsina y las hidrolasas ácidas.

La regeneración sinovial. — Algunos autores como KEY (1925), WOLCOTT (1927)

y MITCHELL y CRUESS (1967b), demostraron que después de la sinovectomía en animales se desarrolla una nueva membrana sinovial que es de apariencia semejante a la normal. Consideraron que este tejido resultaba de la proliferación y metaplasia de elementos mesenquimales peri-regionales y no del crecimiento de las células sinoviales después de la intervención.

En 1964, BARLAND y cols., y más recientemente ROY y GHADIALLY (1967), establecen la fina estructura de la sinovial normal, afirmando que se caracteriza por dos tipos diferentes de células identificables por sus contenidos orgánicos.

El primer tipo, correspondiente a las células del tipo A, contienen numerosas vacuolas, procesos citoplasmáticos y mitocondrias, creyéndose que tienen alguna función absorbente.

El segundo tipo, las células del tipo B, contienen principalmente un áspero retículo-endoplásmico que pudiera ser productor de proteínas.

Las experiencias de MITCHELL y BLACKWELL (1968), empleando microscopía electrónica, confirman las observaciones anteriores, haciendo constar que entre las células del tipo A y B, existe una sorprendente diferencia en la organización de la cromatina nuclear. El núcleo de las células tipo A tiene la cromatina agrupada periféricamente mientras que las células tipo B no tienen tal agrupación ya que se encuentran uniformemente dispersadas.

REDLER y ZIMNY (1970), examinando la membrana sinovial a microscopía electrónica demuestran que su superficie tiene una apariencia estriada, aunque no mostró vellosidades prominentes o excesivos pliegues. Tiene abundantes superficies porosas que miden aproximadamente 100.000 Å de diámetro. La naturaleza de estos poros es desconocida, representando canales intercelulares abiertos como previamente habían descrito BARLAND, NOVIKOFF y HAMERMAN

(1964). Adheridos a la superficie de la membrana existen células de la serie roja, restos de tejidos celulares y depósitos de líquido sinovial.

La sinovial extraída de las rodillas con artritis degenerativas revela un aumento de las vellosidades. Muchas de ellas aparecen apretadas y comprimidas. Se han encontrado abundantes poros que son más grandes que los encontrados en la sinovial normal; miden aproximadamente unos 200.000 Å de diámetro. Se han visto conexiones tubulares.

La superficie de la sinovial en la artritis reumatoidea es desordenada debido al número de vellosidades, aunque dicho aumento es mucho menor que las que se han visto en la membrana sinovial de las articulaciones degenerativas. La superficie de los poros es más pequeña y menos prominente que en la sinovial normal, aunque su tamaño es aproximadamente igual.

Las rodillas de los especímenes a los que se ha practicado la sinovectomía, muestran a los 4 días la presencia de un hematoma organizado típico; el campo histológico se ve ocupado por una débil red de fibrina y restos celulares, entre los que se encuentran dos tipos de células:

A. *Macrófagos*: Que tienen una apariencia normal de células reticuloendoteliales (BESSIS, 1964). Estos macrófagos poseen un citoplasma vacuolado conteniendo mitocondrias, poco retículo endoplásmico y un núcleo cuyo patrón de cromatina se dispersa hacia la periferia.

B. *Fibroblastos*: Células alargadas que tienen un núcleo con cromatina uniformemente repartida y el citoplasma ocupado por un áspero retículo endoplásmico.

A los 8 días de la sinovectomía, la fibrina y restos celulares han desaparecido aunque no totalmente. Los dos tipos celulares persisten. La mayoría de las células presentan hasta los 35 días un prominente

nucléolo confirmando así su naturaleza inmadura.

A los 15 días de la intervención, los macrófagos y fibroblastos son muy similares a las células del tipo A y B de la sinovial normal. Las células tipo A, poseen procesos citoplasmáticos bien definidos mientras que las de tipo B están más hinchadas, persistiendo el sabido patrón desodernado de cromatina nuclear.

A los 35 días de la sinovectomía la regeneración parece ser casi completa y la nueva membrana de aspecto normal. Las células inferiores se hacen de forma más cúbica y pierden su apariencia aplanada. En las células del tipo A, los procesos citoplasmáticos son prominentes y el patrón nuclear marginado. En las del tipo B, se presenta un abundante retículo endoplásmico.

Entre los 84 y 100 días, sólo se produce la maduración de la nueva membrana. No se perciben más cambios morfológicos. Los tipos celulares A y B persisten, siendo más abundantes los del tipo B.

Desde los trabajos de KEY (1925), se ha suscitado la discusión sobre la génesis de la nueva membrana sinovial. Sin embargo, las experiencias de MITCHELL y CRUESS (1967b), demuestran que la nueva sinovial se regenera a expensas de células mesenquimales localizadas en el área articular y no de los restos sinoviales de la región posterior de la rodilla que quedan sin extirpar y sólo representan el 5 por 100 del total (MITCHELL y CRUESS, 1967a).

La microscopía electrónica ha permitido visualizar los dos tipos de células sinoviales con caracteres estructurales diferentes; es evidente que las células mesenquimales iniciales aparezcan primero como reacción reconstructiva y secundariamente forman la nueva membrana sinovial. Es interesante reseñar que las células macrofágicas, vistas a lo largo del período regenerativo, aparezcan finalmente convertidas

en típicas células del tipo A iguales a las de la sinovial normal, del mismo modo que los fibroblastos tomen la apariencia de células sinoviales del tipo B (MITCHELL y BLACKWELL, 1968).

Características semejantes corresponden a la cromatina nuclear ya que las células del tipo A contienen una cromatina difusa mientras que las del tipo B, un débil sistema cromatínico.

El resultado final de este proceso es la regeneración sinovial, conteniendo las células del tipo A y B con típicas sustancias cromatínicas y distintos contenidos citoplasmáticos.

Para WOLCOTT (1927), la regeneración requiere un período de cuatro semanas postsinovectomía mientras que para MITCHELL y CRUESS (1967b) se considera completamente regenerada a los 60 días.

Los trabajos más recientes de MITCHELL y BLACKWELL (1968), afirman que la membrana se regenera a los 35 días, madurando hasta los 100 en que ya no existen diferencias histológicas con la sinovial normal.

Material y métodos

Se han utilizado un total de 37 conejos jóvenes inmaduros, de raza New Zeland, repartidos en cinco series de la siguiente forma:

Serie I: Ocho conejos para el estudio histológico del cartilago articular.

Serie II: Ocho conejos para el estudio histológico de la membrana sinovial.

Serie III: Seis conejos para el estudio autorradiográfico del cartilago articular empleando S^{35} .

Serie IV: Diez conejos para el estudio densitométrico del cartilago articular con técnica autorradiográfica y empleando S^{35} .

Serie V: Cinco conejos para el estudio biodinámico del S^{35} en el condrocito por medio de la microscopía electrónica.

Dichos animales de experimentación han presentado un peso comprendido entre los 350 y 455 gr., en el momento de practicarse la sinovectomía y cuya edad ha sido para todos ellos de 21 días. Para cada serie se han tomado los conejos de la misma camada o de dos semejantes, dependiente del número de conejos tomados para cada serie. Se les ha administrado el mismo tipo de alimentación y mantenidos en las mismas condiciones de habitabilidad, siendo dejados libremente en jaulas amplias, tanto antes como después de la intervención. En todos los animales se ha dejado la rodilla derecha como testigo, realizando la sinovectomía en la izquierda.

Respecto a la técnica de la sinovectomía, hay que hacer constar que en todos los animales de experimentación se ha guardado un riguroso control de asepsia, tanto en lo que se refiere a material e instrumental quirúrgico como al personal. La sinovectomía se realizó en todos los animales a los 21 días de edad, siguiendo la técnica basada en datos recogidos de la bibliografía.

Métodos.—Han sido los siguientes para cada serie:

Primera serie: Se realiza un estudio histológico de las piezas operatorias y testigos correspondientes a los intervalos desde la primera semana hasta la octava de la intervención. Se realiza la técnica histológica según la técnica habitual pero empleando como tinción el azul de toluidina al 0'1 por 100 para valorar las alteraciones metacromáticas de la sustancia fundamental y que no interfiera con las posibles modificaciones del condrocito.

Segunda serie: Se realiza la técnica histológica de igual modo que en la serie anterior y durante las ocho semanas siguientes de la intervención. Se emplea igualmente el azul de toluidina al 1 por 100 para la tinción de las piezas. Se estudian

las modificaciones que sufre la membrana sinovial hasta su regeneración completa.

Tercera serie: En esta serie se recurre al empleo del S^{35} que se administra por vía intracardiaca a la dosis de 1 mCi/kg. de peso, seis horas antes del sacrificio del animal y durante las seis semanas siguientes de la sinovectomía. Una vez tomadas las piezas, testigos y operadas, de las rodillas de los animales, se procede a la fijación y decalcificación de las mismas. Se colocan los cortes histológicos sobre el portaobjetos, a los que se adosa en cámara oscura y siguiendo la técnica del «stripping film», la película autorradiográfica de Kodak AR-10. Se conservan las piezas en la nevera y en cámara oscura mediante cajas ennegrecidas durante 87 días a partir de los cuales se realiza la tinción de las mismas, con su película autorradiográfica adosada, con verde de metilo-pironina, comprobándose con el microscopio óptico el ennegrecimiento típico que causa el S^{35} sobre el cartilago articular. Con ello se consigue una valoración cualitativa de incorporación del radioisótopo y su localización en los estratos del cartilago.

Cuarta serie: Se recurre al mismo método de obtención y técnica autorradiográfica que en la serie anterior, con la única diferencia de que en este caso no se tiñen las piezas. Estas se llevan a un densitómetro, tipo Vitatron, para realizar la valoración cuantitativa de incorporación del S^{35} en el cartilago articular. Se realizan dos subseries, A y B, esta segunda de confirmación, correspondientes a los intervalos de las cinco semanas siguientes a la sinovectomía.

Quinta serie: Estudio con el microscopio electrónico de los condrocitos del cartilago articular de las piezas correspondientes a las cuatro semanas siguientes a la sinovectomía. Primero tomamos una pieza testigo (no operada) para obtener un patrón comparativo con las rodillas opera-

das. Se toman pequeñas piezas de cartílago articular, zona de carga, del tamaño de 1 mm. × 1 mm. y se cultivan *in vitro* en un medio que contiene el radioisótopo. La determinación que se realiza en esta serie es cualitativa, permitiéndonos realizar un estudio biodinámico del S³⁵ intracelular en los diversos tiempos de incorporación y comparar la pieza testigo con las operadas.

Resultados: Los resultados obtenidos en las cinco series han sido:

Primera serie: Con los datos obtenidos con las piezas histológicas a lo largo de esta serie y con la ayuda del microscopio óptico, se evidencia claramente que existe una alteración de la tinción metacromática en la sustancia fundamental del cartílago articular del conejo inmaduro, postsinovectomía. Esta alteración de tinción, como veremos, es reversible y dependiente del intervalo transcurrido desde la intervención. En comparación con las piezas testigo se ha visto que no existe en ningún caso alteración morfológica de los condrocitos, lo que nos indica que la sinovectomía tiene unos efectos muy selectivos sobre la sustancia fundamental. Metacromáticamente se aprecia ya a los 7 días de la intervención una zona de abstención metacromática en la zona superficial del cartílago. Esta zona aumenta en profundidad a las dos semanas de la sinovectomía para hacerse de mayor intensidad a los 21 días de la intervención. A partir de las cuatro semanas de la operación se va reduciendo esta abstención metacromática en profundidad, para alcanzar los estratos más superiores entre las cinco y las seis semanas de la sinovectomía. A las siete semanas de la intervención, el aspecto histológico del cartílago articular es prácticamente normal y a las ocho semanas de la misma no existe ninguna diferencia microscópica entre la pieza testigo y operada. A lo largo de toda la experimentación no se apreciaron altera-

ciones estructurales en el cartílago ni morfológicas en los condrocitos (figs. 1 y 2).

Segunda serie: De igual forma que el cartílago articular sufre unas alteraciones con la sinovectomía, la membrana sinovial refleja otras características que como veremos son causantes y congruentes con las objetivadas en la primera serie. A los 7 días de la sinovectomía se aprecia un incremento celular en las zonas más superficiales de la membrana sinovial, con elementos celulares de tipo fibroblástico. A los 14 días de la intervención el incremento celular es mayor y dispuesto en varias capas. Este aumento de la celularidad se acentúa a los 21 días de la sinovectomía, mostrando las células unos núcleos más ovalados. A los 28 días, las vellosidades sinoviales son de aspecto digitiforme con una disminución de la celularidad, menos células en la capa más superficial y espacios lacunares ocupados ya por material fibroso. Se aprecian signos evidentes de regeneración intracelular. A los 35 días de la sinovectomía, la disminución de la celularidad y el incremento de la fibrosis son manifiestos y significativos de reparación sinovial. A los 49 días de la intervención, la fibrosis es muy marcada, mostrando unas vellosidades alargadas y muy vascularizadas. La *restitutio ad integrum* de la nueva membrana sinovial es patente a los 56 días de la sinovectomía. No existen diferencias entre la nueva membrana sinovial regenerada y la testigo (figs. 3 y 4).

Tercera serie: Hemos podido comprobar cualitativamente en esta serie como la sinovectomía provoca también un trastorno metabólico pero reversible, en el cartílago articular inmaduro tras la sinovectomía. La fijación y localización del S³⁵, determinada ya en las piezas testigos, se van a ver alteradas en los diferentes intervalos después de la intervención. En efecto, en la primera semana postsinovectomía, la incorporación del radioisótopo en el estrato

profundo y en el más basal del intermedio muestran cualitativamente una disminución evidente, comparado con la rodilla contralateral (no operada). Por el contrario, a la segunda semana de la intervención se aprecia un incremento acelerado de incorporación en todos los estratos del cartílago, diferencia evidente con respecto al testigo que se acentúa y pone de manifiesto a las tres semanas de la sinovectomía, en que la captación del S^{35} se fija con mayor intensidad que en el intervalo anterior y muy superior con respecto al testigo, no sólo en cuanto a incorporación sino también con respecto a su localización (prácticamente todos los estratos del cartílago articular). A partir de la cuarta semana de la intervención, esta incorporación del radioisótopo se ve disminuida con respecto al intervalo anterior pero todavía superior en comparación con la rodilla no operada. Prácticamente en la quinta semana y totalmente en la sexta semana, se adquieren de nuevo los valores normales, no encontrando diferencias con la pieza testigo (figs. 5 y 6).

Es evidente que la no modificación del estrato profundo del cartílago habla a favor de que la sinovectomía altera solamente las capas más externas del cartílago articular, en especial el estrato superficial y el más superior del estrato intermedio, donde las variaciones de captación del radioisótopo son más evidentes. Por otro lado, el estrato profundo se ve metabólicamente hiperactivado con dicha intervención.

Cuarta serie: Esta serie nos ha permitido no sólo confirmar los datos obtenidos en la serie anterior sino también poder determinar una valoración cuantitativa relativa de incorporación del radiosulfato en el cartílago articular. Para esta determinación nos servimos de un densitómetro en el que se analizan todas las piezas testigo y operadas, estableciendo unos parámetros, gráficos y numéricos que nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

a) Diferencias existentes entre las piezas testigos de las series A y B: No diferencias significativas (n. d. s.).

b) Diferencias existentes entre las pie-

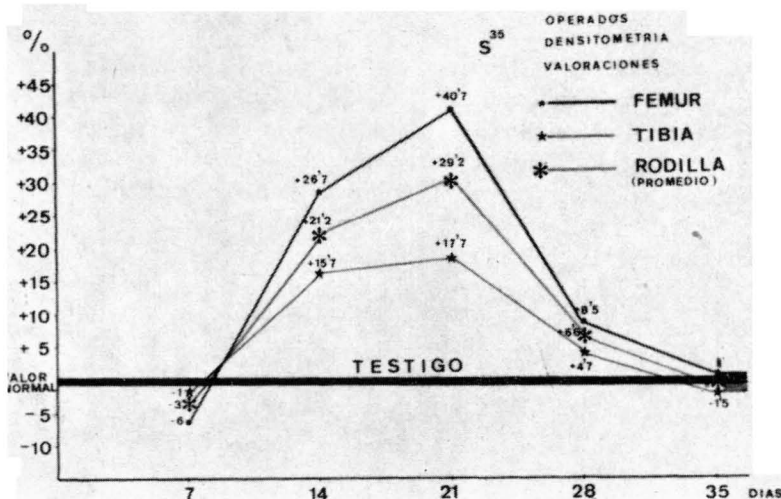


FIG. 9. — Densitometría: Representación esquemática de la serie, mostrando los valores obtenidos en el fémur, en la tibia y globalmente en las rodillas de los animales operados.

zas operadas de las series A y B: Estudiadas aisladamente por intervalos (n. d. s.).

c) Valoración de los fémures en las series A y B:

Primera semana: Disminución de captación (6 por 100) respecto al testigo.

Segunda semana: Incremento de captación (26'3 por 100) respecto al testigo.

Tercera semana: Incremento de captación (40'7 por 100) respecto al testigo.

Cuarta semana: Incremento de captación (8'5 por 100) respecto al testigo.

Quinta semana: Valores que oscilan entre + 3'5 y — 1'5 por 100 (n. d. s.).

d) Valoración de las tibias en las series A y B:

Primera semana: Disminución de captación (1 por 100) respecto al testigo.

Segunda semana: Incremento de cap-

tación (15'7 por 100) respecto al testigo.

Tercera semana: Incremento de captación (17'7 por 100) respecto al testigo.

Cuarta semana: Incremento de captación (4'7 por 100) respecto al testigo.

Quinta semana: Disminución del 1'5 por 100 respecto al testigo (n. d. s.).

e) Diferencias entre las tibias y fémures de ambas series. — Consideraciones generales y conclusiones (figs. 7 y 8):

— Existe una mayor afinidad de captación del S^{35} en los fémures que en las tibias operadas.

— No existen (d. s.) de captación entre las vertientes medial y lateral de la rodilla (fémur y tibia), zonas de carga.

— Todos los testigos muestran una capacidad de captación semejante en los cinco intervalos.

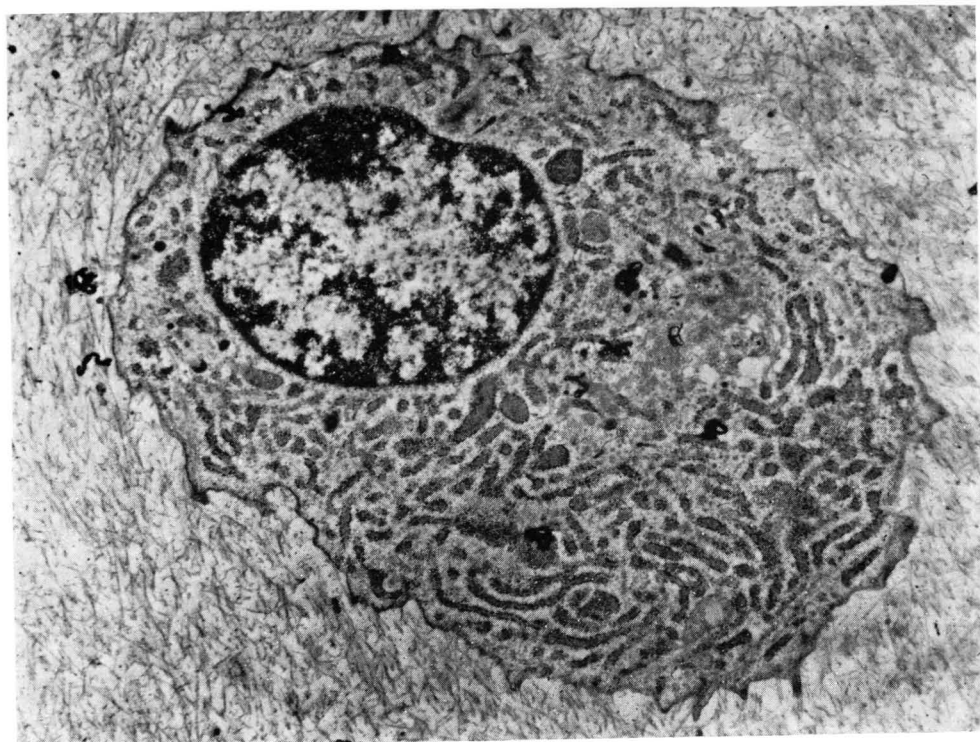


FIG. 10. — Condrocito de cartílago articular inmaduro. Testigo. Incorporación de sulfato (S^{35}): 1'5m Ci/ml. Veinte minutos de incorporación: El complejo de Golgi está selectivamente marcado quedando algunas marcas todavía en el espacio extracelular ($\times 16.758$).

— Biodinámica de la serie (fig. 9):

Primera semana: Fase de incorporación descendente (— 6 por 100).

Segunda semana: Fase de incorporación ascendente (+ 26'3 por 100).

Tercera semana: Fase de incorporación máxima (+ 40'7 por 100).

Cuarta semana: Fase de incorporación descendente (\neq).

Quinta semana: Fase de incorporación normal (\emptyset).

f) Estudio gráfico comparativo entre la incorporación del S^{35} en el cartílago articular y el cartílago fisario:

I. La captación en el cartílago fisario ha sido superior, tanto para las piezas testigo como operadas, a las del cartílago articular.

II. Es más intensa la incorporación en la fisis de la tibia.

III. No hay alteraciones de incorpora-

ción entre los cartílagos fisarios de las rodillas operadas con respecto a las testigo: La sinovectomía pues, no altera el metabolismo del cartílago fisario.

Quinta serie: Establecido con el cartílago articular de la rodilla no operada un patrón de incorporación y desmarca en sus diferentes tiempos, llegamos a la conclusión de que es evidente el descenso de la radiactividad durante la primera semana de la sinovectomía, el subsiguiente ascenso durante la segunda semana por encima de los valores normales con una mayor velocidad de fijación que se incrementaría en el intervalo de la tercera semana para llegar a estabilizarse en la cuarta, adoptando unos patrones semejantes a los obtenidos en la pieza testigo (figs. 10 y 11).

Claramente se manifiesta la importancia que tiene el aparato de Golgi como estructura fijadora precozmente del S^{35} , al-

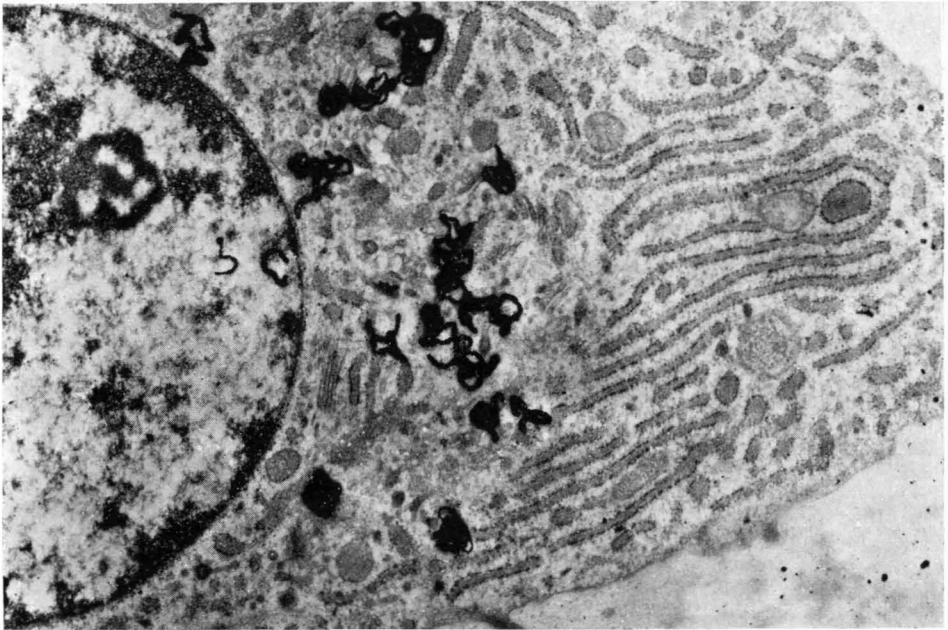


FIG. 11. — Condrocito de cartílago articular inmaduro. A los veintidós días de la sinovectomía. Incorporación de (S^{35}) sulfato: 1'5m Ci/ml. Veinte minutos de incorporación: el complejo de Golgi está intensamente marcado. Valoración muy superior con respecto al testigo y con todos los intervalos tomados ($\times 30.780$).

macerador del mismo y distribuidor del producto al espacio extracelular. Por otro lado es interesante señalar que esta fijación precoz, ya a los 10 mn. de la incorporación en el Golgi, finaliza con la desaparición de la radiactividad a los 20 mn. de incorporación y 120 mn. de desmarca. La figura 12 nos muestra la gráfica biodinámica del S^{35} a lo largo de esta serie en el condrocito.

Discusión

De los resultados obtenidos con el estudio histológico, autorradiográfico, densitométrico y ultramicroscópico del cartilago articular, postsinovectomía de la rodilla en el conejo inmaduro se desprende el hecho de que dicha intervención provoca unos efectos evidentes, no sólo sobre el metabolismo del cartilago sino también sobre la membrana sinovial.

Por el contrario la estructura condrocítica se ha mostrado normal y no ha presentado ninguna alteración morfológica a lo largo de toda la experimentación.

Histológicamente, los resultados obtenidos por GALWAY y CRUESS (1972), mostraban unas alteraciones en la sustancia fundamental, de tipo metacromático, evidentes ya a los 5 días de la intervención. Para estos autores, la pérdida metacromática aumentaba en profundidad y se hacía muy evidente a los 10 días de la sinovectomía. La mayor intensidad de esta alteración metacromática se encuentra entre los 15 y 30 días de la operación, para posteriormente recuperarse entre los 30 y 45 días de la misma, excepto en algún caso que podía llegar a los 60 días sin llegar a encontrar diferencias significativas con la pieza testigo.

En nuestro trabajo y correspondiente a la primera serie, la pérdida metacromática se apreciaba a los 7 días de la sinovectomía, aumentando en profundidad a los 14 días en que ya se encuentra afectado todo el cartilago articular, para hacerse muy intensa a las tres semanas, a partir de las cuales comenzaba su regresión hasta alcanzar unas características metacromáti-

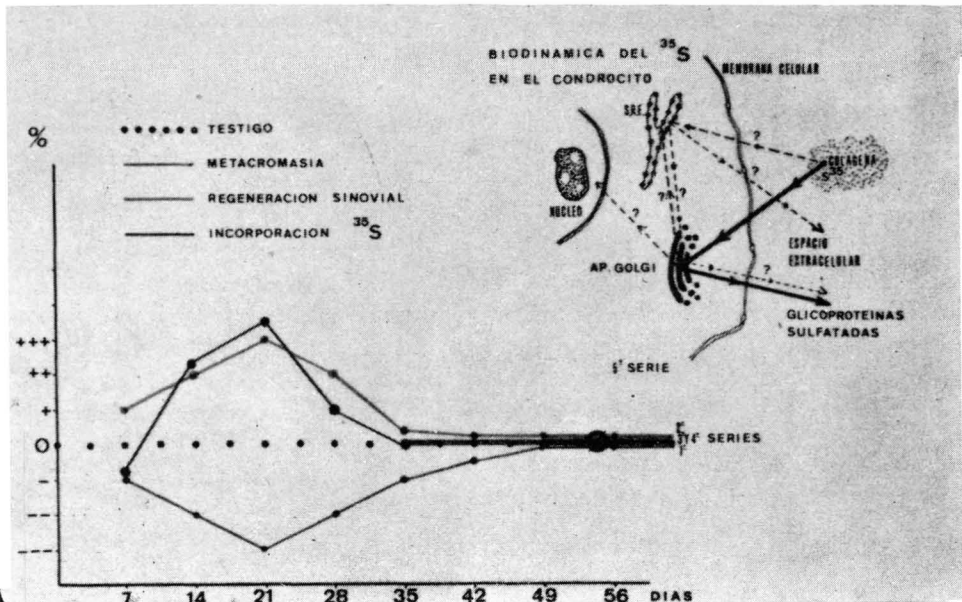


FIG. 12. — Representación esquemática y gráfica de toda la experimentación por series.

cas a los 56 días de la intervención, semejantes a las encontradas en la pieza testigo.

Años antes, semejantes datos fueron encontrados también por MITCHELL y CRUESS (1967b), indicando que esta pérdida metacromática era debida a una degeneración enzimática de la matriz, como demostrarían igualmente LUCY, DINGLE y FELL en 1961.

MITCHELL y CRUESS (1967b), señalan, además, que esta degradación de la matriz era inducida por la pérdida del condroitin-sulfato del cartílago articular durante el período de regeneración de la membrana sinovial.

Los trabajos de MEACHIM, (1963), llegan a la conclusión de que las alteraciones producidas en la vecindad de la articulación (sinovectomía), no habían sido suficientes para provocar una alteración morfológica del condrocito, pero sí, como demuestran la mayoría de los autores, para provocar esta pérdida metacromática de la sustancia fundamental.

Así pues, de nuestra experiencia y a través de los datos bibliográficos recogidos se demuestra que en el conejo inmaduro la sinovectomía produce una alteración en la sustancia fundamental (pérdida metacromática), producida por una despolimeración intensa de los mucopolisacáridos ácidos (condroitinsulfato) y respetando la estructura normal del condrocito, con un carácter de reversibilidad que hace que el cartílago articular vuelva a tener las mismas características histológicas que antes de la intervención.

El estudio histológico de la regeneración sinovial, de nuestra segunda serie, muestra igualmente unos resultados muy selectivos, selectividad que como veremos está en íntima relación con los cambios metacromáticos sufridos en el cartílago articular.

Los trabajos de KEY (1925) y WOLCOTT (1927), demostraban ya, lo que cuarenta

años más tarde confirmarían MITCHELL y CRUESS (1967b), de que tras la sinovectomía en animales se producía y desarrollaba una nueva membrana sinovial, de apariencia y características semejantes a la normal.

Para los primeros autores, la regeneración sinovial se producía a los 28 días de la intervención, mientras que para los segundos la regeneración era completa a los 60 días de la misma.

Los trabajos más recientes de MITCHELL y BLACKWELL (1968), afirman que la membrana sinovial se regenera a los 35 días pero que va madurando hasta los 100, sin encontrar igualmente diferencias con la membrana sinovial normal.

En nuestra serie, la regeneración completa de la sinovial se produce a los 58 días de la operación, estadio en el cual no se encuentran diferencias histológicas significativas con la membrana sinovial normal. Creemos, sin embargo, que existirá una etapa de maduración, como señalan MITCHELL y BLACKWELL (1968), y dependientes de las características de la intervención y del animal de experimentación.

Aunque durante mucho tiempo se ha especulado sobre la génesis de la nueva membrana sinovial, los trabajos de MITCHELL y CRUESS (1967a), confirman que la regeneración se realiza a expensas de células mesenquimales localizadas en el área articular y no a través de los restos sinoviales de la región posterior de la rodilla que quedan sin extirpar y que sólo representan el 5 por 100 del total de dicha membrana.

Aunque en nuestra serie no hemos pretendido demostrar esta génesis sinovial, creemos que la teoría de MITCHELL y CRUESS (1968), basada en estudios con microscopía electrónica, es más acertada al afirmar que de los dos tipos de células sinoviales halladas a lo largo del período de regeneración, las células macrofágicas

aparezcan finalmente convertidas en típicas células del tipo A, iguales a las de la sinovial normal, del mismo modo que los fibroblastos toman la apariencia de células sinoviales del tipo B.

De nuestra serie y de la revisión bibliográfica se desprende que la regeneración sinovial es una realidad histológicamente admitida y que consideramos se encuentra en íntima relación con los cambios metacromáticos vistos en la serie anterior.

Con el estudio autorradiográfico del cartílago articular postsinovectomía y correspondiente a nuestra serie tercera, hemos podido encontrar igualmente unas alteraciones evidentes en cuanto a captación y localización del radioisótopo se refiere.

Desde los trabajos de LAYTON (1951), está demostrada la gran afinidad del cartílago articular por el S^{35} , demostrándose que es la célula activa la que incorpora el isótopo a su metabolismo, esto es, en las síntesis de las proteínas azufradas y mucopolisacáridos azufrados, especialmente el condroitinsulfato (McELLAGOTT y COLLINS, 1960).

Los trabajos de MANKIN y LIPPIELLO (1969), demuestran que la distribución del S^{35} se realiza uniformemente en el cartílago articular, si bien como en nuestra serie, hemos encontrado que la zona fijadora del radioisótopo en condiciones normales se distribuye en la zona situada entre el estrato superficial y el estrato de cartílago calcificado, es decir, corresponde aproximadamente a los estratos intermedio y profundo del cartílago articular. Esto nos resulta muy importante ya que hemos podido observar que la intervención realizada a nuestros animales de experimentación con la sinovectomía, modifica parcialmente este patrón de distribución del radiosulfato. En efecto, así como la pieza testigo presenta las características anteriormente

mencionadas, la pieza operatoria correspondiente a los 7 días de la intervención nos muestra el mismo patrón de distribución pero discretamente en menor cantidad de fijación, señalando, además, que no hemos encontrado la presencia del radioisótopo en el estrato superficial ni en la zona más superior del estrato intermedio; sin embargo, no se modifica la localización y actividad en el estrato profundo.

Por el contrario, a los 14 días de la sinovectomía, la incorporación y fijación del azufre radiactivo se distribuye prácticamente por los tres estratos del cartílago articular, más intensamente en los estratos intermedio y profundo. Esa valoración cualitativa se muestra mucho más intensa a los 21 días de la intervención, señalando que la capa profunda mantiene una mayor fijación que en intervalos anteriores. A partir de este intervalo, los valores de incorporación y distribución tienden hacia la normalidad en la cuarta semana, no encontrándose diferencias apreciables a las cinco semanas de la operación entre testigo y operado.

La intensa incorporación del S^{35} a la tercera semana de la sinovectomía, nos hace pensar en un gran incremento de queratosulfatos producidos en el cartílago articular, esto es, un aumento relativo de los mucopolisacáridos neutros respecto a los ácidos.

Para realizar una valoración cuantitativa de la serie anterior, recurrimos a nuestra cuarta serie que consistió en realizar un estudio autorradiográfico-densitométrico de todas las piezas a lo largo de las cinco semanas de la experimentación. En ella volvimos a encontrar los valores cualitativos encontrados en la serie anterior volviendo a insistir en los valores obtenidos durante la segunda, tercera y cuarta semanas especialmente, donde los valores de incorporación llegaron a ser superiores con respecto al testigo en un 26'7, 40'7 y 8'5

por 100, respectivamente. Recordemos que en estos intervalos es cuando son más evidentes las alteraciones metacromáticas, las características histológicas de la regeneración sinovial y cuando cualitativamente encontrábamos más incorporación de S^{35} en el cartílago articular según técnica autorradiográfica.

Insistimos en que esta valoración cuantitativa la consideramos como relativa o aproximada, dado el corto número de animales de experimentación empleados.

Con los datos obtenidos en las cuatro series, llegamos a la conclusión de que después de realizada la sinovectomía el cartílago articular presenta una fase de *latencia* metabólica que corresponde a una pérdida metacromática en su estrato intermedio-superficial, con un incremento discreto de la celularidad sinovial y una mejor incorporación de radiosulfato.

A esta fase sigue otra de *actividad intensa*, correspondiente a los intervalos de 14 y 21 días de sinovectomía, en donde la pérdida metacromática es intensa, la celularidad sinovial es máxima y la incorporación y fijación de radiosulfato es muy superior que en estadios anteriores o posteriores.

Finalmente, se llega a una fase de *estabilización*, donde las características del cartílago articular y de la membrana sinovial muestran un aspecto semejante a las piezas testigos, no encontrándose diferencias significativas con las mismas.

Para completar este estudio y trabajo de investigación, hemos recurrido esta vez en la quinta serie al empleo de la microscopía electrónica, empleando igualmente S^{35} , para poder determinar no sólo la biodinámica del azufre radiactivo en el condrocito normal sino también en el condrocito tras la sinovectomía de la rodilla en el conejo inmaduro, durante las cuatro semanas siguientes a la operación, a partir de las cuales no se aprecian ya diferencias ultrami-

croscópicas entre el condrocito del cartílago articular normal y el correspondiente de la rodilla operada.

Nos hemos servido de los trabajos de GODMAN y LANE (1964), que tras la administración del radiosulfato estudian los lugares de sulfatación y distribución del S^{35} . Estamos de acuerdo con sus estudios, en la importancia que tiene el aparato de Golgi como aceptor, transportador y acumulador del producto y la fijación precoz en sus vesículas. De aquí, las glicoproteínas pasarían al espacio extracelular, ya sulfatadas.

En nuestra serie, a los diez minutos de la incorporación se puede comprobar como el aparato de Golgi está selectivamente marcado, aunque para otros autores como WHITEHOUSE y BOSTROM (1962), sería de cinco minutos.

Sin embargo, THORP y DORFMAN (1963), en sus trabajos llegan al igual que nosotros a la conclusión de que el aparato de Golgi se encuentra selectivamente marcado a los diez minutos de la incorporación.

Desconocemos si las glicoproteínas sulfatadas a partir del complejo de Golgi son directamente distribuidas al espacio extracelular o bien se acumulan en otras organelas como demuestran FORTEZA, MARTÍNEZ y HERNÁNDEZ (1973), con aminoácidos marcados en embriones de pollo.

Hemos podido comprobar que las únicas diferencias apreciables con este estudio microscópico de alta resolución, a lo largo de las cuatro semanas de la experimentación, han consistido en una menor incorporación del S^{35} en la primera semana, aumentada en la segunda y máxima en la tercera, para adoptar los valores normales del testigo en la cuarta. Por otro lado la actividad del complejo de Golgi es manifiesta en todos los intervalos, aunque existe un mayor enlentecimiento de captación en el período de 7 días postsinovectomía. Finalmente, es de interés señalar que no hemos encontrado alteración morfológica

ni estructural de los condrocitos en ningún intervalo.

Resumiendo estas cinco series podemos determinar que a lo largo de toda la experimentación la sinovectomía no ha provocado alteración morfológica ni de los condrocitos ni del cartilago articular, sino una alteración metabólica reversible del mismo, motivada por una alteración de la nutrición de las capas más superficiales del cartilago articular.

Conclusiones

I

La sinovectomía de la rodilla en el conejo inmaduro provoca una serie de alteraciones en el cartilago articular que dependen directamente del tiempo transcurrido desde la intervención hasta el sacrificio del animal.

II

Los hallazgos más importantes observados a lo largo de la experimentación se producen entre la primera y cuarta semana de la sinovectomía.

III

Las alteraciones en el cartilago articular son ya evidentes a los 7 días de la intervención, encontrando una pérdida metacromática en la sustancia intercelular en las capas superficial e intermedia del cartilago. Estas modificaciones en la sustancia fundamental se incrementan en profundidad a los 14 días de la sinovectomía. Esta alteración se hace más evidente a los 21 días de la operación, siendo este intervalo el de mayor pérdida metacromática. En intervalos posteriores se va recuperando la tinción metacromática para llegar a tomar un aspecto completamente normal entre las seis y ocho semanas de la operación.

IV

Las lesiones histológicas concomitantes con la alteración metacromática consisten en la aparición de zonas de fisuración y resquebrajamiento de la sustancia intercelular, especialmente pericelular, para posteriormente ocupar todo el estrato del cartilago, pero afectando con mayor selectividad las capas intermedia y profunda del mismo. Estas imágenes recuerdan a las observadas en el cartilago degenerativo, pero en nuestro trabajo sin lesión condrocítica. Estas lesiones tienen un carácter estricto de reversibilidad.

V

El estudio histológico evolutivo de la regeneración sinovial muestra a los 7 días de la sinovectomía una vellosidad sinovial con una firme población celular, más evidente en las capas superficiales y siendo de aspecto fibroblástico. Dicha celularidad va incrementándose hasta la tercera semana, en que es máxima. Las células, alargadas inicialmente, van tornándose más concéntricas al igual que sus núcleos y su citoplasma difuso se hace muy manifiesto. La presencia de pequeños vasos permeables muestra la capacidad y el carácter regenerativo de dicha estructura. La celularidad se va perdiendo a partir de la tercera semana para encontrar espacios lacunares ocupados por material fibroso. A los 56 días de la sinovectomía, la estructura histológica de la nueva membrana sinovial es de semejantes características a la tomada como testigo.

VI

La incorporación de radiosulfato en la rodilla testigo nos muestra la gran afinidad del cartilago articular por el isótopo, especialmente en su estrato profundo. La zona fijadora del S^{35} queda limitada al estrato

intermedio y profundo, esto es, la delimitada por su estrato superficial y profundo.

VII

Cualitativamente y siguiendo la técnica autorradiográfica, la administración del radioisótopo en la rodilla operada tiene unas características muy concretas y dependientes del intervalo postoperatorio. A los 7 días de la sinovectomía, el isótopo se capta igualmente que en el testigo, pero en menor cantidad, especialmente en su estrato intermedio. A los 14 días, la incorporación se incrementa intensamente ocupando todos los estratos del cartílago articular de una forma mucho más intensa que en el testigo, excepto en su estrato superficial. Esta fijación del S^{35} se hace máxima a las tres semanas de la intervención para volver a obtener unos valores débilmente superiores a los normales a las cuatro semanas de la misma. No se encuentran diferencias apreciables a partir de los 35 días de la sinovectomía.

VIII

A los 21 días de la sinovectomía, el gran incremento del S^{35} en el cartílago articular se traduce como un aumento relativo de los mucopolisacáridos neutros (queratosulfatos) con respecto a los mucopolisacáridos ácidos. Por el contrario y en el mismo estadio de tres semanas que el anterior, la pérdida de la tinción metacromática de la sustancia fundamental se explicaría por la disminución de los mucopolisacáridos ácidos (condroitinsulfatos) debido a la despolimerización de los mismos, por degradación enzimática de la matriz.

IX

El estudio cuantitativo, realizado por autorradiografía y densitometría, nos permite confirmar los valores cualitativos de

nuestra tercera serie. En efecto, hemos podido comprobar como a los 7 días de la sinovectomía se aprecia en la rodilla operada una disminución de la incorporación del S^{35} con respecto a la rodilla testigo, en una proporción del 6 por 100. Por el contrario, en la segunda semana se incrementa en un 26'3 por 100 con respecto al testigo y se supera a los 21 días de la intervención con unos valores del 40'7 por 100. A partir de la cuarta semana no se aprecian diferencias significativas entre las rodillas operada y testigo.

X

En el cartílago fisario, tanto de la rodilla operada como de la testigo, no se han presentado modificaciones ni estructurales ni funcionales, mostrando en ambos casos una intensa afinidad por el radioisótopo, muy superior a la encontrada en el cartílago articular normal.

XI

La microscopía electrónica no revela signos degenerativos ni estructurales del condrocito con la sinovectomía si bien aparecen unos signos evidentes de alteración biodinámica del radiosulfato.

XII

Con el estudio ultramicroscópico, no sólo se confirman los resultados obtenidos en las series precedentes sino que se resalta una vez más que la sinovectomía no altera la estructura morfológica del condrocito pero sí la actividad metabólica del mismo. Esto se manifiesta por una menor radioincorporación a los 7 días de la sinovectomía, por una mayor fijación e incorporación del radioisótopo a los 14 y 21 días de la operación para normalizarse y significarse a las cuatro semanas con el condrocito correspondiente de la pieza testigo.

XIII

La fijación, sintetización y transporte del S^{35} se realiza a través del complejo de Golgi, siendo ésta la organela encargada de incorporarse y sintetizar el producto, encontrándose éste a los diez minutos en dicha estructura.

XIV

A las dos horas de la incorporación del isótopo se comprueba con técnica autorradiográfica su localización en la sustancia fundamental y en el condrocito en menor cantidad. Sin embargo, a través del microscopio electrónico se comprueba que la incorporación del S^{35} se efectúa ya a los diez minutos de su administración intracelularmente. A partir del complejo de Golgi se drenan las glicoproteínas sulfatadas al espacio extracelular.

XV

Las observaciones encontradas a lo largo de toda la experimentación nos muestran la gran importancia de la membrana sinovial para la nutrición de las capas más superficiales del cartilago articular ya que va a ser en estas capas donde se van a producir las alteraciones más importantes.

XVI

La interpretación ya no experimental sino clínica de la sinovectomía, es una realidad totalmente admitida ya que esta intervención realizada en humanos conlleva a una nueva membrana sinovial de características semejantes a la normal.

Su amplia aplicación en procesos inflamatorios, específicos o inespecíficos, así como su indicación en el campo de la reumatología avalan estos hechos, ya descritos en 1900 por MIGNON, que introduce la sinovectomía para el tratamiento de los pro-

cesos articulares, técnica operatoria que se realiza desde entonces con excelentes resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- ALÍ, S. Y., y EVANS, L. (1969): Studies on cathepsins in elastic cartilage. *Biochemical Journal*, 112, 427.
- BARCA, T., y ANDERSON, P. J. (1967): *Histoquímica*. Ed. Atika. S. A. Madrid.
- BARLAND, P.; NOVIKOFF, A. B., y HAMERMAN, D. (1964): Lysosomes in the synovial fluid in rheumatoid arthritis. A mechanism for cartilage erosion. *Assn. Am. Physicians*, 97, 239.
- BENDIT, E. P., y FRENCH, J. E. (1952): Reduction in metachromasia of cartilage as an indicator of chondroitinase activity. *Journal of the National Cancer Institute*, 13, 234.
- BESSIS, M. (1964): In electron microscopic anatomy. Edited by S. M. Kurtz. New York. Academic Press.
- BOLLET, A. J.; HANDY, J. R., y STURGILL, B. C. (1963): Chondroitin sulfate concentration and protein-polysaccharide composition of articular cartilage in osteoarthritis. *J. Clin. Invest.*, 42, 853.
- COELHO, R. R., y CHRISMAN, O. D. (1960): Sulfate metabolism and cartilage. II S^{35} sulfate uptake and total sulfate in cartilage slices. *J. Bone Joint Surg.*, 42-A, 165.
- COLLINS, D. H., y MCELLIGOTT, T. F. (1960): Sulfate ($^{35}SO_4$) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 19, 318.
- CURTIS, P. H., y KLEIN, L. (1965): Destruction of articular cartilage in septic arthritis. II: In vitro studies. *J. Bone Joint Surg.*, 47-A, 1595.
- EDELHOCH, H. (1958): The metachromasia of sodium gammapoli-glutamate and pepsin. *Exp. Cell Res.*, 15, 412.
- FESSEL, J. M., y CHRISMAN, D. D. (1964): Enzymatic degradation of chondromucoprotein by cell free extracts of human cartilage. *Arthritis Rheum.*, 7, 1964.
- FORTEZA BOVER, G.; HERNÁNDEZ YAGO, J., y MARTÍNEZ RAMÓN, A. (1973): Citología molecular de la biosíntesis del colágeno. Editorial FACTA. Valencia.
- GALWAY, R. D., y CRUESS, R. L. (1972): Enzyme activity in articular cartilage after sinovectomy of the knee in the rabbit. *J. Bone Joint Surg.*, 54-B, 360.
- GREENS, S. (1969): Synovectomy and débridement of the knee in rheumatoid arthritis. Part. I. Historical review. *J. Bone Joint Surg.*, 51-A, 617.
- GOMAR, F. (1973): Patología Quirúrgica Osteoarticular. Editorial Saber. Valencia.

- KELLY, J. W. (1956a) : An evaluation of the metachromasy of anionic dyes. II. Visual spectral observations on solutions. *Stain Technol.*, 31, 283.
- KELLY, J. W. (1956b) : An evaluation of the metachromasy of anionic dyes. I. Visual observations on tissue sections. *Stain Technol.*, 31, 275.
- KELLY, J. W. (1956c) : The metachromatic reaction, in Heilbrunn and Weber : *Protoplasmatología*. II. D2. 1-98. Springer Verlag. Wien.
- KELLY, J. W. (1958) : The use of metachromasy in histology, cytology and histochemistry. *Acta Histochemica*, suppl. 1, 85.
- KEY, J. A. (1925) : The reformation of synovial membrane in the knee of rabbits after synovectomy. *J. Bone J. Surg.*, 7, 793.
- KRAMER, H., y WINDRUM, G. M. (1955) : The metachromatic staining reaction. *J. Histochem. Cytochem.*, 3, 227.
- LAXTON, L. L. (1951) : Effect of cortisone upon chondroitin sulphate synthesis by animal tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (N. Y.), 76, 596.
- LISON, L. (1935) : Etudes sur metachromasie colorants methachromatique et sustancias chromotropes. *Arch. Biol.*, 46, 599.
- LUCY, J. A.; DINGLE, J. T., y FELL, H. B. (1961) : Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 2 : A possible role of intracellular protease in the degradation of cartilage matrix. *Biochem. J.*, 79, 500.
- LUSCOMBE, M. (1963) : Acid phosphatase and catheptic activity in rheumatoid synovial tissue. *Nature*, 197, 1010.
- MANKIN, H. J., y LIPPIELLO, L. (1969) : The turnover of the matrix of articular cartilage. *Jour. Bone Joint Surg.*, 51-A, 1591.
- MEACHIM, G. (1963) : The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit. *J. Bone Joint Surg.*, 45-B, 150.
- MICHAELIS, L. (1947) : The nature of the interaction of nucleic acids and nuclei with basic dyestuffs. *Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 12, 131.
- MICHAELIS, L., y GRANICK, S. (1947) : Metachromasy of basic dyestuffs. *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 3146.
- MIGNON, M. A. (1964) : The classic : Synovectomy of the knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 36, 7.
- MITCHELL, N. S., y CRUESS, R. L. (1967a) : Synovial regeneration after synovectomy. *Canad. Jour. of Surg.*, 10, 234.
- MITCHELL, N. S., y CRUESS, R. L. (1967b) : The effect of synovectomy on articular cartilage. *J. Bone Joint Surg.*, 49-A, 1099.
- MITCHELL, N. S. (1969) : Electron microscopy of degenerating synovium. *J. Bone Joint Surg.*, 51-B, 192.
- MITCHELL, N. S., y BLACKWELL, P. (1968) : The electron microscopy of regenerating synovium after subtotal synovectomy in rabbits. *J. Bone Joint Surg.*, 50-A, 675.
- MURPHY, J. B. (1916) : Hypertrophic villous synovitis of knee-joint-synovial capsulectomy. *Clinics of John B. Murphy, at Mercy Hospital*, 5, 155.
- PEARSE, E. (1960) : *Histoquímica teórica y aplicada*. Editorial Aguilar. Madrid.
- REDLER, I., y ZIMNY, M. L. (1970) : Scanning electron microscopy of normal and abnormal articular cartilage and synovium. *J. Bone Joint Surg.*, 52-A, 1395.
- REPO, R. U., y MITCHELL, N. (1970) : Tritiated proline incorporation in normal and injured adult cartilage of the rabbit. *J. Bone Joint Surg.*, 52-A, 607.
- ROY, S., y GHADIALLY, F. N. (1967) : Ultrastructure of normal rat synovial membrane. *Ann. Rheum. Dis.*, 26, 26.
- SCHUBERT, M., y HAMERMAN, D. (1956) : Metachromasia : Chemical theory and histochemical vue. *J. Histochem. Cytochem.*, 4, 159.
- SCHUBERT, M., y HAMERMAN, D. (1968) : A primer on connective tissue biochemistry. Lea & Febiger. Philadelphia.
- SPICER, S. S., y BRYANT, J. H. (1958) : Systemic effects in rabbits receiving injection of papain and chondroitin sulfate. *Amer. J. Pathology*, 34, 61.
- STOCKINGER, L. (1958) : Fluorescenzmetachromasie. *Acta Histochemica*, suppl. I, 103.
- SWETT, P. P. (1923) : Synovectomy in chronic infectious arthritis. *J. Bone Joint. Surg.*, 5, 110.
- SWETT, P. P. (1938) : A review of synovectomy. *J. Bone Joint Surg.*, 20, 68.
- SYLVEN, B. (1950) : The qualitative distribution of metachromatic polysaccharide material during hair growth. *Exp. Cell Res.*, 1, 582.
- SYLVEN, B. (1954) : Metachromatic dye-substrate interactions. *Quart. J. Michr. Sci.*, 95, 327.
- SYLVEN, B. (1958) : On the interaction between metachromatic dyes and various substrates of biological interest. *Acta Histochemica*, suppl., 1, 79.
- SZIRMAI, J. A., y BALAZS, E. A. (1958) : Metachromasia and the quantitative determination of dyebinding. *Acta Histochemica*, suppl., 1, 56.
- THORP, F. K., y DORFMAN, A. (1963) : Citados por GODMAN y LANE en su artículo : On the site of sulfation in the chondrocyte. *J. Cell Biology*, 21, 353 (1964).
- WALTON, K. W., y RICKETTS, C. R. (1954) : Investigation of the histochemical basis of metachromasia. *Brit. J. Exp. Pathology*, 35, 227.
- WEISSMAN, N.; CARNES, W. H.; RUBIN, P. S., y FRISCHER, J. (1952) : Metachromasy of toluidine blue induced by nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 1423.
- WHITEHOUSE, M. W., y BOSTROM, H. (1962) :

- The effect of some antiinflammatory drugs on the metabolism of connective tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 11, 1175.
- WIAME, J. M. (1946) : Basophilie et metabolisme du phosphore chez la levure. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 28, 552.
- WISLOCKI, G. B.; BUNTING, H., y DEMPSEY, E. W. (1947) : Metachromasia in mammalian tissues and its relations hip to mucopolysaccharides. *Am. J. Anat.*, 81, 1.
- WOESSNER, J. F. (1967) : Acid cathepsins of cartilage. In cartilage degradation and repair, p. 99. Edited by C. Andrew L. Bassett. Washington : National Academy of Science - National Research Council, publications.
- WOLCOTT, W. E. (1927) : Regeneration of the synovial membrane following typical synovectomy. *J. Bone Joint Surg.*, 9, 67.
- ZIFF, M.; GRIBETZ, H. J., y LOSPALUTO, J. (1960) : Effect of leukocyte and synovial membrane extracts on cartilage mucoprotein. *J. Clin. Invest.*, 39, 405.