

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

**CAMBIOS MENISCALES EN LA PROTEÍNA
OLIGOMÉRICA DE LA MATRIZ DEL CARTÍLAGO
CON LA ARTROSIS**

TESIS DOCTORAL

MARIANO LÓPEZ FRANCO

Madrid, 2008

Don Enrique Gómez Barrena, Catedrático y Profesor titular de Cirugía Ortopédica y Traumatología,
Departamento de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA

Que Don Mariano López Franco, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado en la Unidad de Aparato Locomotor de la Fundación Jiménez Díaz, bajo mi dirección, la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmo la presente en Madrid, a 17 de Diciembre de 2007.

Dr. Pr. Enrique Gómez Barrena

Doctorando: Mariano López Franco

“Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.”

Julius Robert Oppenheimer (físico)

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante.”

Miguel de Unamuno (filósofo y escritor)

“Lo imposible es el fantasma de los tímidos y el refugio de los cobardes”

Napoleón Bonaparte (militar y Emperador)

A Arantxa y Miguel

Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones científicas:

1. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is modified by intra-articular liposomal clodronate in an experimental model of arthritis. Gomez-Barrena E, Lindroos L, Ceponis A, **Lopez-Franco M**, Sanchez-Pernaute O, Monkkonen J, Salo J, Herrero-Beaumont G, Konttinen. Clin Exp Rheumatol. 2006 Nov-Dec; 24 (6):622-8.
2. Cambios meniscales de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP) en un modelo experimental de artrosis en conejos. **M López Franco**, O López Franco, A Murciano Antón, M Cañamero, G Herrero-Beaumont, O Sánchez Pernaute, E Gómez Barrena. VI Congreso Nacional INVESCOT (Madrid, 23 de marzo de 2007). (CO-2)
3. Cambios de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP) en meniscos artrósicos. **M López Franco**, O López Franco, A Murciano Antón, G Herrero-Beaumont, O Sánchez Pernaute, M Cañamero, E Gómez Barrena. XXVI Congreso Nacional SEROD (Barcelona, 16-18 de Abril de 2007). (CO-15)
4. Meniscos: no solo colágeno. **M López Franco**, O López Franco, A Murciano Antón, G Herrero-Beaumont, O Sánchez Pernaute, M Cañamero, E Gómez Barrena. XXV Congreso de la Asociación Española de Artroscopia (16-18 de Mayo de 2007, Sevilla) (CO-36)
5. Cambios meniscales en la artrosis. **M López Franco**, O López Franco, M Cañamero, E Gómez Barrena. 44 Congreso Nacional de la SECOT (26-28 de septiembre de 2007, Madrid). (CO-52)
6. The role of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in meniscus: changes in osteoarthritis development. **M López Franco**, O López Franco, A Murciano Antón, E Gómez Barrena, O Sánchez Pernaute, M Cañamero, G Herrero-Beaumont. 9th Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (29 May – 1 June, 2008. Nice, France). Aceptado como cartel científico. (P-1381)
7. The role of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in osteoarthritic meniscus. **M López Franco**, O López Franco, A Murciano Antón, E Gómez Barrena, O Sánchez Pernaute, M Cañamero, G Herrero-Beaumont. 9th Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (29 May – 1 June, 2008. Nice, France). Aceptado como comunicación oral. (FP-273)
8. Estudio de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago en meniscos humanos artrósicos. **Mariano López-Franco**, Oscar López-Franco, María Aránzazu Murciano Antón, Marta Cañamero-Vaquero, María Jesús Fernández-Aceñero, Gabriel Herrero-Beaumont, Olga Sánchez Pernaute, Enrique Gómez-Barrena. VII Congreso Nacional INVESCOT (Madrid, 24 de abril de 2008). (Enviado como comunicación oral. Pendiente de aceptación)
9. COMP, meniscus and osteoarthritis. **Mariano López-Franco**, Oscar López-Franco, María Aránzazu Murciano Antón, Marta Cañamero-Vaquero, María Jesús Fernández-Aceñero, Gabriel Herrero-Beaumont, Olga Sánchez Pernaute, Enrique Gómez-Barrena.. 17th EORS annual meeting. (April 24-26, 2008 Madrid, Spain). (Enviado como comunicación oral. Pendiente de aceptación)

AGRADECIMIENTOS

¿Quién no me ha ayudado? Debería empezar por preguntarme qué persona de las muchísimas que se han cruzado en mi vida en estos últimos meses no ha contribuido de alguna manera en la culminación de ésta tesis. En realidad, son tantas y tantas las personas que de alguna manera han hecho posible que este trabajo se plasme en unas páginas que, en tan sólo unos párrafos, es seguro que dejaré a muchas de ellas en el olvido. Perdón de ante mano a todos, los olvidados y los nombrados. A los primeros por no citarles en estos agradecimientos, a los últimos por no haber sabido plasmar en estas líneas lo mucho que han contribuido para la finalización de este trabajo.

En primer lugar, mi agradecimiento a todos los pacientes que consintieron que sus meniscos fuesen estudiados para el desarrollo de este trabajo, sin cuya desinteresada colaboración no se podría haber realizado esta investigación.

Al Dr. Enrique Gómez Barrena por haberme orientado en el arduo mundo de la investigación básica, animándome en todo momento e inculcándome que sin el conocimiento del porqué ocurren las cosas es muy difícil dar una respuesta adecuada a nuestros pacientes, convirtiendo al cirujano en un mero técnico que “arregla” cosas en el cuerpo humano sin saber en realidad como está solucionando el problema o, en ocasiones, si ha sido capaz de curar la enfermedad. Gracias también por haber hecho posible que haya podido disponer de todos los materiales necesarios para realizar este trabajo, por haberme orientado en el desarrollo del mismo, solucionándome tantas y tantas dudas que han surgido a la hora de continuar con este estudio, por su ayuda para la interpretación de los resultados y en la redacción del texto que constituye esta tesis. Gracias.

Al Dr. Herrero-Beaumont y a la Dra. Sánchez Pernaúte, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el laboratorio de patología articular de la Fundación Jiménez Díaz, por abrirme las puertas a esta línea de investigación, por su amistad y por haberme facilitado el anticuerpo frente a COMP, piedra angular de esta tesis.

A mi hermano Oscar, el primer Dr. López Franco, por el diseño de la ribosonda, por haberme enseñado las técnicas de laboratorio, por su capacidad de trabajo y desinteresada ayuda, y sobre todo por su amistad.

A la Dra. Marta Cañamero, quien no sólo me ha enseñado a mirar a través de un microscopio y me ha ayudado con la mayoría de las tinciones, sino por haber confiado en todo momento en que este trabajo vería la luz, ha guiado mis pasos en momentos de dudas y ha contado tantas y tantas células como yo.

A la Dra. Fernández Aceñero quien fue capaz de hacerme entender la estadística, tantas y tantas veces estudiada y nunca realmente entendida hasta ahora, por su ayuda en la interpretación de resultados y porque sin ella no podría haber realizado la tinción para el estudio de la proliferación en conejos.

A Valle, Virginia, Elvira, Patricia, María, Ana y Gloria por vuestra impagable ayuda en las tinciones de los meniscos. A Pilar, por haberme ayudado a operar y a sacrificar a los conejos.

A Puri, Carmen y Lupe por vuestras ideas y ayuda para realizar las técnicas de tinción. No sólo me habéis ayudado cuando me he bloqueado en el laboratorio, sino que también me habéis explicado muchísimas cosas de importancia para saber cómo funcionaban en realidad las técnicas que estaba realizando.

A mis compañeros de trabajo y en especial a los Residentes de Móstoles, quienes han hecho posible que en algún rato de alguna guardia haya podido escribir parte de esta tesis.

A mis padres, hermanos y amigos, sin vosotros no sería quien soy y seguramente no habría tenido las fuerzas ni la confianza en mí mismo para creer que con esfuerzo todo es posible.

En último lugar, pero el primero en importancia, a Miguel y Arantxa. Perdón por mis ausencias, por no haberos dedicado toda mi atención en tantas ocasiones, por haberme escapado a trabajar en esta tesis y por haberme perdido vuestra compañía tantas veces. Gracias por tu paciencia Arantxa, por tu apoyo incondicional, por tu aliento en los momentos de fatiga, por creer en mí y sobre todo por tu amor.

ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En algunos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

• APES	Aminopropil-trietroxi-silano
• BSA	Albúmina de suero bovino
• CGA	Campo de Gran Aumento
• COMP	Proteína Oligomérica de la Matriz del Cartílago
• Da	Dalton
• DAB	Diaminobencidina
• DE	Desviación estándar
• DNA	Ácido dexosirribonucleico
• DNAc	Ácido dexosirribonucleico complementario
• EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
• EGF	Factor de crecimiento epidérmico
• GH	Hormona de crecimiento
• IPTG	Isopropil beta tiogalactopiranosida
• LCA	Ligamento Cruzado Anterior
• mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
• nRNA	Ácido ribonucleico nuclear
• NTP	Nucleótido trifosfato
• pb	Pares de bases
• PBS	Tampón salino fosfato
• PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
• PTR	Prótesis total de rodilla
• PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
• RMN	Resonancia Magnética Nuclear
• RNA	Ácido ribonucleico
• RT-PCR	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa
• SSC	Citrato salino estándar
• TdT	Deoxinucleotido transferasa terminal
• TE	Tris EDTA
• TGF- β	Factor transformador del crecimiento β
• TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
• tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
• TSP	Trombospondina
• TUNEL	<i>Terminal transferase-mediated dUTP nick end-labeling</i>

I. INTRODUCCIÓN	1
1. LA RODILLA	1
1.1. Desarrollo de la rodilla	1
1.2. El cartílago	2
1.2.1. El condrocito	3
1.2.2. La matriz extracelular	5
1.2.3. Colágeno	6
1.2.4. Proteoglicanos	7
1.2.5. Glicoproteínas y proteínas no colágenas	9
1.2.6. Estructura del cartílago articular	10
1.3. Fibrocartilago: los meniscos	12
1.3.1. Aspecto macroscópico y regiones anatómicas	12
1.3.2. Población celular	14
1.3.3. Composición ultraestructural	14
1.3.4. Funciones del menisco	16
1.4. La membrana sinovial	18
2. GONARTROSIS	19
2.1. Concepto. Definición de artrosis	19
2.2. Criterios diagnósticos	20
2.3. Epidemiología	21
2.4. Factores de riesgo	21
2.4.1. Factores demográficos	21
2.4.2. Factores genéticos	22
2.4.3. Factores hormonales	22
2.4.4. Obesidad	22
2.4.5. Deficiencias nutricionales	23
2.4.6. Mecánica articular	23
2.4.7. Actividad física y laboral	24
2.5. Etiopatogenia	24
2.6. Fisiopatología	25
2.7. Modelos animales de artrosis	26
2.7.1. Modelos de artrosis espontánea	26
2.7.2. Modelos de artrosis inducida	26
2.8. Los meniscos en la artrosis de rodilla	27
3. PROTEÍNA OLIGOMÉRICA DE LA MATRIZ DEL CARTÍLAGO (COMP)	29
3.1. Identificación y descripción de la molécula	29
3.2. Funciones que desempeña	31

3.3. Empleo como marcador de enfermedad	31
3.4. Displasias esqueléticas y pseudocondroplasia: mutaciones en la COMP	32
II. HIPÓTESIS	34
III. OBJETIVOS	35
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. GRUPO DE PACIENTES CON GONARTROSIS AVANZADA	37
1.1. Selección de los enfermos	37
1.2. Criterios de inclusión	37
1.3. Criterios de exclusión	37
1.4. Población a estudio	37
1.5. Obtención de las muestras	37
2. GRUPO DE PACIENTES SIN GONARTROSIS	38
2.1. Selección de los enfermos	38
2.2. Población a estudio	38
2.3. Obtención de las muestras	39
3. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL MODELO ANIMAL DE GONARTROSIS	39
3.1 Modelo de artrosis en conejos por inestabilidad	39
3.2 Sacrificio de los conejos y procesamiento de los meniscos	41
4. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS	42
4.1 Análisis morfológico	42
4.2. Purificación de la COMP y obtención de anticuerpos	43
4.3. Inmunohistoquímica	44
4.3.1. Inmunohistoquímica para detección de COMP	44
4.3.2. Inmunohistoquímica para detección de Ki67	45
4.3.3. Detección de apoptosis (TUNEL).....	46
4.4. Valoración y cuantificación	46
5. ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	49
5.1. Hibridación “in situ”	49
5.1.1. Extracción de RNA	49
5.1.2. Diseño de los cebadores y ensayo de RT-PCR (transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa)	50
5.1.3. Generación de la ribsonda	51
5.1.4. Hibridación	52
5.1.5. Detección	52

	5.2. Valoración y cuantificación	53
	6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
IV.	RESULTADOS	55
	1. ESTUDIOS DE MENISCOS HUMANOS	55
	1.1. Población celular y análisis histológico	55
	1.2. Proliferación celular y apoptosis	57
	1.3. Distribución de los proteoglicanos	58
	1.4. Inmunohistoquímica frente a COMP	59
	1.5. Hibridación in situ	60
	1.6. Correlaciones entre los resultados de humanos	60
	2. ESTUDIOS EN EL MODELO DE ARTROSIS EN CONEJOS	61
	2.1. Efectividad de las cirugías	61
	2.2. Valoración macroscópica de cartílagos y meniscos	61
	2.3. Población celular	63
	2.4. Proliferación celular	66
	2.5. Apoptosis	68
	2.6. Distribución de los proteoglicanos	69
	2.7. Inmunohistoquímica frente a COMP	70
	2.8. Correlaciones entre los resultados de conejos	72
	3. COMPARACIÓN ENTRE CONEJOS Y HUMANOS	72
	3.1. Población celular	73
	3.2. Proliferación celular	73
	3.3. Apoptosis	73
	3.4. Distribución de los proteoglicanos	74
	3.5. Inmunohistoquímica frente a COMP	74
V.	DISCUSIÓN	76
	1. POBLACIÓN CELULAR EN LOS MENISCOS	76
	2. CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y MUERTE CELULAR PROGRAMADA	79
	3. DISTRIBUCIÓN DE LOS PROTEOGLICANOS EN LA MATRIZ	81
	4. DISTRIBUCIÓN DE COMP EN LOS MENISCOS	83
	5. PAPEL DE LOS MENISCOS EN LA ARTROSIS	85
	6. COMPARACIÓN ENTRE MENISCOS HUMANOS Y DE CONEJOS	88
VI.	CONCLUSIONES	91
VII.	BIBLIOGRAFÍA	93

1. LA RODILLA

La rodilla es una de las articulaciones más complicadas del cuerpo humano. Debe combinar a la perfección la función de proporcionar movilidad y garantizar la estabilidad, tanto en situaciones de carga como en descarga. Estas funciones las lleva a cabo gracias a las estructuras que la componen, tanto las intraarticulares (meniscos, ligamentos cruzados anterior y posterior) como las extraarticulares o periarticulares (ligamentos laterales medial y lateral, ligamento poplíteo).

Para caminar necesitamos que la extremidad que se dirige hacia delante se acorte para no tropezar con el suelo, la flexión de la rodilla contribuye a que esto sea posible. Para realizar este movimiento de flexión bastaría con que la rodilla fuese una articulación tipo tróclea cuyo eje de rotación fuese transversal. Sin embargo, con la extensión de la tibia se produce un movimiento obligado de rotación en el eje vertical, resultado de la geometría articular y de factores intrínsecos de las partes blandas (Daniel y Biden, 1987). Este movimiento de rotación no lo podría realizar una tróclea. Por eso, la articulación de la rodilla podría ser comparada con un cilindro capaz de rodar alrededor de un eje transversal y que está sobre un pedestal que puede girar en torno a un eje vertical. Es decir, la articulación de la rodilla es la combinación de un cóndilo más un trocoide superpuestos; en el primero se realizan los movimientos de flexo-extensión y en el segundo los de rotación (Orts Llorca, 1986).

1.1. Desarrollo de la rodilla

La articulación de la rodilla es una articulación con cavidad sinovial o diartrodia que se forma a partir del blastema que forma parte de los esbozos de las extremidades. Estos esbozos ya se pueden observar en torno a los días 26 a 28 del desarrollo embrionario, y alrededor de la sexta semana comienza la segmentación del primordio cartilaginosa en las zonas donde se van a formar las futuras articulaciones (Moore, 1977). De esta manera se puede observar una zona intermedia o mesénquima “interzonal” en el lugar donde se desarrollará la futura articulación de la rodilla que podremos observar como un área muy celular, avascular y homogénea, que tiñe positivamente frente a los polisacáridos y que se puede dividir en tres capas (Anderson y Bro-Rasmussen, 1961). La capa interzonal central se diferencia en la periferia de la articulación primitiva para formar el primordio del mesénquima sinovial. Este tejido pluripotente da lugar al revestimiento sinovial, la cápsula, los ligamentos y los meniscos articulares, mientras que la porción más central de la interzona sufre un proceso conocido como cavitación, que acaba formando la cavidad sinovial propiamente dicha (Lo *et al.*, 2005).

La cavitación sucede en torno a las 10 semanas del desarrollo y aunque no se conocen los mecanismos exactos responsables de la misma, se ha propuesto que la matriz queda destruida por la acción de enzimas liberadas en esta región desde las células interzonales (Sledge y Zaleske, 1988).

Múltiples cavidades interzonales se fusionan para construir una única cavidad sinovial de gran tamaño, que separa físicamente el primordio cartilaginoso adyacente. A medida que avanza la fase de cavitación, el progreso en la diferenciación del mesénquima periférico origina la propia cápsula articular. La invasión vascular implica la llegada al tejido de otros tipos celulares, como pueden ser macrófagos o monocitos, algunos de los cuales podrían diferenciarse y participar en el ulterior desarrollo de las estructuras articulares (Sledge y Zaleske, 1988).

Los meniscos se diferencian directamente del blastema unido a la cápsula e inmediatamente adquieren su típica forma semilunar. Las células del menisco lateral se orientan un poco antes que las del medial. En la 9ª a 10ª semana de gestación los meniscos se hayan separados de las superficies articulares y están compuestos de masas de fibroblastos jóvenes, presentando uniones a la cápsula y a los ligamentos cruzados (Hosea, 2001). Al final del período embrionario la rodilla claramente se parece a la del adulto (Sledge, 1966). En estos momentos, los meniscos están bien definidos, son muy celulares con pocas fibras de colágeno y sin evidencia de fibrocartílagos. Hasta el final de la gestación ya no se producirán nuevas estructuras, sino la maduración de todos estos elementos esqueléticos.

1.2. El cartílago

Los tejidos de las diartrodias están compuestos por células y por una matriz extracelular. La composición y distribución de estos componentes así como la interacción de los mismos, proporcionará las características a cada tejido y explicará la fisiología y el funcionamiento de cada tejido conjuntivo organizado.

El cartílago es una forma especializada de tejido conectivo que se puede encontrar en múltiples localizaciones en el cuerpo humano. Es un tejido avascular, aneural y alinfático. Podemos distinguir entre tres tipos de cartílago si nos fijamos en la cantidad de matriz extracelular y la proporción de colágeno y fibras elásticas (Munuera, 1996):

- **Fibrocartílago:** se caracteriza por predominio de colágeno fibrilar. Está presente en áreas donde el cartílago debe resistir fuerzas de tensión. Lo podemos encontrar en meniscos, sínfisis púbica, anillo fibroso del disco intervertebral, rodetes acetabular y glenoideo en el tejido de reparación de las lesiones de la superficie articular.
- **Cartílago elástico:** contiene gran cantidad de fibras elásticas lo que le confiere la característica de poder deformarse y recuperar la forma. Podemos localizarlo en el pabellón auricular y en la epiglotis.
- **Cartílago hialino:** es el tipo de cartílago más abundante. Es translúcido y de color blanco-azulado. En él predomina la matriz hidrófila. Se encuentra en las placas de crecimiento de los huesos, en el esqueleto fetal, en la parte anterior de las costillas y en las superficies articulares diartrodiales.

Este cartílago hialino que recubre las superficies articulares será descrito en detalle a continuación.

A pesar de tener un grosor de pocos milímetros en la mayoría de las ocasiones, posee una sorprendente resistencia a la compresión y una excepcional capacidad para distribuir cargas (Mow *et al.*, 1988 y Mow *et al.*, 1995), minimizando por tanto la presión que debería soportar el hueso subcondral.

1.2.1. El condrocito

En el cartílago articular las células contribuyen poco al volumen del tejido, alrededor del 1% en el cartílago articular humano adulto (Buckwalter y Mankin, 1997^a). Las células del cartílago se denominan condrocitos, son de origen mesenquimal y se encuentran aisladas por una sustancia fundamental de forma individual o formando pequeños grupos isogénicos (Munuera, 1996).

El condrocito es un tipo celular altamente diferenciado y es la única célula que se encuentra en el cartílago normal adulto (Buckwalter *et al.*, 1990). Los condrocitos de las distintas zonas del cartílago difieren en tamaño, forma y probablemente en actividad metabólica (Aydelotte *et al.*, 1996; Aydelotte *et al.*, 1992). Todas estas células contienen las organelas necesarias para la síntesis de matriz como son un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico bien desarrollado que le permite llevar a cabo su función de síntesis proteica y la sulfatación de glicosaminoglicanos (Munuera, 1996).

Los condrocitos se rodean de su matriz extracelular y no presentan contacto célula a célula. El condrocito maduro se diferencia de otros tipos celulares por ser una célula de forma esférica; que sintetiza colágeno tipo II, largas cadenas de proteoglicanos y proteínas no colágenas específicas; y por la formación de estas moléculas dentro de una matriz cartilaginosa (Buckwalter y Mankin, 1997^a). La síntesis de colágeno de tipo II y de agregano por los condrocitos se considera un marcador del fenotipo celular específico del cartílago (Little y Ghosh, 1997; Bonaventure *et al.*, 1994; Häuselmann *et al.*, 1994). Un cambio en la síntesis de colágeno tipo II a I y III se considera un signo definitivo de desdiferenciación del condrocito (Little y Ghosh, 1997; von de Mark *et al.*, 1992). Así mismo, una disminución en la síntesis de agregano y un aumento de la síntesis de proteoglicanos condroitín/dermatán sulfato de bajo peso molecular, se ha demostrado que es un signo de desdiferenciación de los condrocitos cultivados en monocapa durante largos períodos (Bonaventure *et al.*, 1994; Delbruck *et al.*, 1986) así como en la artrosis (Little y Ghosh, 1997; Cs-Szabó *et al.*, 1995, Karvonen *et al.*, 1992).

Para producir un tejido capaz de dotar de las características normales a una articulación sinovial, el condrocito debe sintetizar apropiados tipos y cantidades de macromoléculas y, después, ensamblarlas y organizarlas dentro de un armazón que ha de estar muy ordenado. La regulación que ejerce la matriz extracelular sobre los condrocitos para que éstos sintetizen o degraden moléculas es muy importante. La matriz transmite señales, tanto mecánicas como mediante influencias

piezoeléctricas que modifican la actividad celular (Munuera, 1996). De esta forma se consigue la renovación de las macromoléculas de la matriz y la adaptación del armazón del que forman parte en respuesta a las necesidades funcionales de la articulación. Por ejemplo, se sabe que las regiones del cartílago que soportan más peso contienen mayor cantidad de proteoglicanos (Slowman y Brandt, 1986).

En los animales adultos la nutrición del condrocito procede del líquido sinovial. Para que los nutrientes que se encuentran en el organismo alcancen al condrocito han de atravesar el tejido sinovial y el líquido sinovial en primer lugar y luego difundir por la matriz del cartílago hasta llegar a la célula. Esta última barrera es restrictiva no sólo con el tamaño de los materiales sino también con las cargas eléctricas y a la configuración espacial de dichos nutrientes (Fischer *et al.*, 1995). Esta doble barrera de difusión que han de atravesar las moléculas confiere al condrocito una concentración relativa de oxígeno menor al de las células de otros tejidos, por lo que dependen principalmente del metabolismo anaerobio.

El condroblasto presente en las epífisis y fisis en crecimiento tiene una gran capacidad proliferativa, lo que asegura el crecimiento gracias a su capacidad de síntesis de proteínas. Una vez que el condroblasto madura y se convierte en condrocito, éste cesa prácticamente su actividad mitótica. La capacidad de división celular por parte del condrocito podría reaparecer en situaciones patológicas, como la artrosis o los traumatismos, en forma de nidos celulares (Munuera, 1996). En los individuos en crecimiento los condrocitos producen tejido nuevo para aumentar y remodelar la superficie articular. En los esqueléticamente maduros no se producen cambios sustanciales en el volumen de tejido articular, pero los condrocitos maduros reemplazan las macromoléculas degradadas de la matriz extracelular y son capaces de remodelar la superficie articular (Buckwalter, 1995^a; Buckwalter y Lane, 1996).

Las enzimas producidas por los condrocitos son responsables de la degradación de las macromoléculas de la matriz y probablemente los condrocitos responden a la presencia de fragmentos de moléculas de la matriz incrementando su actividad sintética para reemplazar los componentes degradados (Buckwalter y Mankin, 1997^a). Deben existir otros mecanismos implicados en mantener el adecuado balance entre la actividad degradativa y de nueva formación de moléculas que mantenga el andamiaje que constituye el cartílago articular y en el que se encuentran los condrocitos. Como ejemplo podríamos citar que la frecuencia e intensidad de carga en la articulación influye en el metabolismo del condrocito. Estudios experimentales han demostrado que la inmovilización de la articulación o un descenso importante en las cargas que recibe alteran la actividad del condrocito, provocando que la degradación exceda a la síntesis, al menos en lo que a los proteoglicanos que componen la matriz se refiere (Buckwalter, 1995^a; Buckwalter, 1995^b). Por otro lado, incrementos importantes y mantenidos de la articulación podrían alterar la composición y organización de la matriz extracelular en individuos esqueléticamente maduros (Buckwalter, 1995^a; Buckwalter, 1995^b). En general, las cargas estáticas disminuyen la síntesis de matriz y las cargas dinámicas estimulan la

síntesis de proteoglicanos (Martin y Buckwalter, 1996^a). La capacidad de los condrocitos para sintetizar algunos tipos de proteoglicanos y su respuesta a estímulos, incluso a factores de crecimiento, disminuyen con el envejecimiento (Buckwalter y Roughley, 1987; Buckwalter *et al.*, 1993; Guerne *et al.*, 1995; Martin y Buckwalter, 1996^a; Martin y Buckwalter, 1996^b). Estos cambios relacionados con la edad pueden limitar la capacidad de los condrocitos para mantener las características normales del cartílago, y por tanto contribuir al desarrollo de la degeneración del cartílago articular (Martin y Buckwalter, 1996^a). No obstante, no se conoce en profundidad como se comportan los condrocitos con la artrosis en cuanto a su actividad metabólica o respecto a procesos de proliferación o muerte celular en los distintos estadios de la enfermedad.

1.2.2. La matriz extracelular

La matriz que rodea a los condrocitos en el cartílago articular, está formada por dos componentes: un armazón a modo de andamiaje constituido por una red de colágeno y otras macromoléculas estructurales; y un gel o sustancia fundamental constituido por agua principalmente (Buckwalter y Mankin, 1997^a).

El agua contribuye hasta en el 80% del peso húmedo total del cartílago y su interacción con las macromoléculas de la matriz tiene una gran importancia en las propiedades mecánicas del cartílago (Buckwalter *et al.*, 1990; Lai *et al.*, 1981; Linn y Sokoloff, 1965; Mankin, 1978; Maroudas y Schneiderman, 1987; Mow y Rosenwasser, 1988). Al menos una parte de ese agua puede moverse libremente dentro y fuera del cartílago, lo que permite en parte la capacidad de deformación del tejido. El volumen, concentración y comportamiento del agua dentro del cartílago depende de su interacción con las macromoléculas estructurales principalmente con las largas cadenas de proteoglicanos que ayudan a mantener el agua dentro de la matriz y las concentraciones adecuadas de electrolitos en la misma. Debido a que estas macromoléculas tienen un gran número de grupos sulfato y carboxilo cargados negativamente, atraen a iones con carga positiva y repelen los de carga negativa.

Las macromoléculas estructurales del cartílago (colágeno, proteoglicanos y proteínas no colágenas) contribuyen en un 20 a 40% al peso del cartílago (Buckwalter *et al.*, 1990). El 60% del peso seco del cartílago es colágeno, del 25 al 35% proteoglicanos y del 15 al 20% proteínas no colágenas. La malla fibrilar de colágeno da al cartílago su forma y su resistencia a la tensión (Buckwalter y Mow, 1992). Los proteoglicanos y las proteínas no colágenas se hallan unidos a la malla de colágeno o quedan atrapados dentro de la misma, en su interior el agua rellena este andamiaje molecular. Las proteínas no colágenas ayudan a organizar y a estabilizar la estructura de la matriz, y a unirse al condrocito a las macromoléculas que la forman (Buckwalter y Mankin, 1997^a).

Podemos dividir la matriz extracelular en tres compartimentos. El más próximo a la célula se denomina **compartimento pericelular**, es delgado y se caracteriza por ausencia de colágeno fibrilar unido en bandas y es rico en proteoglicanos. El siguiente compartimento se denomina **compartimento**

territorial, que rodea y encapsula al pericelular, y donde la matriz forma una malla de fibras a modo de cesta de colágeno fibrilar. La siguiente región de la matriz (más lejana al condrocito) se denomina **compartimento interterritorial**, constituye el mayor volumen de tejido y se caracteriza por fibras de colágeno paralelas entrecruzadas (Hunziker, 1992). El metabolismo en la zona pericelular es alto y parece ser mucho más lento en la zona interterritorial (Sandy, 1992; Mok *et al.*, 1994). De este modo, las considerables diferencias entre compartimentos reflejarían las diferencias en la función.

1.2.3. Colágeno

El colágeno es la proteína más ubicua y abundante del mundo animal, constituyendo en torno a un tercio del total de las proteínas corporales (Eyre, 1980). Los colágenos son un amplio grupo de proteínas relacionadas, que han sido altamente conservadas durante la evolución, y forman los elementos fibrosos encontrados en los espacios extracelulares de la mayoría de los tejidos conectivos.

La propiedad que caracteriza a todo tipo de colágeno es su estructura en triple hélice (Eyre, 1980). Tres cadenas polipeptídicas de colágeno separadas se unen para formar una “superhélice” que gira hacia la derecha. Su configuración es similar a una barra con un diámetro aproximado de 1,4 nm (Ramachandran, 1976). Las cadenas de colágeno están compuestas por aminoácidos (tres residuos por vuelta de la hélice y hasta unos 1050 por cada cadena) unidos para formar una cadena con una longitud de unos 300 nm (Eyre, 1980). Los colágenos contienen alrededor de un 35% de residuos glicina y un 11% de alanina, proporciones mucho más elevadas que en otros tejidos. Además, les caracteriza aun más su elevado contenido en prolina y en 4-hidroxiprolina, (aminoácido este último infrecuente en otras proteínas a excepción de la elastina) que constituyen entre ambos el 21% de los residuos de aminoácidos del colágeno (Lehninger, 1982). Existe una secuencia de aminoácidos altamente repetida: glicina-x-y, donde “x” suele ser prolina e “y” hidroxiprolina. Esta secuencia tripeptídica característica en la que el tercer residuo siempre es glicina, es decir; en la que cada tres aminoácidos (lo que equivale a una vuelta de hélice de colágeno) aparece una glicina, permite que las tres cadenas que constituyen la triple hélice de colágeno se empaqueten estrechamente, al quedar las glicinas que son altamente hidrófobas en el interior y los otros aminoácidos en el exterior (Figura 1).

Cada tipo de colágeno queda determinado por la fórmula molecular de sus cadenas de triple hélice (Mankin *et al.*, 2000). En algunos colágenos las tres cadenas tienen secuencias de aminoácidos idénticas, pero en otros existen dos cadenas idénticas siendo diferente la tercera. Estas estructuras se unen formando fibras que podemos observar con el microscopio electrónico. Las fibrillas de colágeno están constituidas por subunidades polipeptídicas repetidas llamadas tropocolágeno, que se ordenan de cabeza a cola en haces paralelos. Las cabezas de las moléculas de tropocolágeno se alternan a lo largo de la longitud de las fibras, explicando el espacio característico de 64 nm de las estriaciones transversales de la mayor parte de los colágenos (Lehninger, 1982).

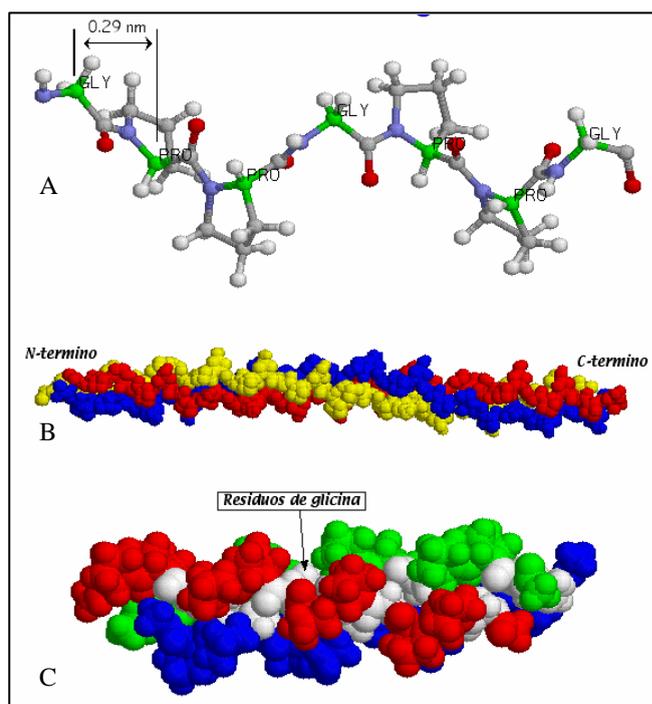


Figura 1. Molécula de colágeno. (A) Secuencia tripeptídica característica en la que el tercer residuo siempre es glicina. (B) Triple hélice de colágeno (C) Detalle de la triple hélice donde se observa como las glicinas que son altamente hidrófobas quedan en el interior y los otros aminoácidos en el exterior.

La síntesis del colágeno tiene lugar en el retículo endoplásmico rugoso (Graves *et al.*, 1981; Palmiter *et al.*, 1979). En primer lugar se sintetiza una cadena α de colágeno, que se modificará posteriormente a la traducción mediante distintos procesos, como la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina y la glicosidación con cadenas laterales de oligosacáridos (Borstein, 1974; Myllyla *et al.*, 1975). Estas y otras modificaciones son necesarias para que las estructuras de triple hélice se puedan asociar con normalidad en la matriz de colágeno.

El colágeno predominante en el cartílago articular es el tipo II (Buckwalter y Martin, 1995; Mankin *et al.*, 2000; Eyre, 2002), donde los colágenos IX y XI le ayudarían a crear las uniones para formar la red tridimensional que caracteriza al cartílago. Por el contrario, el principal colágeno que encontramos en el fibrocartílago es del tipo I (Woo *et al.*, 1994; Shindo *et al.*, 1981; Wildey *et al.*, 2001).

1.2.4. Proteoglicanos

Los proteoglicanos son un grupo variado de macromoléculas caracterizadas por estar formados por un núcleo proteico al que se unen una o más cadenas laterales especializadas de hidratos de carbono denominadas *glicosaminoglicano* (Figura 2). Los glicosaminoglicanos son largas cadenas lineales de polisacáridos formadas por un disacárido repetido (Hardingham *et al.*, 1992; Rosenberg, 1992; Rosenberg y Buckwalter, 1986; Roughley y Lee, 1994; Poole, 1986). De los disacáridos que forman parte del glicosaminoglicano, un azúcar presenta un grupo amino- (N-acetilglucosamina o N-

acetilgalactosamina) y el otro suele ser galactosa o ácido urónico. Se han identificado cuatro clases principales de cadenas de glicosaminoglicanos: *ácido hialurónico*, *condroitín-sulfato*, *keratán-sulfato* y *heparán-sulfato*. Cada uno de estos disacáridos contiene al menos un grupo carboxilo o sulfato cargado negativamente, por lo que pueden atraer agua e hidratarse (Poole, 1986). El ácido hialurónico es la única molécula de glicosaminoglicano que no se encuentra unida de forma covalente a un núcleo proteico para formar el proteoglicano (Trelstad, 1985).

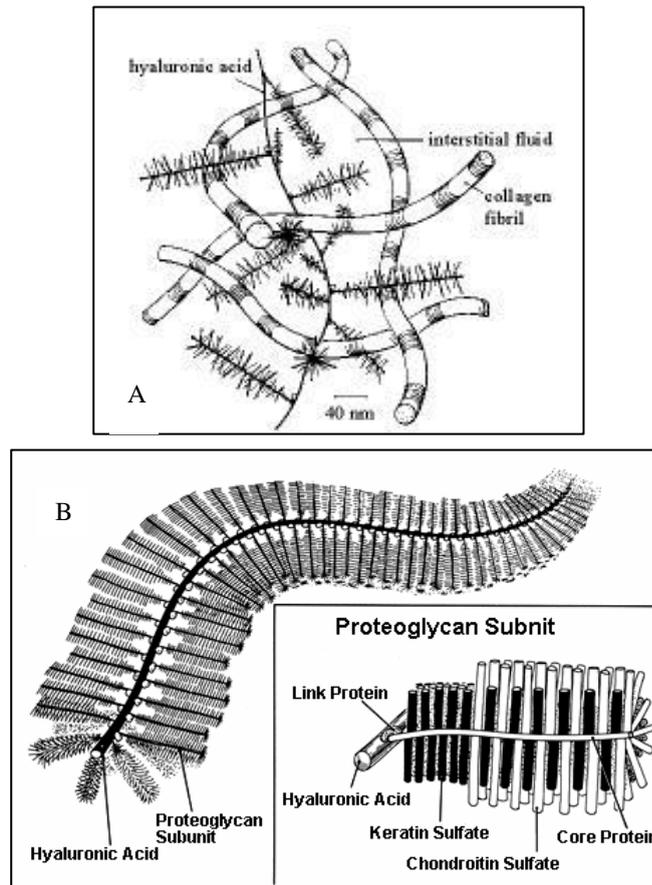


Figura 2. Dibujo esquemático de los componentes principales de la matriz extracelular. (A) Fibras de colágeno y agregados de proteoglicanos. (B) Estructura molecular de los proteoglicanos.

Podemos separar a los proteoglicanos en cuatro grupos diferentes: proteoglicanos extracelulares grandes, proteoglicanos pequeños con muchas leucinas, los asociados a las células y los de la membrana basal (Lo *et al.*, 2005).

El *agrecano* es un gran agregado de condroitín- y keratán-sulfato. Es el proteoglicano predominante en términos de masa del cartílago articular, donde representa el 80 al 90% de todos los proteoglicanos. Posee una región de unión no covalente que le permite unirse al ácido hialurónico mediante una interacción específica con una proteína llamada *proteína de unión*. En presencia de esta proteína de unión, una molécula de ácido hialurónico puede unirse a una cantidad de *agrecano* tres veces mayor que en su ausencia (Buckwalter y Mankin, 1997^a; Buckwalter *et al.*, 1984; Tang *et al.*,

1996). La formación de agregados ayuda a anclar los proteoglicanos dentro de la matriz, previniendo su desplazamiento durante la deformación del tejido, y ayudando a organizar y estabilizar la relación entre proteoglicanos y la malla de colágeno.

Entre los pequeños proteoglicanos podemos encontrar el *biglicano*, la *decorina* o la *fibromodulina*. Son miembros de una familia de moléculas intersticiales con secuencias repetidas ricas en leucina en las proteínas de su núcleo (Melching y Roughley, 1989; Rosemberg *et al.*, 1985; Heinegard *et al.*, 1986; Little y Ghosh, 1997). La decorina posee una cadena dermatán-sulfato, el biglicano dos cadenas dermatán-sulfato y la fibromodulina varias cadenas keratán-sulfato (Roughley y Lee, 1994). Este grupo de proteoglicanos no rellenan un gran volumen de tejido ni contribuyen directamente al comportamiento mecánico del tejido, si no que se unen a otras macromoléculas y probablemente modifican la función celular. Decorina y fibromodulina se unen al colágeno tipo II y pueden tener una función en la organización y estabilización de la red de colágeno (Hedbom, 1989; Roughley y Lee, 1994). El biglicano se concentra en la matriz pericelular donde puede interactuar con el colágeno del tipo VI (Roughley y Lee, 1994). Estos pequeños proteoglicanos también pueden unirse al TGF- β , por lo que podrían tener influencia sobre la proliferación celular (Hildebrand *et al.*, 1994).

1.2.5. Glicoproteínas y proteínas no colágenas

Existen una amplia variedad de estas moléculas dentro del cartílago pero pocas han sido estudiadas exhaustivamente. En general, están formadas por proteínas unidas a algunos monosacáridos u oligosacáridos (Heinegård y Pimentel, 1992; Heinegård *et al.*, 1995). Al menos algunas de estas moléculas intervienen en el mantenimiento y organización de las macromoléculas de la matriz extracelular. La *ancorina* CII puede ayudar a anclar a los condrocitos a las fibras de colágeno de la matriz (Mollenhauer *et al.*, 1984; Pfaffle *et al.*, 1990). La *proteína oligomérica de la matriz del cartílago* (COMP) es una proteína ácida que se concentra principalmente dentro de la matriz territorial del condrocito con capacidad para unirse al condrocito y a colágenos (Hedbom *et al.*, 1992; DiCesare *et al.*, 1994). La *fibronectina* y la *tenascina* son proteínas no colágenas de matriz encontradas en una gran variedad de tejidos. Sus funciones en el cartílago no son del todo conocidas, pero parecen tener un papel en la organización de la matriz y en las interacciones de la célula con la matriz (Chevalier *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 1996; Nishida *et al.*, 1995; Salter, 1993; Savarese *et al.*, 1996).

El conocimiento en profundidad de las funciones de estas proteínas nos ayudaría a conocer el comportamiento normal de los cartílagos, sus modificaciones con la enfermedad y las posibles alternativas terapéuticas a emplear.

1.2.6. Estructura del cartílago articular

Para formar el cartílago articular, los condrocitos organizan a los distintos colágenos, proteoglicanos y proteínas no colágenas dentro de una estructura muy ordenada. La composición, organización y propiedades mecánicas de la matriz extracelular y, probablemente, la función celular varían según la profundidad desde la superficie articular (Buckwalter y Mankin, 1997^a). (Figura 3).

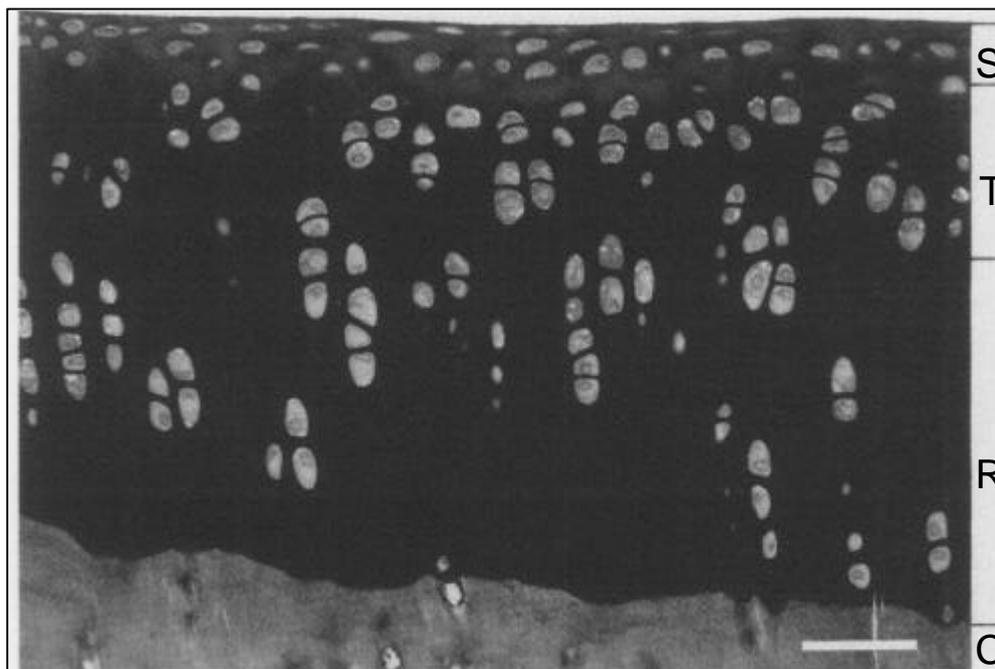


Figura 3. Organización del cartílago hialino normal en capas: S capa superficial. T zona transicional. M zona radial. C zona calcificada. (Imagen correspondiente al cóndilo medial femoral de un conejo de 8 meses. Modificada de Buckwalter y Mankin, 1997).

Existen diferencias entre los condrocitos de diferentes capas del cartílago. Está bien aceptado que los condrocitos de las capas superficiales son fenotípicamente diferentes a los de las capas profundas (Little y Ghosh, 1997). Además, el porcentaje de condrocitos con morfología de capa superficial varía topográficamente dentro de la articulación (Bullough *et al.*, 1985; Egli *et al.*, 1988). Se ha observado que el cartílago de zonas sometidas a altas cargas de peso contiene menos células del tipo de las capas superficiales, a pesar de ser similar el número total de células (Basdra *et al.*, 1994; Egli *et al.*, 1988). Los condrocitos de zona tibial que soportan alta carga, presentan un significativo aumento de la síntesis de proteoglicanos tras la estimulación a TGF- β exógeno (Little y Ghosh, 1995), otro dato a favor de las diferencias regionales. Por otro lado, no se observaron diferencias en la incorporación de sulfato o en la síntesis de proteoglicanos dermatán-sulfato entre las regiones que contenían distintas cantidades de células superficiales (Little y Ghosh, 1997).

Tradicionalmente se ha subdividido el cartílago articular en cuatro zonas histológicas distintas: la zona superficial o tangencial, la zona media o de transición, la zona profunda o radial y la zona de cartílago calcificado (Maroudas, 1979; Clark, 1985; Meachin *et al.*, 1974; Clarke, 1974). Desde la superficie a la profundidad, estas regiones varían por el tamaño, forma, densidad y actividad metabólica de sus células; su contenido en colágenos y proteoglicanos y en la organización de las fibras de colágeno (Clark, 1985; Meachin *et al.*, 1974; Buckwalter *et al.*, 1990). Las diferencias estructurales entre estas regiones implican también una variabilidad de funciones específicas (Buckwalter *et al.*, 1990; Aydelotte *et al.*, 1992).

➤ **Zona superficial o tangencial**

Esta zona también se ha denominado zona de deslizamiento. Es la capa más fina y superficial del cartílago articular y en ella se pueden diferenciar dos estratos. El más superficial es acelular y está formado por polisacáridos y fibras de colágeno orientadas al azar. Esta fina película denominada *lamina splendens* puede estar ausente de la superficie de algunas regiones del cartílago (Maroudas, 1979; Clark, 1985; Buckwalter y Mankin, 1997^a). Profundo a este estrato se encuentra otro de condrocitos de aspecto elipsoidal. Las células se orientan con su eje mayor paralelo a la superficie articular y muestran escasa actividad metabólica. Las fibras de colágeno se disponen aquí tangentes a la superficie articular y los proteoglicanos se hallan unidos potentemente a ellas, lo que proporciona una elevada resistencia al cizallamiento originado por el deslizamiento y la carga (Munuera, 1996; Lo *et al.*, 2005).

Esta zona también puede actuar como barrera para limitar la entrada de grandes moléculas, como los anticuerpos u otras proteínas, y la salida de moléculas de cartílago al líquido sinovial. Por este motivo, la disrupción de esta zona puede alterar no sólo las propiedades mecánicas del cartílago, sino también la liberación de moléculas que estimulen una respuesta inmune o inflamatoria (Buckwalter, Mankin, 1997^a; Lo *et al.*, 2005).

➤ **Zona media o de transición**

Como su nombre indica, su morfología y composición son intermedias entre las zonas superficial y profunda. Su volumen es varias veces mayor que el de la zona superficial. Las células se vuelven más esféricas y tienen mucho más retículo endoplásmico, complejos de Golgi y mitocondrias, lo que indica una elevación de la síntesis de matriz, respecto a la zona superficial. Así mismo, es característico el aumento de la cantidad de proteoglicanos y el descenso de la de agua y colágeno. En esta capa las fibras de colágeno se disponen de forma oblicua dando lugar a una organización como en arcadas (Buckwalter y Mankin, 1997^a).

➤ **Zona profunda o radial**

Es la capa más gruesa. En esta zona las células son esferoidales y se agrupan en columnas perpendiculares a la superficie articular. Las fibras de colágeno son las de mayor diámetro de todo el cartílago y se disponen de forma vertical. La concentración de proteoglicanos es mayor y la de agua menor que en capas más superficiales. Así mismo, las células poseen muchos filamentos

intracitoplasmáticos, muchos gránulos de glucógeno y abundante retículo endoplásmico y complejos de Golgi, lo que indica una zona de gran actividad en la síntesis proteica (Buckwalter y Mankin HJ, 1997^a; Lo *et al.*, 2005).

Existe una delgada capa de unas 2 a 5 μm de grosor denominada *línea de marea* alta para la calcificación (*tidemark* en la literatura anglosajona). Esta capa es visible al microscopio óptico como una zona basófila que separa esta capa radial de la de cartílago calcificado.

➤ Zona de cartílago calcificado

Es una delgada capa anclada al hueso subcondral, que actúa como un área de transición desde el blando cartílago hacia el rígido hueso. Las células de esta zona suelen ser más pequeñas y se encuentran rodeadas por una matriz cartilaginosa con sales de apatita (Buckwalter y Mankin HJ, 1997^a; Lo *et al.*, 2005).

1.3. Fibrocartílago: los meniscos

1.3.1. Aspecto macroscópico y regiones anatómicas

Los meniscos son estructuras fibrocartilaginosas intraarticulares de algunas diartrodias. Es característico su aspecto cuneiforme, con la parte externa de la cuña fija a los bordes periféricos de la articulación y la más delgada e interna en situación central (figura 4c).

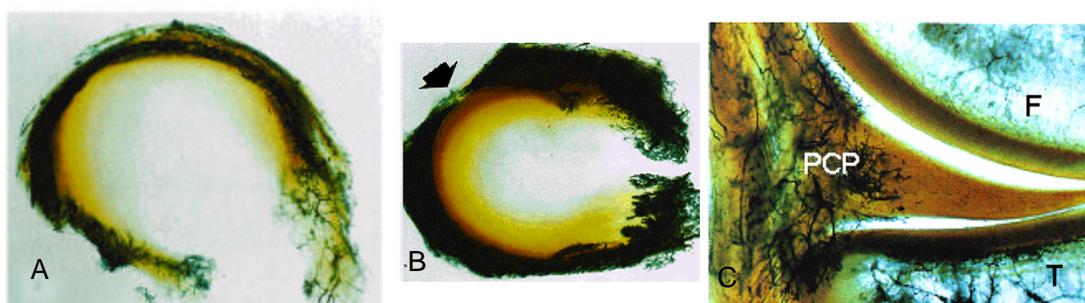


Figura 4. Vascularización del menisco

Visión craneal de un menisco medial (A) y lateral (B). (C) Corte coronal de un menisco medial. (F cóndilo femoral, T tibia, PCP plexo capilar perivascular). En todas las imágenes se observa la perfusión vascular del mismo con tinta china y usando el método de Spalteholz modificado (Imágenes tomadas de Arnoczky y Warren, 1982).

Los meniscos están presentes en las rodillas de todos los mamíferos, aunque presentan diferencias en su forma e inserciones (Messner y Gao, 1998). En el interior de la rodilla un par de meniscos, el medial y el lateral, se encuentran interpuestos entre los cóndilos femorales y las mesetas tibiales, “corrigiendo” la incongruencia entre estas dos superficies articulares. Estos meniscos asumen su forma característica durante los cuatro primeros meses de gestación (Clark y Ogden, 1983), el

menisco lateral cubre aproximadamente el 80% de la superficie del platillo tibial externo y el medial el 60%, permaneciendo estas proporciones constantes a lo largo del crecimiento.

El menisco medial humano tiene forma de semiluna y el lateral es algo más circular (figura 5). Los meniscos se han dividido anatómicamente en una región central o *cuerno* y en dos inserciones o *cuernos*: el anterior y el posterior. El cuerno posterior del menisco medial es más ancho que el anterior, mientras que en el menisco lateral la anchura de sus cuernos es similar (O'Connor, 1976).

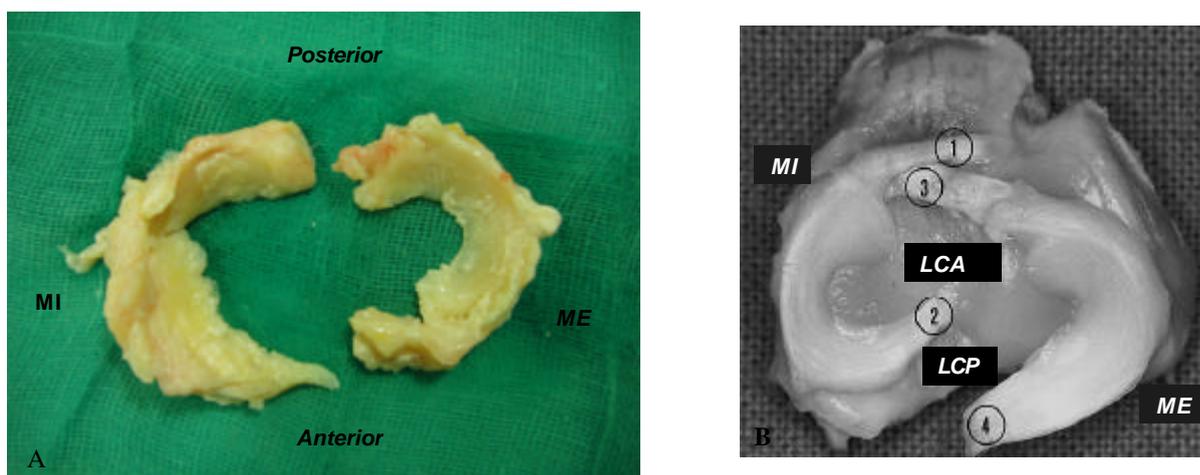


Figura 5. (a) Visión craneal de los meniscos de una rodilla izquierda artrósica procedentes de un paciente que se sometió a una cirugía de prótesis total de rodilla. (b) Fotografía de los meniscos de una rodilla derecha de conejo insertados en la tibia (tomada de Messner y Gao, 1998). MI: menisco interno, ME: menisco externo, LCA: ligamento cruzado anterior, LCP: ligamento cruzado posterior.

Las inserciones de los cuernos meniscales a la tibia están formadas por un tejido muy fibroso, cuya composición y estructura histológicas se parecen mucho a las del tejido ligamentoso (O'Connor, 1976). La inserción periférica del cuerpo se produce a través de los ligamentos cortos que se confunden con la cápsula articular y con los ligamentos colaterales, y que se han denominado ligamentos coronarios. Por esta porción periférica es por donde el menisco recibe el aporte vascular procedente de las arterias geniculadas. Dentro de la sinovial y de los tejidos de la cápsula de la rodilla, los vasos anastomóticos conocidos como *plexo parameniscal*, con una orientación principalmente circunferencial, se ramifican en vasos más pequeños que irrigan el borde periférico del menisco, lo que restringe la microvascularización al 10-25% periférico del menisco (Arnoczky y Warren, 1982; Day *et al.*, 1985). Esta vascularización característica permite dividir al menisco en tres zonas desde la periferia al centro de la articulación: zona roja o vascular, zona roja-blanca y zona blanca o avascular (Figura 4).

Dado que la vascularización del menisco es buena sólo en su tercio periférico, la mayor parte del menisco ha de recibir su nutrición por otros mecanismos, como la difusión pasiva de nutrientes o su bombeo mecánico a través de la compresión mecánica intermitente del tejido durante la carga (Arnoczky *et al.*, 1980). Debido a la naturaleza fibrosa y densa de la matriz extracelular, se cree que la difusión de nutrientes en la zona central del menisco es escasa (Noble y Hamblen, 1975). Algunos

estudios han demostrado “aberturas” en las superficies articulares de los meniscos, que se cree que contactan con un sistema de conductos entre las fibras de colágeno, que permitirían la llegada de nutrientes del líquido sinovial a las células meniscales (Bird y Sweet, 1987; Bird y Sweet, 1988). La comunicación directa intercelular puede constituir otra fuente de nutrientes en algunas células meniscales

1.3.2. Población celular

El menisco humano normal está compuesto principalmente por agua, en torno al 72%, constituyendo el colágeno el 22%, los glicosaminoglicanos el 0,8% y el DNA (lo que representa a las células) el 0,12% (Herwig *et al.*, 1984). Al parecer, el contenido de agua es mayor en los cuernos posteriores que en el cuerpo o en el cuerno anterior, pero no parecen existir diferencias entre las capas superficiales y profundas de una misma región meniscal (Proctor *et al.*, 1989). Si estudiamos la composición del menisco desecado encontramos que el 78% corresponde a colágeno, un 8% a proteínas no colágenas y un 1% a hexosamina (Ingman *et al.*, 1974).

Clásicamente, se ha considerado que la población celular del menisco está constituida por dos tipos celulares: unas fusiformes o fibroblásticas y otras ovoideas o condrocíticas. Las primeras, tenderían a localizarse en la zona periférica o vascularizada del menisco y característicamente producirían colágeno del tipo I. Por el contrario, las condrocíticas se localizarían en la zona central, sintetizarían colágeno tipo II y responderían menos a PDGF y a GH (Woo *et al.*, 1994; Spindler, 1995; Cao *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1999; Ghadially *et al.*, 1983; McDevitt y Webber, 1990). Ambos tipos de células poseen abundante retículo endoplásmico y corpúsculos de Golgi, y pocas mitocondrias (Woo *et al.*, 1994). Estas diferencias celulares dan similitud a cada zona del menisco con otros tejidos. Por ejemplo, las células de la zona periférica son similares a las del ligamento o el tendón, y las de la zona central recuerdan al cartílago hialino. Estas semejanzas sugieren que cada tipo celular puede desempeñar una función concreta dentro del menisco (Ghadially *et al.*, 1983).

En los últimos años, se ha arrojado algo de luz a la citoarquitectura del menisco en un modelo de conejo (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001^c). Con ayuda del microscopio electrónico y usando anticuerpos frente a proteínas del citoesqueleto, se observaron cuatro células fenotípicamente distintas. En la región fibrocartilaginosa observaron dos tipos de células con prolongaciones largas; en la región más interna del menisco una célula redondeada sin prolongaciones celulares, y en las zonas superficiales del menisco un cuarto tipo con aspecto fusiforme y sin prolongaciones.

1.3.3. Composición ultraestructural

Las células meniscales se encuentran inmersas en una matriz extracelular compuesta básicamente por una red tridimensional de colágeno. Aunque contiene varios tipos de moléculas de

colágeno, el tipo I es el más abundante representando el 90% del total. Otros tipos de colágeno que encontramos como constituyentes menores son los tipos: II, III, V y VI (Woo *et al.*, 1994; Wildey *et al.*, 2001; Shindo *et al.*, 1981; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001^a; Cheung, 1987; McDevitt y Webber, 1990; Eyre y Wu, 1983). La distribución de los diferentes tipos de colágeno muestra variaciones regionales. La cantidad de colágeno tipo I y III es considerablemente mayor en menisco medial que en lateral en conejos esqueléticamente maduros (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001^a). En los dos tercios periféricos del menisco bovino, excepto por unas trazas menores del 1% de colágenos III y V, solamente se observó colágeno del tipo I, mientras que en el tercio interno o avascular el colágeno de tipo II (60%) predominaba sobre el tipo I (40%) (Cheung, 1987).

También se producen diferencias en las distintas concentraciones de colágeno con el desarrollo de los individuos. Los colágenos III y V se encuentran principalmente en las capas superficiales del menisco y pericelularmente en individuos adultos (Eyre y Wu, 1983; Bland y Ashhurst, 1996). En fetos de conejos de 25 días sólo se observó colágenos de los tipos I, III y V, no apareciendo el colágeno del tipo II hasta las tres semanas después del nacimiento y la cantidad del mismo aumenta con la maduración posterior; lo que sugiere, que su contenido puede asociarse con el incremento de la carga articular en el desarrollo postnatal (Bland y Ashhurst, 1996).

La organización y orientación de los haces de colágeno en el menisco probablemente se deba a su función como estructura para el soporte de carga. La dirección principal de estos haces es circunferencial (Bullough *et al.*, 1970). Existen unas pocas fibras dispuestas de forma radial que podrían actuar “atando” entre sí las fibras longitudinales, evitando la separación que se produce entre las mismas con la compresión (Bullough *et al.*, 1970; Merkel, 1980; Beaupré *et al.*, 1986; Ghosh y Taylor, 1987). Además, existe un gran número de enlaces transversales entre las fibras de colágeno tipo I, gracias a que este tipo de colágeno presenta, en el menisco, un contenido superior de hidroxilisina y de residuos transversales de hidroxipiridino (Eyre y Wu, 1983; Takahasi *et al.*, 1988). Por último, estudios del menisco con el microscopio electrónico de barrido (Yasui, 1978) y la difracción de rayos X (Aspden, 1985), han demostrado tres orientaciones diferentes del colágeno en el menisco según la profundidad de la capa estudiada. En las capas superficiales existiría una orientación irregular, mientras que en las profundas se mantendría la clásica orientación circunferencial.

A diferencia del cartílago hialino que contiene un 7% de *proteoglicanos*, en los meniscos el porcentaje de los mismos es menor del 1% (Fithian *et al.*, 1990). Al igual que ocurre con los colágenos, también existen diferencias regionales en cuanto a las concentraciones de proteoglicanos (Nakano *et al.*, 1986; Adams y Ho, 1987).

El principal proteoglicano de la matriz extracelular de los meniscos humanos adultos es el *agrecano* al igual que en el cartílago (McNicol y Roughley, 1980). Otros proteoglicanos más pequeños presentes en el menisco son la decorina, el biglicano y la fibromodulina (Nakano *et al.*, 1997). El *agrecano* del menisco está formado principalmente por cadenas de condroitín-sulfato-4 y posee más

cadena de keratán-sulfato que el cartílago articular de la misma edad. Esta composición parece más afín al agregado del cartílago articular inmaduro (Roughley y White, 1980).

La *decorina* es el principal proteoglicano de bajo peso molecular encontrado en los meniscos humanos (Roughley y White, 1992). La capacidad de la decorina para unirse a las fibras de colágeno I y controlar su diámetro subraya el importante papel de esta molécula en la estabilización y organización de la matriz extracelular del menisco (Scott, 1996). Además, tiene capacidad para unirse y secuestrar el TGF- β (Hildebrand *et al.*, 1994).

El menisco humano normal contiene aproximadamente un 40% de condroitín-6-sulfato, 10 a 20% de condroitín-4-sulfato, 20 a 30% de dermatán-sulfato y un 15% de keratán-sulfato (Herwig *et al.*, 1984). También se han podido observar diferencias regionales en la distribución de los glicosaminoglicanos (Nakano *et al.*, 1997). En el tercio interno se encontró un 8% de glicosaminoglicanos y un 76% de colágeno, mientras que en el tercio periférico o vascular, el contenido fue de sólo un 2% frente a un 93% de colágeno. La concentración de condroitín-sulfato supone el 80% de los glicosaminoglicanos en el tercio interno meniscal, disminuyendo en torno al 50% en el tercio periférico. El *ácido hialurónico* constituye del 4 al 5% de los glicosaminoglicanos del tercio interno y asciende hasta el 10% en el tercio periférico.

La COMP se encuentra en altas concentraciones en los meniscos (Neidhart *et al.*, 1997). Esta proteína no colágena se une a las fibras de colágeno tipo I ayudando a mantener la estructura tridimensional del menisco. Pocos son los estudios que han descrito la distribución de esta proteína en los meniscos, así como su papel en el intento de reparación tisular tras traumatismos o en la artrosis. Es posible que una disminución en la síntesis y ensamblaje de esta proteína ayude a las alteraciones mecánicas que conducen al deterioro del menisco. Más adelante se tratará de valorar la distribución de esta proteína y su importancia en los meniscos, así como los cambios que sufre en su concentración y distribución con la artrosis.

1.3.4. Funciones del menisco

El menisco, al igual que otros tejidos blandos de la articulación de la rodilla, posee propiedades de material viscoelástico. Se dice que un material es viscoelástico cuando presenta tanto propiedades viscosas como elásticas; es decir, son materiales en los que la elongación de los mismos no sólo depende de la tensión aplicada sino que depende del tiempo que esté aplicada. Gracias a que la respuesta mecánica que se produce al aplicar un peso varía en función del tiempo, cuando la rodilla está cargada durante un largo período el menisco aumenta mucho su área de contacto, dispersando la fuerza de compresión sobre una superficie cada vez mayor y reduciendo así la carga por unidad de área (Mow *et al.*, 1990). Es probable que estas propiedades viscoelásticas deriven de las propiedades intrínsecas de los componentes del tejido y de la resistencia al rozamiento ejercida por el líquido a medida que fluye a través de la matriz permeable porosa del menisco.

➤ **Transmisión de cargas**

Las características estructurales y biomecánicas del menisco le permiten transmitir el 50% de las fuerzas de compresión de la rodilla en extensión y hasta el 85% en flexión de 90° (Ahmed y Burke, 1983; Ahmed, 1992). La resección completa del menisco provoca que las áreas de contacto tibiofemoral disminuyan en torno al 50% (Ahmed y Burke, 1983; Ahmed, 1992), lo que provoca un aumento de las fuerzas de contacto y a la degeneración del cartílago. Se ha observado que una meniscectomía del 15 al 34% de la superficie meniscal puede elevar las presiones de contacto en más de un 350% (Baratz *et al.*, 1986; Seedholm y Hagraeves, 1979).

➤ **Absorción de ondas de choque**

Los meniscos tienen la capacidad de absorber las ondas de choque que se producen durante la marcha. Las propiedades de los meniscos, más blandos y menos permeables a los líquidos que el cartílago hialino, parecen servir para disipar y absorber esa energía mecánica y atenuar los golpes recibidos por el cartílago. Se calcula que el menisco es capaz de absorber el 20% de las ondas de choque, porcentaje que se pierde tras una meniscectomía. La incapacidad para atenuar estas vibraciones favorece la aparición de artrosis (Voloshin y Wosk, 1983).

➤ **Estabilidad articular**

Los meniscos aportan a la meseta tibial un contorno más cóncavo para aceptar los redondeados cóndilos femorales. Esta geometría favorece la estabilidad estática de la articulación (DeHaven, 1990; Hsieh y Walker, 1976; Markolf *et al.*, 1976; Markolf *et al.*, 1981; Levy *et al.*, 1982). Sin embargo, existe desacuerdo sobre si esta función la realizan los meniscos en rodillas normales (DeHaven, 1990; Levy *et al.*, 1992), pero su función es innegable en caso de insuficiencia del ligamento cruzado anterior (Sommerlath, 1989; Thompson y Fu, 1993). El cuerno posterior del menisco interno es especialmente importante para proporcionar integridad en caso de rotura del ligamento cruzado anterior (Levy *et al.*, 1982).

➤ **Deslizamiento articular**

Gracias al alto contenido en agua y debido a la forma de los meniscos, es posible que éstos contribuyan a lubricar la articulación, permitiendo así un mejor deslizamiento de las superficies articulares (DeHaven, 1990; Levy *et al.*, 1992).

➤ **Propiocepción**

En el tejido perimeniscal abundan las terminaciones nerviosas que siguen a los vasos hasta el tercio periférico del menisco. En el menisco humano se han identificado tres receptores nerviosos diferentes: los corpúsculos de Pacini, relacionados con información de posición; terminaciones de Ruffini y órganos tendinosos de Golgi que responden cuando se aplica una tensión extrema (Zimny *et al.*, 1988). Los cuernos son las zonas meniscales con mayor densidad de terminaciones nerviosas y también donde existe mayor número de mecanorreceptores (Assimakopoulos *et al.*, 1992). La presencia de mecanorreceptores indica que los meniscos juegan un importante papel en la transmisión

de aferencias nerviosas junto a la información de los mecanorreceptores de los ligamentos y la cápsula articular de la rodilla (Kennedy *et al.*, 1982).

La información neural de los cuernos meniscales podría influir en la amplitud de la traslación antero-posterior del platillo tibial y, por tanto, la contribución de los meniscos a la estabilidad no sería mecánica, sino que dependería de su función propioceptora. Clínicamente, se ha demostrado que la propiocepción se altera en rodillas con una lesión meniscal y que éstas mejoran tras la meniscectomía parcial (Jerosch *et al.*, 1996). Experimentalmente, se ha demostrado la regeneración de mecanorreceptores en el menisco tras meniscectomía total en conejos (Moon y Kim, 1997).

1.4. La membrana sinovial

Se denomina así a la capa interna de la cápsula de las articulaciones sinoviales. Es una estructura lisa y brillante que recubre todas las estructuras intraarticulares a excepción de los meniscos y el cartílago hialino. Puede presentar prolongaciones digitiformes denominadas vellosidades sinoviales. Carece de membrana basal, por lo que no se puede considerar una membrana en términos histológicos estrictos. Entre sus funciones se encuentran la de regular el paso a través de la articulación de solutos, líquidos y proteínas desde el plasma; secretar líquido sinovial; contribuir a eliminar los productos de desgaste de la articulación y sustancias extrañas; y participar en la nutrición del cartílago y en la reparación de los ligamentos intraarticulares (Munuera, 1996).

Al microscopio óptico tiene un espesor aproximado de 25 μm y es muy celular. Podemos dividirla en dos capas bien definidas. La capa en contacto con la cavidad articular se denomina *íntima sinovial* y consiste en un revestimiento celular especial de una a tres células de grosor. Estas células se denominan *sinoviocitos*. Por debajo de la íntima se encuentra el tejido *subsinovial* que, dependiendo de su posición anatómica, puede estar compuesto por tejido conjuntivo, fibroso o adiposo y que sirve de base para la clasificación histológica de la sinovial en *laxa, fibrosa o adiposa* (Key, 1932). Sin embargo, las diferentes sinoviales se caracterizan no sólo por la estructura del tejido profundo, sino también por las células de revestimiento superficiales (los sinoviocitos) y por la abundancia relativa de vasos sanguíneos (Lo *et al.*, 2005).

En la sinovial, las células de revestimiento se diferencian de las células de las capas más profundas sólo por su posición y organización (Key, 1932) aunque algunos autores encuentran diferencias en el porcentaje del tipo de sinoviocitos en cada capa (Revell, 1989). Aunque existe cierto debate en cuanto al número de tipos de sinoviocitos que existen, se han identificado al microscopio electrónico dos formas fundamentales: los sinoviocitos de tipo A que comparten semejanzas con los macrófagos y los sinoviocitos de tipo B que se parecen a los fibroblastos (Barland *et al.*, 1962).

Las células tipo A poseen núcleos con un patrón de cromatina relativamente denso, pero los nucleolos no son un rasgo frecuente. Es característico que contengan vacuolas intracelulares, complejos de Golgi y cantidades más pequeñas de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas libres.

Pueden tener múltiples funciones dependiendo de los estímulos ambientales (Krey *et al.*, 1971) y aunque pueden sintetizar ácido hialurónico (Roy y Ghadially, 1967) principalmente son las responsables de la fagocitosis (Werb y Reynolds, 1974; Norton *et al.*, 1968; Ghadially *et al.*, 1976).

La células tipo B tienen nucleolos destacados y un patrón de cromatina nuclear extendido. Se caracterizan por poseer unas prolongaciones citoplásmicas largas que contienen agregados de retículo endoplásmico rugoso formando grupos muy regulares y rara vez otros orgánulos. Segregan proteínas y enzimas como colágenos, fibronectina, ácido hialurónico y otros glicosaminoglicanos, lo que las implica en la remodelación de la matriz extracelular (Mapp y Revell, 1985; Yielding *et al.*, 1957; Matsubara *et al.*, 1983; Roy y Ghadially, 1967).

Además de por sus diferencias morfológicas, los dos tipos principales de sinoviocitos se distinguen porque los tipo A tienen reactividad cruzada frente a anticuerpos específicos para los macrófagos y muestran respuestas positivas frente a los receptores del componente de la fracción constante de los anticuerpos. También expresan antígenos principales Ia y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II que participan en la presentación de antígenos en las primeras fases de la respuesta inmunitaria (Athanasou, 1995; Nazawa-Inoue *et al.*, 1998). Los sinoviocitos de tipo B carecen de estos marcadores macrofágicos pero se tiñen ante la presencia de deshidrogenasa de difosfoglucosa de uridina, que es la enzima limitante de la síntesis de ácido hialurónico (Wilkinson *et al.*, 1992). Además, el anticuerpo monoclonal Mab67, puede ser específico para los sinoviocitos de tipo B (Stevens *et al.*, 1990).

2. GONARTROSIS

2.1. Concepto. Definición de artrosis

Se denomina *gonartrosis* a la afectación de la articulación de la rodilla por la artrosis (*osteoarthritis* en terminología anglosajona).

El término *artrosis* es el nombre que reciben un grupo de artropatías crónicas, de carácter no inflamatorio, que dirigen a la destrucción del cartílago hialino. No es una entidad única, pero podría ser descrita como el estadio final, en el fallo articular, de diversas patologías de etiologías diferentes (Mankin y Brandt, 1992). A pesar de que existe un continuo debate en la precisa definición de la artrosis, la mayoría de los autores está de acuerdo en que implica destrucción del cartílago hialino y pérdida de función. La mayoría de las definiciones implican alteraciones radiológicas, clínicas, patológicas o combinaciones de las mismas.

Se definió por la *American Rheumatism Association* como un grupo heterogéneo de enfermedades de la articulación asociados con un defecto en la integridad del cartílago articular, unidos a cambios en el hueso subyacente y en los márgenes articulares (Altman *et al.*, 1986).

La *American Academy of Orthopaedic Surgeons* y los *National Institutes of Health* dieron la siguiente definición para la artrosis: “las enfermedades artrósicas son el resultado de acontecimientos mecánicos y biológicos que desestabilizan el acoplamiento entre la degradación y la síntesis de los condrocitos del cartílago articular y la matriz extracelular, y el hueso subcondral... Al final, las enfermedades artrósicas se manifiestan mediante alteraciones morfológicas, moleculares y bioquímicas de las células y de la matriz que llevan a reblandecimiento, fibrilación, ulceración, pérdida de cartílago articular, esclerosis y osificación del hueso subcondral, osteofitos y quistes subcondrales...” (Kuettner y Goldbeg, 1995).

La artrosis se puede definir también como un síndrome clínico desencadenado por diferentes mecanismos etiopatogénicos y en términos principalmente histopatológicos como la desestructuración progresiva del cartílago acompañada de una respuesta ósea reparadora. Estas alteraciones estructurales se reflejan en las imágenes radiológicas como pinzamiento articular y la esclerosis subcondral. Además del cartílago se lesionan el resto de los elementos que forman la articulación, incluyendo la membrana sinovial y los tejidos pericapsulares, en los que se observa de manera casi constante una respuesta inflamatoria, intensificada en los brotes de mayor expresión clínica (Pelletier *et al.*, 2001).

2.2. Criterios diagnósticos

Tradicionalmente se han empleado criterios radiográficos para el diagnóstico de la artrosis (Kellgren y Lawrence, 1957; Ahlbäck, 1968). Sin embargo en estadios iniciales de la artrosis las radiografías convencionales la infraestiman (Fife *et al.*, 1991^a; Brandt *et al.*, 1991). Por este motivo, se han propuesto técnicas que detectan cambios más sutiles en la articulación para diagnosticar la artrosis, como pueden ser las imágenes obtenidas por RMN o de la artroscopia de dicha articulación (Bredella *et al.*, 1999; Lysholm *et al.*, 1987).

El dolor es el problema clínico predominante en la artrosis pero es un síntoma subjetivo y difícil de cuantificar. Sin embargo, el paciente a menudo adapta sus actividades diarias y su estilo de vida para reducir el dolor. Se han desarrollado criterios de clasificación que dan importancia a la sintomatología de la enfermedad como por ejemplo los de la *American Collage of Rheumathology* (Altman *et al.*, 1986).

En estudios experimentales los criterios diagnósticos de la enfermedad son puramente morfológicos y bioquímicos.

Por último, la artrosis puede ser clasificada dependiendo de su causa como primaria o idopática, si se desconoce su etiología, o secundaria a otra enfermedad como osteonecrosis, fracturas con secuelas de incongruencia articular, artritis sépticas, etcétera.

2.3. Epidemiología

La artrosis es la alteración más frecuente y la principal causa de discapacidad crónica en las personas mayores en los países desarrollados (Paulino *et al.*, 1982).

La gonartrosis es la principal causa de incapacidad crónica entre los ancianos de los Estados Unidos de América (Lawrence *et al.*, 1998). Más del 80% de los mayores de 55 años tienen evidencias radiológicas de artrosis, de los cuales, del 10 al 20% tienen limitaciones en su actividad física a causa de la enfermedad.

La prevalencia de la gonartrosis, en el estudio de Framingham, fue del 30% entre los 65 y 74 años de edad. Los estudios que examinaron personas mayores de 75 años hallaron una prevalencia superior al 30%, siendo aun más elevado en el grupo de mujeres que en el de varones (Felson, 1990; Guccione *et al.*, 1994).

La enorme frecuencia de esta enfermedad y la incapacidad que provoca en los individuos que la sufren, implica que tenga una importantísima repercusión económica. Al enorme número de consultas médicas; gastos farmacéuticos y elevado número de intervenciones quirúrgicas debidas a ésta patología (unas 120.000 prótesis de rodilla en los Estados Unidos de América al año), hay que sumar los gastos indirectos que se generan por incapacidad laboral y pérdidas de ganancias (Felson *et al.*, 1998; Rothfuss *et al.*, 1997).

2.4. Factores de riesgo

Los estudios epidemiológicos han implicado un gran número de factores de riesgo para desarrollar artrosis. Sin embargo, la etiología de la artrosis está influenciada por múltiples y complejas interacciones entre los distintos factores de riesgo (Felson *et al.*, 2000; Sharma, 2001^b; Sowers, 2001).

2.4.1. Factores demográficos

La edad es principal factor asociado a la artrosis. Tanto la alteración que se produce con el envejecimiento en los componentes de la matriz, como la muerte celular o la pérdida de propiocepción, aumentan el riesgo de alteración del cartílago hialino. Como ejemplo, podemos decir que la prevalencia de la gonartrosis aumenta de 2 a 10 veces desde los 30 hasta los 65 años (Oliveria *et al.*, 1995).

También se ha observado que el sexo femenino predispone a sufrir artrosis de rodilla, sobre todo después de los 50 años (Anderson y Felson, 1988; Oliveria *et al.*, 1995).

Las poblaciones de raza blanca de los países desarrollados tienen unas tasas de prevalencia parecidas. En el primer *National Health and Nutrition Examination Survey*, las mujeres afroamericanas, pero no los varones, presentaron una mayor prevalencia de gonartrosis que las blancas

(Anderson y Felson, 1988). Sin embargo, en el *Johnson County Arthritis Project* de Carolina del Norte, se observaron tasas similares entre la población afroamericana y la blanca (Jordan et al., 1995). La prevalencia de la gonartrosis es un 45% más alta en las mujeres chinas y un 100% más alta en las japonesas que en las mujeres blancas de edad equiparable (Yoshida et al., 2002; Zhang et al., 2001). Estas variaciones étnicas se pueden deber a factores genéticos, del estilo de vida, biológicos o socioeconómicos.

2.4.2 Factores genéticos

Los factores genéticos juegan un papel muy importante en la etiología de la artrosis generalizada, pero la transmisión hereditaria varía según la articulación. La artrosis generalizada sería una afección poligénica. Se están llevando a cabo barridos genómicos completos para identificar los *loci* que confieren sensibilidad a desarrollar artrosis (Simonet, 2002). Parece que la transmisión hereditaria es mayor en las mujeres y que pueda alcanzar hasta el 60% en la artrosis de mano y cadera, pero sólo del 10 al 30% en la de rodilla. (Nelson et al., 2000; Simonet, 2002).

2.4.3. Factores hormonales

La incidencia de la gonartrosis es mayor en mujeres y las diferencias son aún mayores a partir de la menopausia, lo que indica que el hipoestrogenismo puede ser un factor de riesgo (Felson et al., 2000; Sowers, 2001).

Se han realizado estudios para valorar la influencia de la terapia hormonal sustitutiva en mujeres menopaúsicas en el desarrollo de artrosis de rodilla y se observó en algunos de ellos que podrían disminuir el desarrollo de gonartrosis. Esta reducción del riesgo podría ser de hasta el 40% (Felson et al., 1992). Sin embargo, las pacientes que toman terapia hormonal sustitutiva suelen estar más concienciadas respecto a cuidar su salud, por lo que la nutrición es mejor y suelen hacer más ejercicio, variables que pueden sesgar los resultados de estos estudios (Nelson et al., 2000).

2.4.4. Obesidad

El aumento del índice de masa corporal se asocia con un marcado aumento de la gonartrosis de rodilla (Felson et al., 2000; Sowers, 2001). Los datos del estudio de Framingham mostraron que el aumento de 2,3 kg o más en 10 años, implicaba un aumento del riesgo casi cuatro veces mayor de desarrollar artrosis de rodilla (Felson et al., 1997).

La asociación entre obesidad y artrosis en articulaciones de no carga, como las pequeñas articulaciones de la mano, sugiere la existencia de otros mecanismos no mecánicos (Felson et al., 2000). Se ha sugerido que la insulina puede intervenir en la patogenia de la artrosis, al observar que

los pacientes con sobrepeso y gonartrosis presentan un metabolismo anormal de los condrocitos del tipo de la hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e intolerancia a hidratos de carbono (Silveri *et al.*, 1994).

2.4.5. Deficiencias nutricionales

La presencia de radicales libres de oxígeno se ha relacionado con la lesión de los tejidos en varias enfermedades asociadas a la edad (Felson *et al.*, 2000; Sharma, 2001^a; Sowers, 2001). Si dichos radicales libres suponen una amenaza para el cartílago articular, es posible que los antioxidantes como las vitaminas A, C y E protejan contra estas agresiones. Los datos del estudio de Framingham (Felson *et al.*, 1997) avalan esta hipótesis, pues observaron que los individuos con un aporte de vitamina C en los dos terciles superiores presentaban una reducción del 60 al 70% del riesgo de gonartrosis progresiva respecto a los del tercil inferior.

Aunque ni las concentraciones séricas de 25-hidroxi-colecalciferol ni el aporte diario de vitamina D parecen estar relacionados con la incidencia de gonartrosis, las concentraciones elevadas parecen poseer un efecto protector contra la evolución de la enfermedad (Zhang *et al.*, 2001).

2.4.6. Mecánica articular

Las características específicas de la rodilla también pueden predisponer al desarrollo de la gonartrosis (Felson *et al.*, 2000; Sharma, 2001^b). La alineación de la rodilla influye mucho en la distribución de la carga en la articulación. La alineación de la rodilla en varo está asociada con una artrosis de predominio en el compartimento femorotibial medial y la alineación en valgo con una gonartrosis de predominio en el compartimento femorotibial lateral. El grado de desviación se correlaciona con el pinzamiento del espacio articular (Sharma *et al.*, 2001^b).

La propiocepción en personas con gonartrosis unilateral, es menor tanto en la rodilla artrósica como en la sana, comparada con rodillas normales. Esto podría indicar una pérdida para mantener la estabilidad articular previa a la aparición de la patología (Sharma, 2001^b), pero también podría ser consecuencia de la inactividad.

La laxitud en varo-valgo aumenta con la edad, y generalmente es mayor en las mujeres. Se ha demostrado que las personas con gonartrosis unilateral presentan una mayor laxitud varo-valgo, tanto en la rodilla enferma como en la contralateral, comparados con individuos sanos de la misma edad (Sharma, 2001^b; Sharma *et al.*, 1999).

La inestabilidad antero-posterior producida por una rotura del ligamento cruzado anterior (LCA) es una causa bien estudiada de gonartrosis, tanto en clínica como en experimentación animal (Pond y Nuki, 1973; Jacobsen, 1977; Yoshioka *et al.*, 1996; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001^{a,d}).

2.4.7. Actividad física y laboral

No existen datos sobre que la actividad física leve o moderada aumente el riesgo de desarrollar gonartrosis (Felson *et al.*, 2000; Sowers, 2001). En un estudio a cinco años en socios de una asociación de corredores de más de 50 años, se observó que dichos individuos no tenían más riesgo de desarrollar gonartrosis que un grupo de no deportistas de características similares (Lane *et al.*, 1993). No obstante, en el estudio de Framingham se observó una fuerte asociación entre la actividad física intensa y la aparición de nuevos casos de gonartrosis (McAlindon *et al.*, 1999)

En los deportistas de élite está aumentada la incidencia de gonartrosis. En un estudio en mujeres tenistas y corredoras de largas distancias, se encontró una probabilidad tres veces mayor de padecer gonartrosis respecto a controles de su edad (Spector *et al.*, 1996). Además, casi la mitad de una cohorte de futbolistas profesionales retirados con una media de edad de 40,4 años presentaba artrosis (Turner *et al.*, 2000).

Estudios en pacientes varones con ocupaciones que exigen un uso excesivo y repetitivo de la rodilla (carpinteros, pintores, mineros, estibadores), presentan un mayor riesgo de sufrir gonartrosis. Aunque existen pocas investigaciones en mujeres, parece que les influye de la misma manera (Schouten *et al.*, 2002).

2.5. Etiopatogenia

La artrosis no es una entidad única sino que se debe a distintas etiologías. Hipotéticamente se debe a unas demandas excesivas a un cartílago normal, a unas demandas normales a un cartílago anormal o a la combinación de ambas.

Rara vez se encuentra un paciente cuya artrosis se debe a un trastorno bioquímico como la ocronosis o la hemocromatosis; a una neuropatía como en la sífilis, siringomielia o lepra que dan lugar a la denominada artropatía de Charcot; a displasias articulares; a fracturas intraarticulares con una incongruencia residual o a artritis sépticas. La mayoría de las veces la artrosis es primaria, idiopática o de causa desconocida (Buckwalter y Mankin, 1997^b).

Clásicamente se ha considerado que la artrosis se produce por un fallo primario en el cartílago articular. Alteraciones en el condrocito, en la matriz extracelular o en ambos, provocarían el inicio de la artrosis y, secundariamente, se alteraría el hueso subcondral por alteración de la biomecánica de la articulación y se produciría una reacción inflamatoria en la sinovial, derivada de la absorción de partículas procedentes del cartílago. Apoya esta teoría el hecho de que una de las primeras modificaciones que se observan en la artrosis es un aumento de agua en la matriz extracelular, consecuencia de la pérdida del equilibrio entre la presión hidrostática de la matriz, que tiende a expandirla, y la tensión de la malla de colágeno que intenta contenerla (McDevitt *et al.*, 1977; Mankin y Brandt, 1992). En fases precoces de la artrosis se ha observado una depleción de proteoglicanos y

que las moléculas de los mismos difieren de los agregados normales (McDevitt *et al.*, 1977; Mankin y Brandt, 1992). También se altera la arquitectura del cartílago por una rotura y posterior fragmentación de las fibras de colágeno, secundaria a una pérdida de fuerza entre los enlaces covalentes que las unen (Mankin y Brandt, 1992).

Otra teoría apunta al hueso subcondral como origen de los cambios que conducirían a desarrollar la enfermedad artrósica (Radin y Rose, 1986). Las alteraciones del cartílago podrían ser secundarias a la rigidez del hueso subcondral, lo que podría alterar la capacidad de amortiguar y distribuir las cargas en la articulación, con el consiguiente efecto artrogénico. Esta teoría se ve apoyada, en parte, por la llamativa escasa frecuencia de fracturas de cadera en pacientes con artrosis y por estudios que han confirmado la relación inversa entre osteoporosis y artrosis (Sowers, 2001; Lane y Nevitt, 2002).

2.6. Fisiopatología

El desequilibrio en la homeostasis normal entre formación y degradación de las moléculas que constituyen la matriz extracelular del cartílago altera sus propiedades y su función (Martin y Buckwalter, 1996^a; Buckwalter y Lane, 1996). Además de producirse cambios en la síntesis proteica por parte del condrocito, se liberan enzimas proteolíticas (metaloproteasas y serinoproteasas) que destruyen o desestructuran las moléculas que forman parte del andamiaje donde se sustentan las células. Se producirá una pérdida progresiva del cartílago, una remodelación del hueso subcondral con formación de osteofitos y una inflamación del tejido sinovial. Pero no sólo los condrocitos, sino también los sinoviocitos participan en la degradación del cartílago, interaccionando con el condrocito y amplificando la respuesta inflamatoria (Pelletier *et al.*, 2001).

Macroscópicamente se observa en las primeras fases de la artrosis que el cartílago articular pierde el aspecto liso y brillante de su superficie blancoazulada y se vuelve amarillenta, finamente granular, mate y blanda. La fibrilación de las capas superficiales le confiere un aspecto aterciopelado, pero en fases más avanzadas se observarán fisuras verticales que pueden llegar al hueso subcondral y en estadios aún más avanzados úlceras del cartílago, dejando hueso expuesto (Munuera, 1996). Con frecuencia los condrocitos adyacentes a las zonas de fisuración sufren fenómenos de necrosis (Meachim, 1972) y apoptosis (Blanco *et al.*, 1995) y hay una disminución evidente de la celularidad. Junto a estas zonas hay otras de proliferación de condrocitos, con hipertrofia celular y formación de nidos celulares (Poole, 1991). En la matriz se aprecian alteraciones en la tinción que traducen modificaciones en su producción y a degradación de la misma. Se puede encontrar una multiplicación de la línea de marea, sobre todo en zonas donde el cartílago se encuentra erosionado. En esta línea de marea se puede observar la penetración por capilares. En estas zonas lesionadas proliferan fibroblastos que inducen una metaplasia del cartílago hialino hacia fibrocartílago (Bullough y Jagannath, 1983).

En estadios avanzados de la artrosis, además de la afectación del cartílago se produce una reacción inflamatoria de la membrana sinovial. La destrucción articular provoca un desprendimiento al líquido articular de fragmentos libres de cartílago y hueso que pueden ser fagocitados por los sinoviocitos desencadenando una reacción a cuerpo extraño. (Pelletier *et al.*, 2001). Además de a la sinovial, la reacción inflamatoria también afecta a la cápsula articular y a los ligamentos, que pueden evolucionar hacia una excesiva laxitud o, más frecuentemente, hacia la fibrosis contribuyendo a alterar la biomecánica articular.

2.7. Modelos animales de artrosis

Existen muchas dificultades para realizar estudios en fases iniciales de la artrosis. En primer lugar resulta complicado llegar a un consenso para definir el estadio de la enfermedad y supervisar su inicio y progresión. Además existen importantes limitaciones éticas a la hora de obtener muestras de un tejido como el cartílago con poca capacidad de curación. Por todo esto, los modelos animales de artrosis se hacen necesarios para poder obtener datos sobre el inicio y progresión de la enfermedad y además nos aportan información de lo que ocurre en todas las estructuras articulares, y no en un tejido específico de una localización concreta. Sin embargo, la extrapolación de resultados a la enfermedad en humanos debido principalmente a la diferencia de tamaño de las articulaciones y las diferencias en los patrones de carga y marcha, no son del todo posibles. Además, el principal síntoma de la enfermedad, el dolor, no resulta fácil de constatar.

2.7.1. Modelos de artrosis espontánea

Todos los vertebrados desarrollan artrosis, pero a diferente velocidad y en ocasiones con diferentes distribuciones. Los modelos de artrosis espontánea tienen la ventaja de ocurrir de forma natural pero la gran desventaja de tardar mucho tiempo en desarrollar la enfermedad. El empleo de animales transgénicos con alteración de las proteínas de matriz conduce a una artrosis precoz.

Ejemplos de modelos de artrosis espontánea son los ratones C57BL, STR/IN, STR/ORT, con mutación de colágeno II o del colágeno IX; cobayas albinos de la raza *Hartley* o monos de la raza *Macaca malatta* (Oegema y Visco, 1999; Brandt, 2002)

2.7.2. Modelos de artrosis inducida

Se puede inducir la artrosis empleando métodos químicos mediante inyección intrarticular. Estos modelos generalmente son dosis dependiente y el daño que causan las diferentes sustancias, si éste es pequeño, es potencialmente reversible. Se ha producido artrosis mediante la administración

intrarticular de suero salino hipertónico, papaína, colagenasa o TGF- β , por ejemplo (Oegema y Visco, 1999).

Se desarrollaron modelos mecánicos para conseguir acelerar la artrosis pero de forma controlada y, en algunos casos para conocer la función de componentes mecánicos o elementos estructurales concretos de la articulación en el desarrollo de la artrosis. El patrón de oro de este tipo de modelos es la sección del ligamento cruzado craneal (anterior) en perros (Pond y Nuki, 1973), sin embargo la sección del LCA en conejos produce unos cambios artrósicos más precoces (Vignon *et al.*, 1987; Yoshioka *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1998^b; Sah *et al.*, 2003).

Se han realizado también diferentes tipos de meniscectomías, que varían en amplitud y localización (Moskowitz *et al.*, 1973; Nishida *et al.*, 2005), unidas o no a la sección de ligamentos de la rodilla. Cirugías extraarticulares, como las osteotomías varizantes o valgizantes y las resecciones musculares o lesiones nerviosas, causan la patología más lentamente y son más complicadas técnicamente (Oegema y Visco, 1999).

2.8. Los meniscos en la artrosis de rodilla

Los meniscos proporcionan importantes funciones biomecánicas a la rodilla como soporte y distribución de la carga o absorción de impactos (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001^a). Dado que son esenciales para el adecuado funcionamiento de la rodilla, su lesión podría conducir al desarrollo de artrosis en la rodilla, como los demuestran los modelos de artrosis experimental inducida por resección meniscal (Moskowitz *et al.*, 1973). Por el contrario, los procesos destructivos y de remodelado de las artropatías inflamatorias y de la artrosis también alterarán el menisco (Hashimoto *et al.*, 1999).

El efecto inmediato de una meniscectomía es la disminución en un 50-75% de la superficie de contacto en la articulación tibiofemoral y en un aumento de dos a tres veces de la presión de contacto (Krause *et al.*, 1976; Seedholm y Hagreaves, 1979; Kurosawa *et al.*, 1980; Ahmed y Burke, 1983). Con estos datos es fácil comprender que un cartílago que sea privado de la protección del menisco alterará su composición para soportar mayores tensiones, lo que finalmente conducirá al deterioro del mismo.

Poco se sabe del papel que los meniscos desempeñan en el inicio, mantenimiento y desarrollo de la artrosis de rodilla. Los cambios que se producen en los mismos podrían ser consecuencia del envejecimiento normal de la articulación, formar parte del proceso de destrucción generalizado de la articulación en el estadio final de una enfermedad inflamatoria articular, sufrir la degradación del tejido por parte de las enzimas liberadas por el cartílago o sinovial dañados o, por el contrario sus alteraciones podrían tener algún papel en la degeneración del resto de los tejidos que forman parte de la articulación de la rodilla. Sea como fuere, de lo que si existe evidencia es que la composición ultraestructural de los meniscos, sus características biomecánicas y el aspecto macroscópico de los

mismos se alterará cuando la articulación de la que forma parte se vea alterada por la enfermedad artrósica.

Herwig *et al.* (1984) observaron que el contenido en agua de los meniscos humanos se correlacionaba con el grado de degeneración meniscal, incrementándose su porcentaje desde el 70% en las muestras normales al 85% del peso del tejido en las muestras más degeneradas. El contenido de colágeno y glicosaminoglicanos totales mostraban una disminución que también se relacionaba con el grado de degeneración meniscal. Al estudiar los meniscos desecados, no encontraron cambios significativos en el contenido de colágeno respecto al grado de degeneración meniscal, pero se producía un aumento en el contenido de glicosaminoglicanos totales. Estudiando glicosaminoglicanos individuales, observaron un aumento de condroitín-6-sulfato en relación con la degeneración meniscal, desde un 35% en un menisco normal hasta un 55% en los muy degenerados. El resto de los glicosaminoglicanos sufrían un leve descenso en su concentración.

En un modelo experimental de artrosis inducida por sección del ligamento cruzado anterior (craneal) en perros *beagles*, se observó un aumento inicial de la concentración de agua con disminución de los niveles de glicosaminoglicanos en los meniscos a la semana de la cirugía. Los niveles de glicosaminoglicanos se normalizaban entre los 3 y los 18 meses de la cirugía, pero se encontraban algo elevados respecto a sus valores basales entre los 15 y los 18 meses (Adams *et al.*, 1983).

En los meniscos artrósicos se ha observado que existen células apoptóticas y síntesis de óxido nítrico por parte de las células centrales de aspecto condroide (Hashimoto *et al.*, 1999). La pérdida de población celular en los meniscos, bien por daño directo o por muerte celular programada, provocará una pérdida de la capacidad de sintetizar nuevas moléculas y de controlar la organización de la matriz extracelular, perdiendo de este modo las características del tejido meniscal y produciéndose un fallo mecánico del mismo por desensamblaje de la red tridimensional normal. Sería por tanto deseable conocer si existe un aumento en la proliferación celular en respuesta a una agresión al tejido, bien sea mecánica o por mediadores inflamatorios o químicos, y si el descenso en el número de células implica un punto de inflexión definitivo en el establecimiento de la artrosis.

También se ha observado que existe una relación entre el contenido de calcio de los meniscos y el grado de degeneración de los mismos (Habata *et al.*, 2001). La condrocalcinosis es frecuente en ancianos y el depósito de calcio en los meniscos podría estar relacionado con cambios degenerativos meniscales (Hough y Webber, 1990). Por otro lado, los cuerpos apoptóticos contienen fosfatasa alcalina y NTP pirofosfohidrolasa, por lo que pueden precipitar calcio (Hashimoto *et al.*, 1988^{a,b}) lo que podría indicar que la muerte celular provocaría además de la pérdida de capacidad reparativa del menisco, un endurecimiento del tejido que alteraría aún más sus funciones y a su vez originaría un mayor deterioro tisular.

Poco se sabe de los cambios en la concentración y síntesis de la COMP en los meniscos artrósicos. El aumento en el metabolismo celular de los meniscos, expresado como un incremento del

RNA total, tras sección del LCA en conejos (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001^a) hace pensar en un intento de reparación tisular tras traumatismos o en la artrosis. Es posible que un aumento en la síntesis de la COMP trate de estabilizar la estructura meniscal dañada y que, por el contrario, una disminución en la síntesis y ensamblaje de esta proteína favorezca las alteraciones mecánicas que conducen al deterioro del menisco. El conocimiento de la función, distribución y cambios en la COMP meniscal en el menisco normal y en la artrosis, ayudará a entender la fisiopatología de la enfermedad y podría abrir nuevas líneas de investigación en el tratamiento de la artrosis.

3. PROTEÍNA OLIGOMÉRICA DE LA MATRIZ DEL CARTÍLAGO (COMP)

3.1. Identificación y descripción de la molécula

Como ya se comentó anteriormente, la matriz extracelular de los cartílagos está constituida por distintas variedades de colágenos, proteoglicanos y proteínas no colágenas. Las proteínas no colágenas son un grupo de moléculas que desempeñan importantes funciones biológicas y/o estructurales (Heinegård y Oldberg, 1989). Interaccionan con otras proteínas de matriz y pueden influir en el ensamblaje supramolecular de la matriz y por tanto, son responsables de parte de las propiedades del tejido. Por sus interacciones directas con las células, pueden proporcionar señales biológicas de las propiedades de la matriz y, por tanto, influir en la función de la célula (DiCesare *et al.*, 1994).

Fife y Brandt (1984) describieron una proteína no colágena de alto peso molecular (mayor de 400000 Da) obtenida a partir de cartílago articular normal y de cartílago traqueal bovino. Esta proteína se dividía en subunidades de 116 kDa y constituía del 2 al 4% de las proteínas totales de extractos de cartílago articular procedentes de vacas y perros. No encontraron esta proteína en tejidos distintos al cartílago, por lo que creyeron que era específica del cartílago hialino.

Años más tarde, Mörgelin *et al.* (1992) aislaron y caracterizaron una proteína no colágena de la matriz del cartílago a partir de condrosarcoma de rata que es probablemente idéntica a la previamente aislada por Fife y Brandt (1984). Denominaron a ésta proteína con el término de COMP. El estudio por microscopía electrónica reveló que la mayoría de las moléculas mostraban una estructura con cinco brazos que terminaba en un dominio globular. Los brazos tenían una longitud media de 28 nm y estaban unidos a una estructura central cilíndrica de 3,3 nm de diámetro y 7,7 nm de longitud. El diámetro de los dominios globulares era de 4,8 nm. En base a estas observaciones, se sugirió que la COMP tenía una estructura en forma de ramillete de cinco brazos flexibles que terminaban en una cabeza globular similar a las trombospondinas (Figura 6). Estos autores también observaron que la COMP tiene una carga neta negativa a pH fisiológico. Probablemente el alto contenido en ácido aspártico y ácido glutámico (125 residuos de cada 1000) y de hidratos de carbono cargados negativamente, hacen de la COMP una proteína marcadamente aniónica (Hedbom *et al.*, 1992).

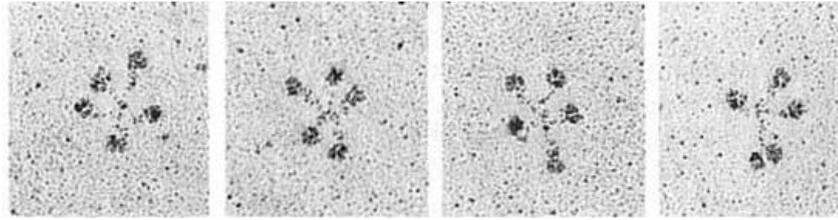


Figura 6. COMP. Se muestran ejemplos de moléculas de COMP vistas mediante gran aumento con su típico aspecto de ramillete con 5 brazos y un dominio globular en N-terminal. (Tomada de Di Cesare *et al.*, 1994).

La COMP ha sido denominada también como trombospondina 5 (TSP-5) (Borstein y Sage, 1994) y actúa como proteína transportadora de calcio (Chen *et al.*, 2000). Tiene gran similitud con la TSP-1, incluyendo una homología del 60% con el dominio de unión al calcio del extremo C-terminal de cada una de las 5 subunidades que componen la pentamérica molécula de la COMP, pero no muestran similitudes en la región N-terminal y además, la COMP no tiene afinidad cromatográfica con la heparina (Oldberg *et al.*, 1992). Diferentes estudios han mostrado que estas proteínas forman parte de una familia de proteínas homólogas junto a la TSP-2 (Bornstein *et al.*, 1991), TSP-3 (Vos *et al.*, 1992), y la TSP-4 (Lawler *et al.*, 1993).

Cada subunidad del homopentámero que constituye la COMP está constituida por una heptada repetida, que se estabiliza gracias a la presencia de puentes disulfuro. Contiene desde el extremo N-terminal al dominio globular C-terminal un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF-*like*) y un dominio similar a la calmodulina de unión al calcio (Vilím *et al.*, 2003). (Figura 7).

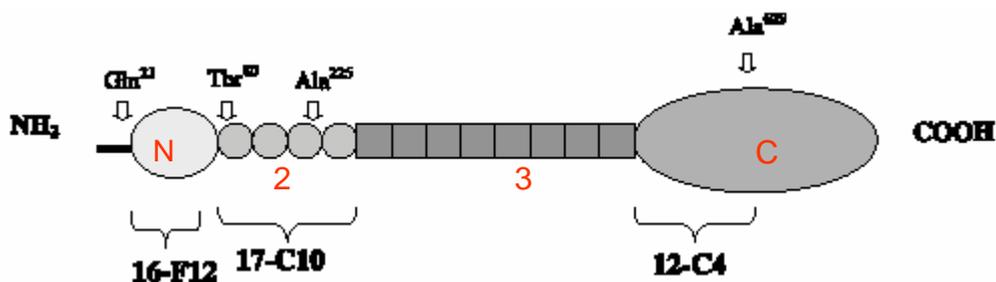


Figura 7. Esquema de la región C-terminal de COMP

La COMP es un homopentámero constituido por cinco subunidades idénticas, cada una de ellas consta de: (C) Un dominio globular carboxilo terminal. (3) Siete dominios de unión a calcio o repeticiones tipo 3. (2) Cuatro dominios de tipo EGF o repeticiones tipo 2. (N) La región N-terminal. (Tomado de Vilím *et al.*, 2003).

El estudio de cromosomas humanos en metafase mostró que el gen de la COMP está localizado en el hombre en la banda p13.1 del cromosoma 19 (Newton *et al.*, 1994).

3.2. Funciones que desempeña

La COMP es una proteína ácida que se concentra principalmente dentro de la matriz territorial del condrocito con capacidad para unirse al condrocito y a colágenos (Hedbom *et al.*, 1992; DiCesare *et al.*, 1994). Aunque inicialmente se pensaba que era exclusiva del cartílago hialino (Hedbom *et al.*, 1992), se ha descrito su presencia en cartílago traqueal y fibrocartílago meniscal (Fife, 1988; Neidhart *et al.*, 1997), humor vítreo del ojo (Nguyen y Fife, 1986), tendón y músculo liso arterial (Riessen *et al.*, 2001), discos intervertebrales, ligamentos cruzados, cartílago costal (Neidhart *et al.*, 1997), membrana sinovial (Di Cesare *et al.*, 1999); se ha relacionado con procesos de angiogénesis tumorales y se ha observado en tejido hepático cirrótico y en el carcinoma hepatocelular (Xiao *et al.*, 2004).

La COMP puede unirse a colágenos I, II, y IX; y procolágenos I y II a través de su dominio C-terminal, siendo esta unión dependiente de la presencia de zinc, lo que le permite unir entre sí fibras de colágeno (Rosenberg *et al.*, 1998; Thur *et al.*, 2001; Holden *et al.*, 2001). Desempeña una importante función en el ensamblaje de la matriz extracelular y en las interacciones proteicas matriz-matriz (Di Cesare *et al.*, 2002). Por otro lado, también interactúa con el condrocito (DiCesare *et al.*, 1994). Todos estos datos explican su importancia en el mantenimiento de la red tridimensional típica de la matriz extracelular del cartílago.

Además de la capacidad de unirse al calcio, también se ha comunicado la capacidad de la COMP para almacenar y liberar moléculas hidrofóbicas como la vitamina D, el retinol o el ácido retinoico (Guo *et al.*, 1998), tan importantes para la mineralización ósea y la reparación del cartílago.

Se ha comunicado el papel de esta proteína en el desarrollo de las extremidades en ratón, donde se detectó COMP en una etapa concreta de la osificación endondral (Franzen *et al.*, 1987) y después de la aparición en el esbozo del miembro del colágeno tipo II.

3.3. Empleo como marcador de enfermedad

Muchos han sido los trabajos que han tratado de utilizar la COMP como marcador de actividad o de evolución de enfermedades articulares como la artrosis, la artritis reumatoidea o el lupus eritematoso sistémico (Forslind *et al.*, 1992; Sharif *et al.*, 1995; Neidhart *et al.*, 1997; Petersson *et al.*, 1998^{a,b}; Di Cesare *et al.*, 1999; Otterness *et al.*, 2000; Vilím *et al.*, 2002; Wislowska y Jablonska, 2005, Gómez-Barrena *et al.*, 2006).

El proceso degenerativo articular provoca la liberación de fragmentos de las macromoléculas que constituyen dicha articulación al líquido articular, que son aclarados al suero y finalmente excretados por la orina. La determinación de estos fragmentos, llamados biomarcadores, podría ayudar en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad y a valorar la respuesta a determinados fármacos o terapias (Thonar *et al.*, 1993). La COMP constituye uno de estos biomarcadores, pero existe controversia en cuanto a la fiabilidad de esta proteína con respecto al grado de lesión articular (Fife *et*

al., 1991^b; Petersson *et al.*, 1998^a; Lohmander *et al.*, 1994). Los niveles de la COMP que se puedan medir no tienen porque proceder exclusivamente del cartílago articular y, además se ha observado que los niveles de la COMP pueden estar aumentados tras sufrir traumatismos articulares (Lohmander *et al.*, 1994).

Dada su asociación con algunas enfermedades genéticas, se ha propuesto como marcador para el cribaje de dichas enfermedades y para la ayuda a la hora de dar consejo genético en las familias con riesgo (Kennedy *et al.*, 2005).

3.4. Displasias esqueléticas y pseudocondroplasia: mutaciones en la COMP

La pseudocondroplasia es una displasia espónilo-epifiso-metafisaria que se caracteriza por talla baja desproporcionada, deformidad en los miembros inferiores, laxitud ligamentosa y artrosis precoz, que resulta de la mutación en el gen que codifica la COMP (Rimoin *et al.*, 1994; Stevens, 1999; Kennedy *et al.*, 2005). La displasia epifisaria múltiple presenta unas características fenotípicas similares a la pseudocondroplasia y aunque las formas más severas pueden deberse a mutaciones en el gen que codifica la COMP, es una enfermedad genéticamente heterogénea y las formas moderadas se deben a mutaciones en los genes que codifican el colágeno tipo IX y la matrilina-3 (Briggs y Chapman, 2002).

Se producen inclusiones lamelares en el retículo endoplásmico rugoso de los condrocitos del cartílago de crecimiento que conducen a cambios en la composición y en la estructura de la matriz extracelular y alteran la proliferación celular (Stevens, 1999). El normal crecimiento y desarrollo de los ratones modificados genéticamente para que no sinteticen la COMP, ratones *knockout*, demuestra que la mutación en la proteína y no su ausencia son la causa de estas osteocondrodisplasias.

La mutación que conduce a éstas patologías, se produce en el dominio tipo 3 de unión a calcio o en el dominio globular C-terminal de la molécula de la COMP (Stevens, 1999). La mutación D472Y de este dominio de la proteína, muestra dilatación de los retículos endoplásmicos rugosos por acúmulo de la COMP mutada y un mayor número de células apoptóticas (Hashimoto *et al.*, 2003).

Se ha comunicado que la COMP nativa posee un efecto anti apoptótico sin especificidad celular, sin embargo la forma mutada de la COMP encontrada en la pseudocondroplasia y en displasias epifisarias múltiples promueve la apoptosis (Gagarina *et al.*, 2005). Según estos datos, además de existir un ensamblaje alterado entre las moléculas de la matriz y con las células por una molécula de COMP mutada, en la pseudocondroplasia y en algunas displasias epifisarias múltiples se produce un aumento de muerte celular programada que contribuiría al desarrollo de la enfermedad.

Si la alteración de la COMP en estas patologías conduce a artrosis precoz, podemos pensar que esta molécula tiene un papel en el desarrollo de la artrosis. El estudio de los cambios de esta proteína en la artrosis en tejidos sometidos a un aumento de presión, como son los meniscos, sin que necesariamente signifique una pérdida del tejido como el encontrado en las zonas de cartílago con

lesiones osteocondrales, nos permitirá conocer la trascendencia de esa molécula en el establecimiento y desarrollo de la artrosis de rodilla.

A diferencia del cartílago hialino, los meniscos poseen cierta capacidad reparativa por lo que pueden tratar de regenerar las lesiones que sufren de forma más eficiente que el cartílago articular. Con este estudio se trata de rechazar la hipótesis nula que aboga porque los meniscos no tienen capacidad reparativa ni sufren cambios en su ultraestructura durante la artrosis. Para contrastar esta hipótesis se estudiará la evidencia que soporte las siguientes afirmaciones:

I. Las lesiones artrósicas iniciales estimulan la proliferación y el metabolismo celular, lo que se traducirá en un incremento en la actividad nuclear y citoplasmática y en el aumento en el número de células en las fases iniciales de la artrosis. En las fases finales la respuesta reparativa puede perderse, conduciendo a la destrucción definitiva del menisco, caracterizada por una población celular menor y con menor poder anabólico.

II. Los cambios en el tejido meniscal con la enfermedad artrósica también pueden afectar a la matriz extracelular. La agresión inicial puede provocar un aumento en la síntesis de las proteínas de la matriz que pasarían al espacio extracelular, aumentando la concentración normal de las mismas durante las primeras fases de la lesión. La pérdida de la capacidad anabólica celular por el deterioro del tejido debido a la enfermedad, puede provocar una menor concentración de las proteínas de matriz en las fases finales de la artrosis y por tanto un peor microambiente para el adecuado funcionamiento de las células, creándose así un círculo vicioso que devastará el tejido.

III. Al igual que con otras proteínas de matriz, se puede producir un aumento en la síntesis celular de la Proteína Oligomérica de la Matriz del Cartílago (COMP) en las fases iniciales de la artrosis. En las fases finales de la enfermedad, caracterizados por alteración de los mecanismos de reparación y degeneración del menisco, puede disminuir la concentración de COMP en la matriz y alrededor de las células meniscales.

Numerosos estudios han valorado los cambios en el cartílago hialino en la artrosis de rodilla. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre los cambios que acontecen en los meniscos, tanto en fases iniciales de gonartrosis como en fases avanzadas.

IA. Uno de los objetivos de esta tesis es estudiar la **distribución celular en meniscos normales y los cambios** que se producen tanto **en** fases iniciales de **artrosis** de rodilla como una vez establecida la enfermedad. Para ello se valorarán meniscos procedentes de pacientes con artrosis evolucionada que se someterán a una cirugía de prótesis total de rodilla y tejidos meniscales de pacientes con una rotura meniscal subaguda. Al no poder realizar un estudio secuencial de los cambios en los meniscos en artrosis humana, y para tratar de comprender si las diferencias existentes entre los tejidos meniscales procedentes de meniscectomía y los procedentes de rodillas artrósicas se corresponden con estadios precoces y tardíos de la artrosis normal de rodilla, se diseñó un modelo secuencial, con poca variabilidad y predecible de artrosis en conejos por sección del LCA. Se comprobará la relación causa-efecto de la inestabilidad de la rodilla de los conejos valorando lesiones macroscópicas en cartílagos y meniscos de las rodillas operadas.

IB. Para estudiar la **capacidad proliferativa celular** de los meniscos en fases iniciales de artrosis y la pérdida de dicha capacidad en artrosis evolucionada, se valorará:

- El número total de células en los tejidos meniscales sanos, con lesiones iniciales y con lesiones avanzadas.
- La tinción positiva de las muestras meniscales al teñirlas con marcadores de proliferación celular como Ki-67, que tiñe positivamente células en división celular
- El aumento de células apoptóticas en tejidos procedentes de pacientes con gonartrosis evolucionada o de rodillas de conejo tras sección del LCA.

II. Estudiar la matriz extracelular de los meniscos y sus cambios con la artrosis. Para realizar este objetivo se medirán los cambios en la concentración de **proteoglicanos** y COMP. Se valorará de forma semicuantitativa la cantidad de los mismos con técnicas específicas.

III. Debido a que la importancia de la **COMP** en el tejido meniscal no ha sido determinada, como último objetivo de esta tesis se pretende conocer la **distribución** de esta proteína **y** valorar sus **modificaciones en distintos estadios de la artrosis de rodilla**. Para valorar el aumento en el **metabolismo celular** y, confirmar la hipótesis de que la **COMP** posee un papel fundamental en el **mantenimiento de la red tridimensional** que caracteriza a los meniscos, se valorará si se produce aumento de síntesis de la COMP en los estadios iniciales de lesión, que vendría determinado por un aumento en el número de células teñidas por un anticuerpo frente a la COMP; si en fases algo más

avanzadas existe una mayor tinción de la matriz extracelular por el anticuerpo frente a la COMP, y si en fases finales de la artrosis se aprecia una disminución de tinción frente a este anticuerpo, lo que revelaría una pérdida de la arquitectura normal del menisco.

1. GRUPO DE PACIENTES CON GONARTROSIS AVANZADA

1.1. Selección de los enfermos

Se incluyeron en el estudio pacientes de ambos sexos que presentaban criterios de gonartrosis según el *American Collage of Rheumatology* (Hochberg *et al.*, 1995) y que estaban pendientes de cirugía mediante artroplastia total de rodilla.

Los pacientes firmaron un consentimiento informado, conforme a la legislación vigente, antes de la operación para el estudio de las muestras extraídas durante la cirugía de recambio articular.

1.2. Criterios de inclusión

Pacientes mayores de 40 años de ambos sexos, que presentaban dolor en la rodilla de al menos 6 meses, con signos radiográficos de osteofitosis, rigidez matutina de menos de 30 minutos y crepitación con el movimiento de dicha rodilla, que estaban pendientes de la realización de una cirugía de prótesis total de rodilla (PTR) y que habían firmado el consentimiento informado para la obtención y estudio del tejido meniscal resecado durante la cirugía de recambio articular.

1.3. Criterios de exclusión

No se incluyó en el grupo de estudio pacientes que no cumpliesen todos los criterios de inclusión ni aquellos en los que el estudio radiográfico mostrará una alteración de ejes de los miembros inferiores significativa (varo de rodillas mayor o igual a 15°, recurvatum mayor de 5°) o desviación en valgo de las rodillas.

1.4. Población a estudio

Se incluyeron en el estudio un total de 31 pacientes diagnosticados de gonartrosis y pendientes de intervención quirúrgica de artroplastia total de rodilla. La edad media de los mismos fue de 72 años (DE=6,7 y rango de 60-84). Veintitrés pacientes fueron mujeres (74%) y 8 hombres (26%).

1.5. Obtención de las muestras

A todos los pacientes se les intervino con anestesia locorregional, aunque en alguna ocasión se añadió anestesia general. Para llevar a cabo la cirugía se empleó un manguito de isquemia en el muslo y una incisión pararrotuliana medial. Tras la luxación externa de la rótula se comprobó el grado de artrosis avanzada y se procedió a la extracción del menisco del compartimento interno (Figura 8).

Este menisco interno se sumergió inmediatamente en paraformaldehído al 4% en PBS para su fijación. A las 24 horas de la obtención del tejido, los meniscos fueron deshidratados cambiándolos a etanol al 70%, donde permanecieron hasta su inclusión en parafina.

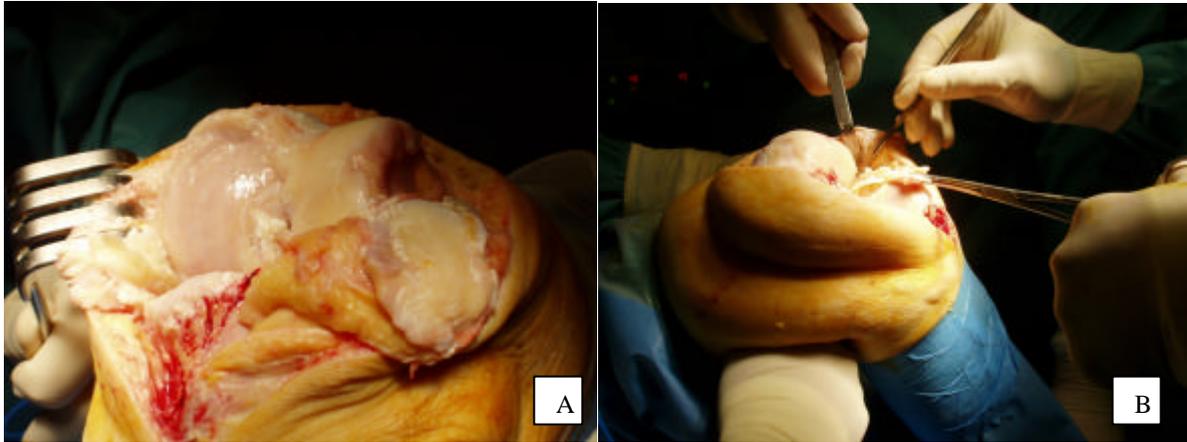


Figura 8. (A) Goniartrosis izquierda de una rodilla con una deformidad en varo, donde se observa una mayor afectación del compartimento femorotibial medial. Se puede apreciar una ausencia casi absoluta de cartilago en el cóndilo femoral interno y un cartilago amarillento en el externo. (B) Extracción de los meniscos en las cirugías de PTR

2. GRUPO DE PACIENTES SIN GONARTROSIS

2.1. Selección de los enfermos

Para poder tener un grupo control que permitiera conocer la estructura meniscal antes del deterioro producido por la artrosis avanzada, se incluyeron en el estudio muestras de meniscectomía parcial artroscópica de pacientes jóvenes, considerando como tales los menores de 50 años. La rotura meniscal debía haberse producido de manera traumática y los pacientes haber sido intervenidos en un plazo máximo de 3 meses desde la lesión. Todos los pacientes debían tener una RMN de la rodilla lesionada con diagnóstico de rotura del cuerno posterior del menisco interno y sin afectación aparente del cartilago articular, más allá de una leve condromalacia rotuliana, ni lesiones ligamentosas.

2.2. Población a estudio

Aceptaron que los fragmentos meniscales extraídos en la cirugía artroscópica fuesen estudiados, para los fines de esta investigación mediante firma de consentimiento informado, 5 pacientes de 33,4 años de edad media (DE=8,3 y rango de 26-47) que habían sufrido una rotura meniscal traumática y a los que se les intervino en un plazo máximo de 3 meses desde la lesión. Todos ellos eran varones y se habían lesionado practicando deporte (3 jugando al fútbol, 1 saltando mientas

corría y otro jugando al baloncesto). A todos se les había realizado una RMN y diagnosticado de rotura del menisco interno sin afectación aparente del cartílago articular.

2.3. Obtención de las muestras

Bajo anestesia espinal y un manguito de isquemia en el muslo de la rodilla lesionada, se practicó una artroscopia de rodilla empleando los portales estándar antero externo y antero interno.

Ninguna rodilla presentó lesiones condrales y todas las lesiones meniscales correspondieron a roturas del cuerno posterior del menisco interno (Figura 9). Las muestras de las meniscectomías parciales se introdujeron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS para su fijación. A las 24 horas de la obtención del tejido, los meniscos fueron deshidratados cambiándolos a etanol al 70%, donde permanecieron hasta su inclusión en parafina.

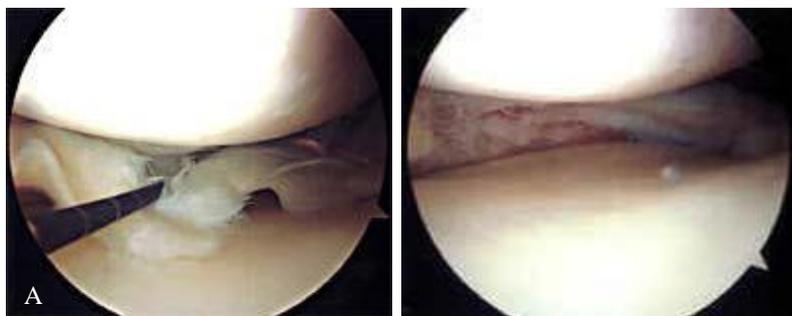


Figura 9. Rotura meniscal en paciente joven

(A) Se observa una rotura meniscal en el cuerno posterior del menisco interno de una rodilla izquierda. El cartílago articular no se encuentra dañado. (B) Resección de la zona lesionada del menisco.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL MODELO ANIMAL DE GONARTROSIS

3.1 Modelo de artrosis en conejos por inestabilidad

El modelo experimental de artrosis de rodilla por inestabilidad se llevó a cabo en 10 conejos blancos de Nueva Zelanda, machos y esqueléticamente maduros, que habían sido obtenidos de B&K Universal (Pamplona, España). Tras dos semanas de aclimatación en sus jaulas con agua y comida *ad libitum*, los animales fueron intervenidos mediante sección del ligamento cruzado anterior (LCA) de la rodilla derecha para crear un modelo de artrosis secundario a inestabilidad (Yoshioka *et al.*, 1996).

Los experimentos en animales se llevaron a cabo con la aprobación del comité de ética de experimentación animal local y de acuerdo con la legislación nacional para el uso de animales de laboratorio, intentando en todo momento minimizar el sufrimiento de los animales y el número de animales a estudio.

Con el fin de observar diferencias entre lesiones precoces y avanzadas, los animales fueron divididos en dos grupos de 5 conejos cada uno. En el primero de los dos grupos los conejos fueron sacrificados a las 4 semanas de la sección del LCA. En el segundo grupo, los conejos no se sacrificaron hasta las 12 semanas de la cirugía (Figura 10).

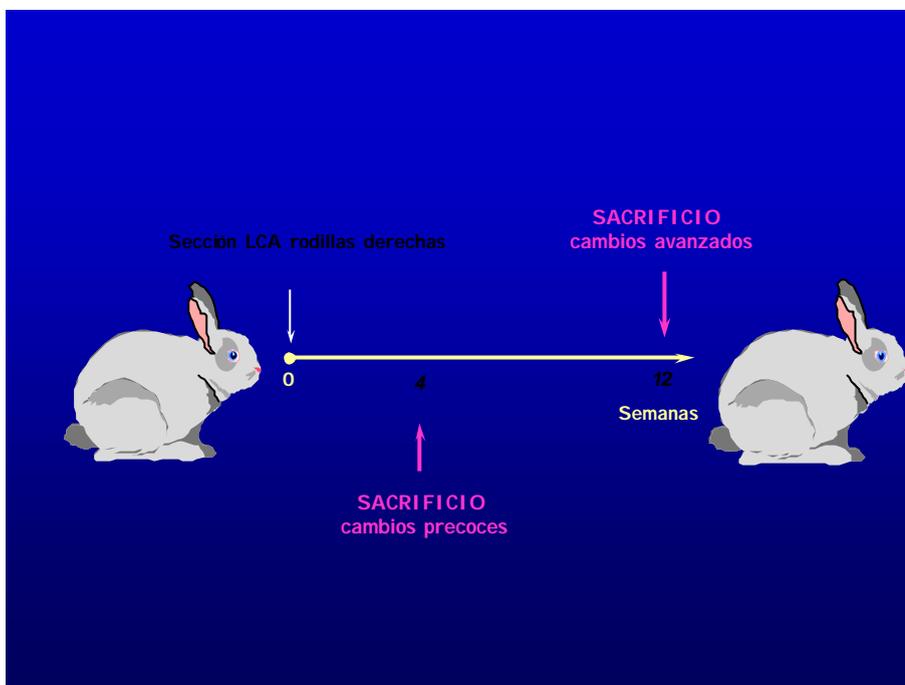


Figura 10. Modelo de artrosis por de sección del LCA en conejos

Cinco conejos fueron sacrificados a las 4 semanas de la sección del LCA la rodilla derecha y otros 5, a las 12 semanas. Las rodillas izquierdas sirvieron como control.

Los conejos fueron intervenidos bajo anestesia general mediante administración intramuscular de 0.5 ml/kg de xilazina (Rompum®, Bayer, Leverkusen, Alemania) y 1.5 ml/kg de hidrocloreuro de ketamina (Ketolar®, Parke-Davis, Madrid, España). Se realizó profilaxis antibiótica con 500 mg de cefazolina (Normon, Madrid, España) intramuscular, antes de la cirugía y durante los 2 días posteriores a la misma. Además, a cada conejo se le administro desde la cirugía y durante 48 horas más, 1 ml de ketorolaco (Droal®, Vita, Barcelona, España) intramuscular al día.

Tras rasurado y esterilización de la rodilla derecha de cada uno de los conejos con una solución de povidona yodada, y en condiciones de asepsia habituales, se efectuó un abordaje parapatelar medial, se evirtió la rótula, se aisló el LCA con un gancho romo y se seccionó con un bisturí con hoja del número 15, teniendo mucho cuidado de no dañar los meniscos ni el cartilago articular. La herida quirúrgica se cerró por planos y no se empleó ningún tipo de vendaje o inmovilización. La rodilla contralateral se utilizó como control (rodillas izquierdas sanas) (Figura 11).

Los conejos permanecieron en sus jaulas de 60x60x40 cm tras la cirugía, sin restricción alguna de movimientos, y dispusieron de agua y comida *ad libitum* hasta que fueron sacrificados.

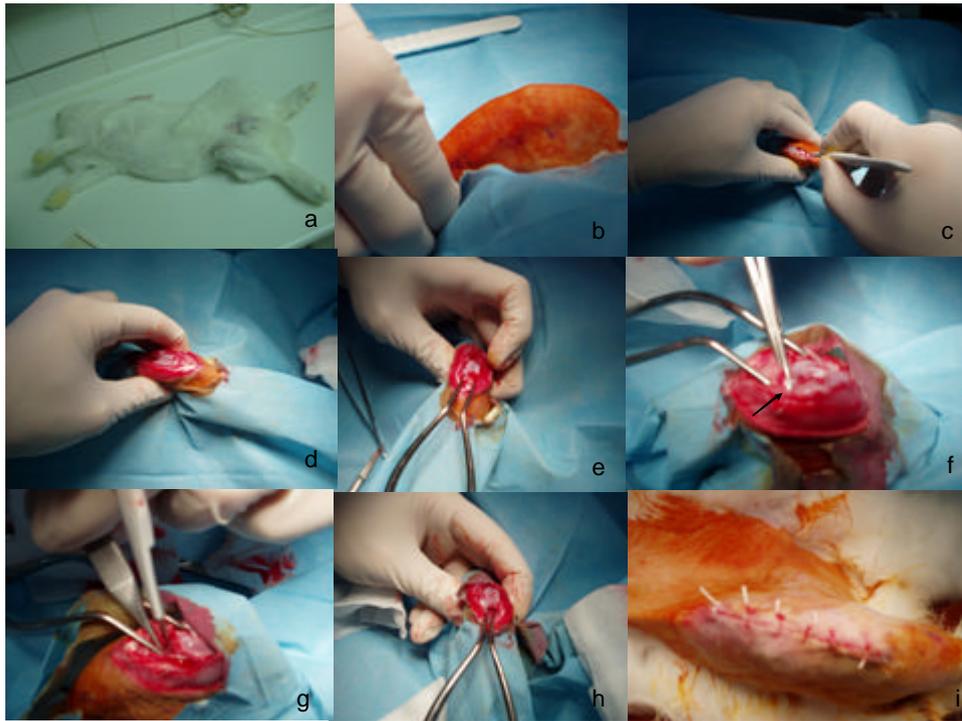


Figura 11. Cirugía de sección del LCA en conejos. (a) Los conejos fueron intervenidos bajo anestesia general. (b) Rasurado y esterilización de la rodilla derecha de uno de los conejos con una solución de povidona yodada. (c) Incisión parapatelar medial y (d) se evierte la rótula hacia externo. (e) Se identifica el LCA, (f) se aísla (flecha) (g) y se secciona con un bisturí (h) Se comprueba la sección completa del LCA. (i) Cierre de la herida quirúrgica por planos.

3.2 Sacrificio de los conejos y procesamiento de los meniscos

La eutanasia se realizó por inyección intracardiaca de 50 mg/kg de tiobarbital (Braun Medical, Barcelona, España) tras la sedación de los animales con 0.5 ml/kg de xilazina intramuscular (Rompum®, Bayer, Leverkusen, Alemania). Antes de la obtención de las muestras, y con el animal ya muerto, se comprobó la inestabilidad anteroposterior de todas las rodillas a las que se les había seccionado el LCA, mediante prueba de cajón anterior, así como la estabilidad de todas las rodillas izquierdas que no habían sido intervenidas.

Las dos rodillas fueron cuidadosamente disecadas para evitar dañar tanto los meniscos como el cartílago articular. Se observó el estado del cartílago articular de tibia y fémur en ambas rodillas tanto para compartimentos internos como externos. También se valoró el grado de daño meniscal, así como el tipo de rotura. Se anotó el grado de lesión en cada zona y se tomaron fotografías (Olympus C-50, Tokio, Japón). Los meniscos fueron introducidos en paraformaldehído al 4% en PBS y a las 24 horas fueron deshidratados cambiándolos a etanol al 70%, donde permanecieron hasta su inclusión en parafina.

4. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

4.1 Análisis morfológico

En las muestras de meniscos humanos se realizaron cortes coronales del cuerno posterior de cada menisco con un bisturí del número 22. Cada fragmento meniscal se introdujo en un *cassette* marcado con un número de identificación que se le había asignado al paciente al que pertenecía. Los meniscos de los conejos se introdujeron completos, marcando así mismo el *cassette* con un número que identificaba al animal, si correspondía a la rodilla operada o a la sana y si se trataba del menisco interno o del externo (Figura 12). Las muestras así preparadas se incluyeron en parafina

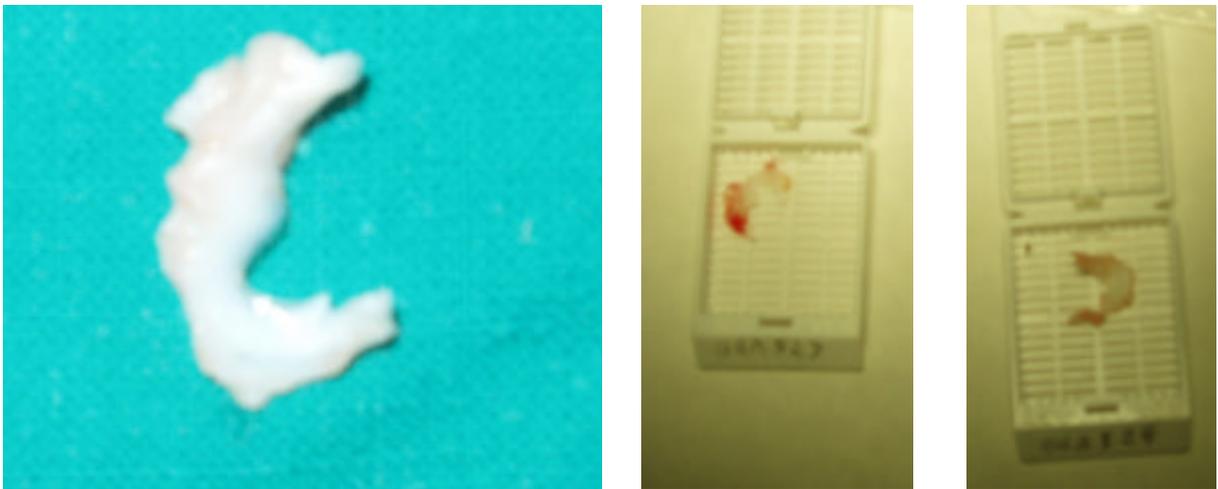


Figura 12. Extracción de muestras y colocación de las mismas en *cassettes* marcados para su identificación.

Las piezas se cortaron con microtomo de rotación en secciones de 3 μm de grosor. Los cortes se suspendieron en un baño de flotación y se recogieron en cristales para tinción de hematoxilina y eosina. Se valoró no sólo la celularidad de las muestras, sino también la distribución y forma de las células en las distintas regiones meniscales (zona roja, zona roja-blanca y zona blanca) siempre que hubo tejido suficiente de todo el menisco, la presencia de degeneración mixoide, depósitos cálcicos (confirmados mediante tinción de Von Kossa) o la formación de nidos celulares. También se realizaron tinciones de todas las muestras con azul alcian a pH 2,5 que detecta principalmente los glicosaminoglicanos sulfatados, es decir, la mayoría de los proteoglicanos a excepción del ácido hialurónico, contratiñendo con rojo nuclear.

4.2. Purificación de COMP y obtención de anticuerpos

Se purificó COMP de 150 g de tendón bovino de acuerdo con Hauser *et al.* (Hauser *et al.*, 1995) con pequeñas modificaciones (Herrero-Beaumont *et al.*, 2001). La proteína se purificó mediante cromatografía en tres pasos usando DEAE-Sefarosa Fast Flow, Sefarosa CL-4B y Mono Q 5/5 FPLC (Sánchez-Corra *et al.*, 1989). Después del paso por Mono Q, la proteína era virtualmente pura. Para purificar más aún la COMP, las trombospondinas se extrajeron por afinidad cromatográfica en columnas de heparina con Sefarosa CL-6B. Las diferentes fracciones de las cromatografías fueron recogidas y analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico (Laemmli UK, 1980). Sólo se obtuvo una banda de 116 kDa. Esta banda fue transferida por membranas de PVDF (polivinylidene fluoride) y su secuencia N-terminal determinada (Applied Biosystem) en secuenciador en fase de gas para verificar la identidad de la proteína. La secuencia obtenida fue Gly-Glu-Met-Pro-Leu-Gly-Gly-Asp, la cual es homóloga en un 98% con la COMP humana. En total se obtuvieron 15 mg de proteína.

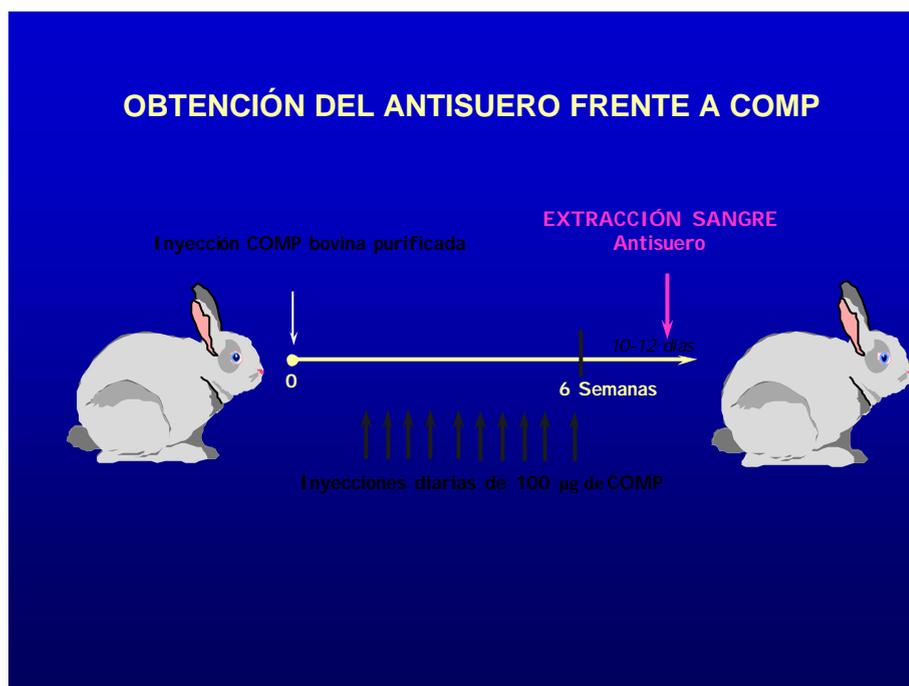


Figura 13. Obtención del anticuerpo frente a COMP

La COMP bovina purificada fue usada como antígeno para inmunizar conejos blancos de Nueva Zelanda para producir un antisuero policlonal anti-COMP. A los conejos se les inyectó 0.5 ml del antisuero, que contenían 100 µg de COMP en adyuvante completo de Freund, intramuscularmente una vez al día durante 6 semanas. A los conejos se les extrajo sangre de 10 a 12 días más tarde (Vivanco-Martínez *et al.*, 1980). La fracción de inmunoglobulina fue purificada mediante

precipitación y las trazas de reacción cruzada frente a fibronectina, se eliminaron pasando el antisuero a través de una columna de fibronectina-sefarosa. (Figura 13).

4.3. Inmunohistoquímica

4.3.1. Inmunohistoquímica para detección de COMP

Los tejidos meniscales que habían sido incluidos en parafina, se cortaron en secciones de 3 μm de grosor y se montaron sobre cristales con carga positiva (Slides 72 μm de Dako®) Fueron desparafinados y rehidratados pasando por xilol y concentraciones decrecientes de etanol, hasta llegar a agua destilada.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó en un Autostainer Plus Dako® (Carpintería, EEUU) con el sistema de detección para inmunohistoquímica Dako® REAL™ EnVision™ Detection System usando como antisuero secundario Rabbit/Mouse (Glostrup, Dinamarca) código K5007 y revelando en color marrón con Peroxidase/DAB+.

Siguiendo las instrucciones del manual para inmutinción automatizada de Dako®, las muestras se dejaron en un *buffer* de lavado de TBS a PH 7.6 más Tween 20. Se realizó la recuperación antigénica con la enzima condroitinasa (40mU/ml) durante 40 minutos y después, se lavaron los tejidos con el *buffer* de lavado. A continuación, se inactivó la actividad peroxidasa endógena mediante tratamiento con 3% H_2O_2 : metanol (1:1) durante 5 minutos. Para bloquear las inmunoglobulinas que pudieran dar falsos positivos, se bloqueó con Fetal Bovine Serum (Australia, USDA Approved, Euro-lone) durante 30 minutos y tras este paso, sin lavar las muestras, se bloqueó con *Buffer 1* (Kit *Buffer* de Dako®, ref. K5007) durante 10 minutos, y a continuación se lavaron las muestras con el *buffer* de lavado (TBS + Tween 20 a pH 7,6). Seguidamente, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario de anti-COMP de conejo que se había obtenido a partir del tendón bovino (apartado 4.2.), durante 40 minutos en una dilución de 1:100 con PBS con azida, y se lavaron con el *buffer* de lavado. Después se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario: Envision Polylink Rabbit/Mouse (Dako® Cytomation). Tras 30 minutos con el anticuerpos secundario, las muestras se revelaron utilizando 3, 3'-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB; Dako® Corp, Carpintería, EEUU) como cromógeno, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, los tejidos se contrastaron con hematoxilina (Dako®), se deshidrataron hasta llegar a xilol y se montaron con montaje permanente (Pertex® HistoLab®), con cubre objetos de 24x50 mm (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania).

Para descartar la existencia de tinción no específica, se realizó un control negativo de cada muestra omitiendo el anticuerpo primario (Figura 14).

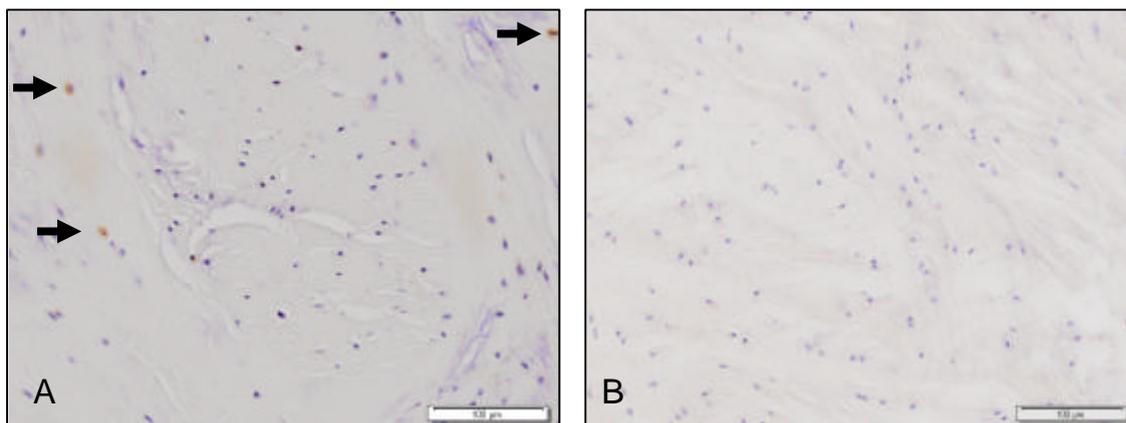


Figura 14. Especificidad del anticuerpo frente a COMP. (A) Corte histológico que corresponde a un menisco artroscópico humano inmunoteñido para valorar COMP. En marrón se observan células positivas para la inmunotinción (flechas) (B) Misma técnica de tinción que en (a) omitiendo el anticuerpo primario.

4.3.2. Inmunohistoquímica para detección de Ki67

Los tejidos meniscales incluidos en parafina se cortaron en secciones de 3 μm de grosor y se montaron sobre cristales con carga positiva (Slides 72 μm de Dako®) al igual que para la inmunotinción para la COMP. Utilizamos como controles positivos para las muestras de humano y conejo, amígdala humana y bazo de conejo, respectivamente.

Los cortes histológicos fueron desparafinados en estufa de aire a 55 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Los tejidos se aclararon y deshidrataron de forma gradual: 10 minutos en xilol en dos ocasiones; dos veces durante 5 minutos en etanol al 100%; dos veces durante 5 minutos en etanol al 96%; dos veces durante 5 minutos en etanol al 70% y 5 minutos en agua destilada.

La recuperación antigénica se realizó mediante calor:

A) Para humanos, en olla Express (WMF perfect) durante 2 minutos cuando se alcanzó la presión máxima, apagando el foco de calor. Se tamponó con citrato sódico a pH 6,5 (Dako®).

B) Para conejos, en estufa a 50 $^{\circ}\text{C}$ toda la noche y a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos antes de sacar los tejidos de la estufa. Las muestras se tamponaron con EDTA a pH 8,0 (PT Module™ buffer 2. Lab Vision Corp, Fremont, CA, EEUU) durante 12 horas a temperatura ambiente.

Las muestras se lavaron abundantemente y para permeabilizarlas, se pasaron a un *buffer* de lavado (TBS a pH 7,6 más Tween 20). Posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena en 0,3% de agua oxigenada en metanol durante 5 minutos y luego se lavó con *buffer*.

Los cortes histológicos fueron incubados durante 20 minutos con suero de caballo (Vectastain® Elite ABC kit Mouse IgG. Vectorlabs, Burlingame, CA. Código de referencia: PK-6102). Se eliminó el exceso de suero y se lavó con *buffer*.

Como anticuerpo primario para la inmunotinción de Ki67 se utilizó un monoclonal de ratón de Dako®, el clon MIB-1 (M7240), a una dilución 1/100 durante 40 minutos. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las muestras se lavaron con *buffer* y se incubaron durante 30 minutos con

Vectastain® Elite ABC kit Mouse IgG. El cromógeno utilizado fue el DAB+ de Dako®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó una contratinción con hematoxilina y luego las muestras se deshidrataron progresivamente en alcoholes crecientes y finalmente en xilol.

4.3.3. Detección de apoptosis (TUNEL)

Tras el corte y deshidratación de los tejidos, éstos fueron incubados en cámara húmeda en un Hibridizer StatPin (Dako®). El sistema de detección de la apoptosis fue el ApopTag® de Chemicon (Temecula, CA, referencia S7100).

La permeabilización de los tejidos se consiguió con proteinasa K. Se añadieron 100 µl (20 µl/ml) a cada porta, se cubrieron con un cubreobjetos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Tras el lavado con agua destilada durante dos minutos, se inactivó la peroxidasa endógena con 0,3% de agua oxigenada en metanol durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron los tejidos con PBS durante 5 minutos. Después se añadieron 75 µl del *buffer* de equilibrio a cada porta, se cubrieron con un cubreobjetos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Sin lavar, se secó con cuidado y se añadieron 100 µl de la enzima TdT (30 µl de TdT en 70 µl de *buffer* de reacción), se tapó con un cubreobjetos y se incubó durante una hora a 37°C en el Hibridizer. Tras este tiempo se añadió a los tejidos el *stop buffer*: 2 ml del *stop/wash buffer* + 68 ml de agua destilada en jarra “Coplin” durante 10 minutos a temperatura ambiente. Más tarde se lavaron las muestras en PBS durante un minuto, tres veces.

Para la detección se añadieron 50 µl de anti-digoxigenina conjugada con peroxidasa en los tejidos y se taparon con un cubreobjetos durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en 4 ocasiones con PBS durante 2 minutos y se añadió DAB 3 minutos.

Las muestras inmunoteñidas se lavaron con agua destilada y se contratiñeron con hematoxilina. Después las muestras se deshidrataron progresivamente en alcoholes crecientes y finalmente en xilol. Por último se realizó un montaje permanente de la muestra, con un cubre objetos de 40 mm y Pertex® HistoLab.

4.4. Valoración y cuantificación

Para el estudio histológico se empleó un microscopio Zeiss AX10 (Oberkochen, Alemania) que permitió magnificar la imagen desde 12.5 hasta 630 veces. Se fotografiaron todas las muestras, así como las zonas más significativas, empleando una cámara AxioCam HRc (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

La valoración de los tejidos fue realizada por dos observadores que no conocían la procedencia del tejido a valorar. Uno de ellos, un patólogo con experiencia en patología articular, había dado previamente instrucciones específicas y había entrenado al otro observador para el estudio de los diferentes parámetros en cada corte histológico. Los valores para cada muestra se obtuvieron de las medias que para cada una de ellas había obtenido cada uno de los observadores. En caso de falta de consenso para alguna muestra (entendido como una diferencia en el número de células contadas por campo de gran aumento mayor de un 5% o no concordancia en las medidas cualitativas) se repitieron las valoraciones conjuntamente para dichas muestras, consiguiendo así un acuerdo absoluto a la hora de la valoración de los tejidos.

En cada corte histológico se analizó el número de células por campo de gran aumento (media del número de células de 10 campos contiguos de gran aumento; 40x: 400 aumentos) en cada una de las tres zonas meniscales (roja, blanca-roja y blanca) siempre que estuvieran conservado todo el tejido meniscal, y el porcentaje de células inmunoreactivas frente al anticuerpo para la COMP del total de células. Así mismo, se valoró la presencia de calcio mediante tinción de Von Kossa, la degeneración mixoide o la presencia de nidos celulares.

La intensidad de tinción de la matriz extracelular con anticuerpo frente a la COMP se valoró de forma semicuantitativa (ausencia de inmunotinción: 0 puntos; inmunotinción leve: 1 punto; moderada: 2 puntos; e intensa: 3 puntos). Se calculó la media de 10 campos de gran aumento contiguos para este parámetro. (Figura 15).

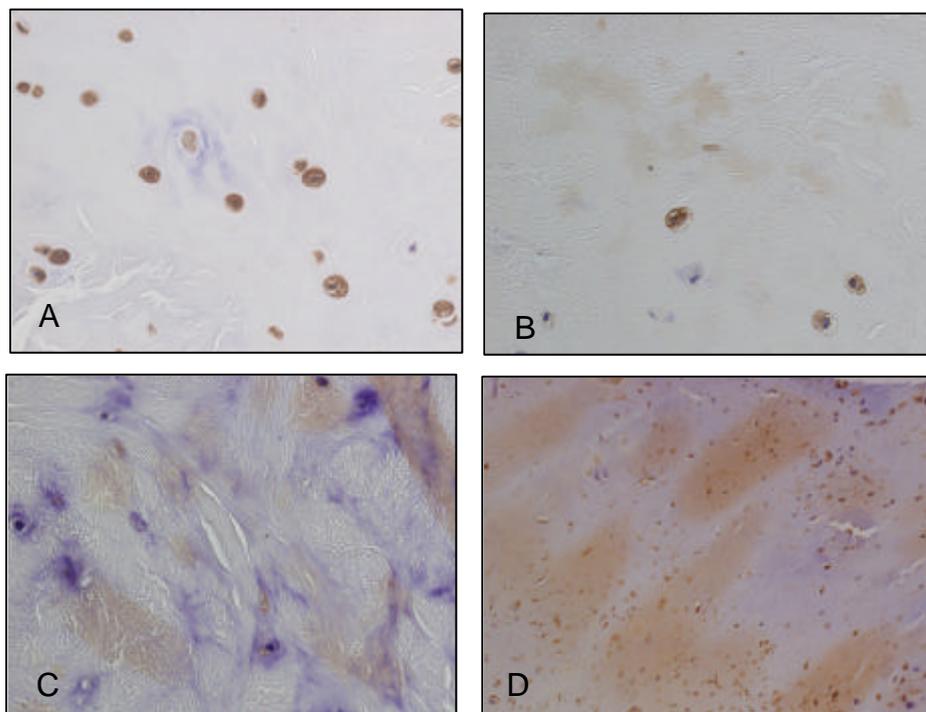


Figura 15. Intensidad de tinción de matriz frente a COMP.

(A) Ausencia de inmunotinción: 0 puntos. (B) Inmunotinción leve: 1 punto. (C) Moderada: 2 puntos. (D) Intensa: 3 puntos.

Para el estudio de los proteoglicanos de la matriz se valoró la tinción de todo el tejido del corte histológico con azul alcian de forma semicuantitativa (ausencia de tinción azul: 0 puntos; poco teñida: 1 punto; bastante teñida: 2 puntos; y muy teñida: 3 puntos). (Figura 16).

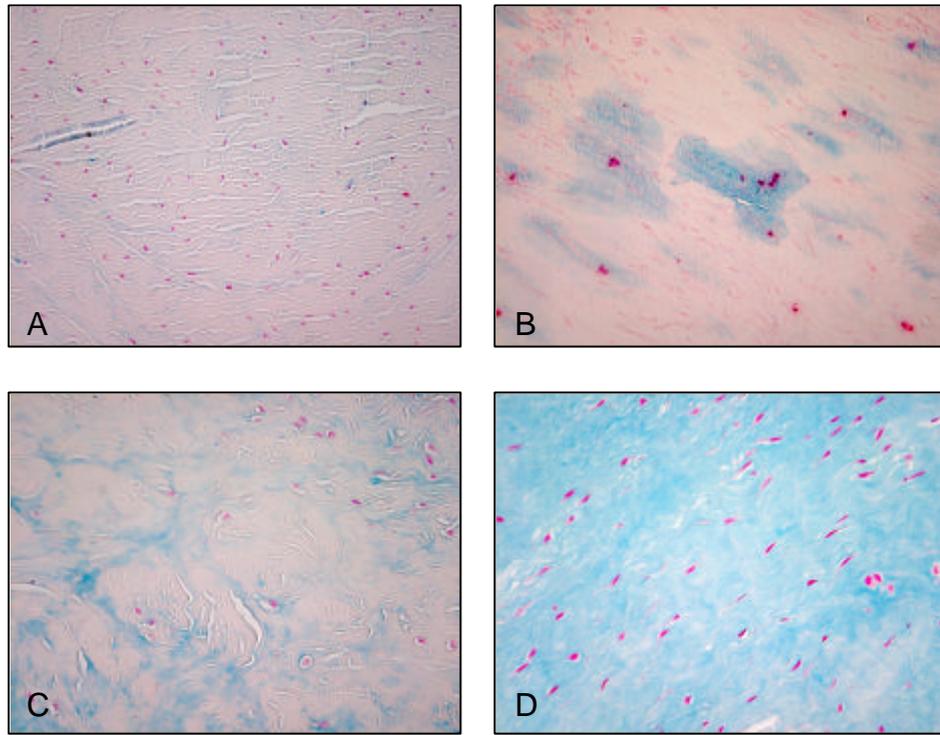


Figura 16. Intensidad de tinción para proteoglicanos con azul alcian.

(A) Ausencia de tinción azul: 0 puntos. (B) Poco teñida: 1 punto. (C) Bastante teñida: 2 puntos. (D) Muy teñida: 3 puntos.

La valoración de células en ciclo celular se realizó con el anticuerpo frente a Ki67, que tiñe positivamente células en división celular (desde G1 a fase M, pero no en G0). La valoración se realizó contando el número de células positivas frente al antígeno nuclear Ki67 en la totalidad de cada muestra, dado el escaso número de células positivas en los tejidos y la distribución heterogénea de las mismas. (Figura 17).

Para cuantificar la muerte celular, se consideró positivo aquel corte histológico en el que se identificara la presencia de células inmunoreactivas con la técnica de TUNEL y que además tuvieran rasgos histológicos típicos de apoptosis (como la condensación de la cromatina o la presencia de cuerpos apoptóticos). (Figura 18).

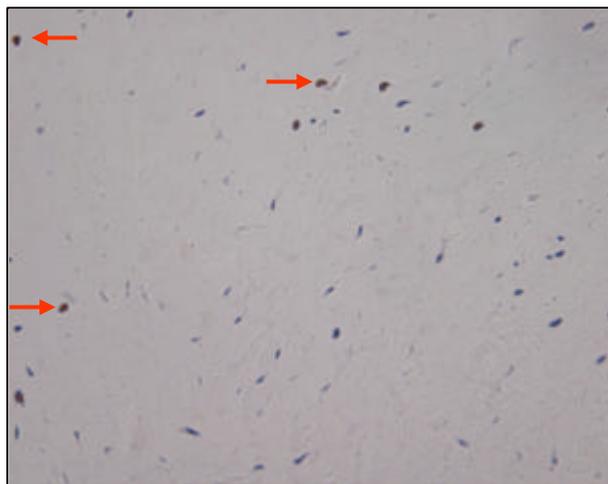


Figura 17. Tinción con Ki67.

Corte histológico correspondiente a un menisco humano procedente de menisectomía parcial por rotura meniscal. Se observan células Ki-67 positivas (flechas rojas)

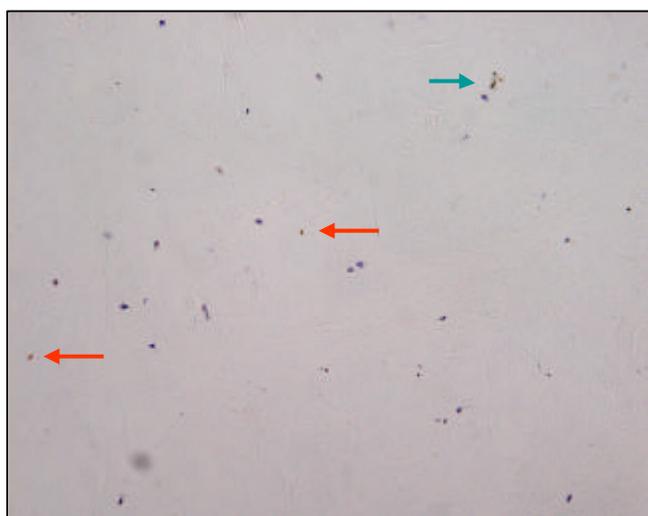


Figura 18. Tinción mediante técnica de TUNEL.

Corte histológico correspondiente a un menisco artrósico humano. Células en apoptosis (flechas rojas) y cuerpo apoptótico (flechas verde)

5. ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

5.1. Hibridación “in situ”

5.1.1. Extracción de RNA

El RNA total se extrajo de condrocitos humanos en cultivo sin estimular, procedentes de cartílago femoral de pacientes intervenidos de artroplastia total de rodilla, mediante el método del Trizol (Life Technologies). La cuantificación del RNA se realizó por medida de absorbancia de las

muestras a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/ml de RNA. Se comprobó que la relación entre la absorbancia 260 y 280 nm era cercana a 2, indicando la ausencia de contaminación proteica.

5.1.2. Diseño de los cebadores y ensayo de RT-PCR (transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa)

El RNA se transcribió a cDNA, y éste se sometió a sucesivos ciclos de amplificación en presencia de [α - 32 P] dCTP (3000Ci/mmol; Amersham), siguiendo las instrucciones de un sistema comercial (Access RT-PCR System kit; Promega, Madison, WI, EEUU). Este método permite la presencia en el mismo tampón de las dos enzimas envueltas en dichos procesos, la transcriptasa inversa del virus *Myeloblastis* de aves y la DNA polimerasa termoestable de *Thermus flavus*.

Cada ciclo de amplificación consistió en 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineamiento a una temperatura de 59°C, y 2 minutos de extensión a 68°C. El número óptimo de ciclos fue de 35 y se eligió basándose en experimentos iniciales en los que se estableció el rango lineal de la reacción. Los cebadores fueron diseñados de acuerdo con la secuencia génica de la COMP humana encontrada en la base de datos *GenBank*, teniendo especial cuidado en que dichos cebadores no hibridasen con otras trombospondinas humanas. Las condiciones óptimas de alineamiento, así como las secuencias de los cebadores se detallan en la tabla 1.

Cebadores	sentido antisentido	Tamaño del inserto	Cond. amplificación	
			Tª alineamiento	nº ciclos
(S)	5'- AACGACGACCAAAAGGACAC-3'	372 pb	59°C	35
(as)	5'- GTCAGGGACTCCGTCATTGT-3'			

Tabla 1. Secuencias de los cebadores y condiciones de amplificación.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de 4% urea-poliacrilamida y se autorradiografiaron. Se obtuvo una banda de 372 pb.

5.1.3. Generación de la ribosonda

El producto de la transcripción inversa de la COMP amplificados por PCR (apartado 5.1.2.; figura 19), se aislaron de en un gel de agarosa al 1.2% y se purificó para su posrterior clonado en el vector PGEM[®] T- Easy, por ligación con la DNA ligasa del fago F1 durante 16 h a 14°C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PGEM[®] T-Easy vector system; Promega, Madison, WI, EEUU). El vector utilizado presenta el gen de resistencia a ampicilina como marcador para la selección de las bacterias transformantes, y dispone además del gen que codifica galactosidasa (Lac Z), el cual contiene un adaptador de policlonaje con secuencias diana para diferentes enzimas de restricción. Gracias a estas características, el método permite distinguir las bacterias recombinantes (blancas) de aquellas que no lo son (azules). Las bacterias competentes se transformaron por choque térmico y se sembraron en placas agar-Luria Bertani (15 g/l agar; 5 mg/l extracto de levadura; 10 mg/l bactotripton; 10 mg/l NaCl, pH 7.0) suplementadas con 100 µg/ml ampicilina, 0.05% 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β galactosa (X-Gal) y 0.1 M IPTG, durante toda una noche a 37°C. Como controles negativos de la técnica, se sembraron en placas diferentes tanto bacterias no transformadas como bacterias transformadas no recombinantes (con el vector sin inserto). Las colonias así obtenidas se hicieron crecer en medio Luria Bertani en agitación y se aisló el vector-inserto (Wizard[®] Minipreps DNA purification system; PromegaMadison, WI, EEUU).

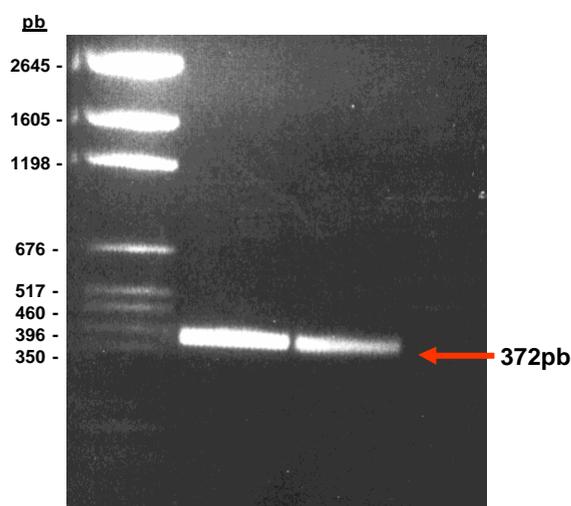


Figura 19. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa.

Se observan dos bandas de 372 pb que corresponden al producto de PCR de la COMP humana.

Flanqueando el sitio de policlonaje, el vector presenta en orientaciones opuestas el promotor de las RNA polimerasa de los bacteriófagos T7 y SP6. Estos promotores se utilizaron para la

secuenciación del inserto, lo que permitió ratificar la presencia de las sondas deseadas, además de definir la orientación de dicho inserto.

A continuación, el vector, convenientemente linearizado, fue transcrito y marcado *in vitro* en presencia de digoxigenina-11-UTP por la correspondiente polimerasa (DIG RNA labeling kit, Roche. Mannheim, Alemania). Se originó así un RNA marcado complementario al RNA a detectar (antisentido) y otro RNA marcado (sentido) del mismo sentido, que se pudo utilizar como control negativo de la técnica. La eficiencia del marcaje y la concentración de las sondas sentido y antisentido, se determinaron por comparación con un RNA control marcado (DIG Nucleic Detection kit, Roche. Mannheim, Alemania).

5.1.4. Hibridación

Las secciones de meniscos humanos incluidos en parafina se montaron sobre portaobjetos pretratados con 0.1 N HCl y 3aminopropil-trietroxi-silano (APES) al 2%, se desparafinaron, se rehidrataron y se fijaron en 3% paraformaldehído: glutaraldehído (1:1) durante 10 minutos. Inmediatamente, las muestras se trataron con levamisole 5 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, EEUU) durante 30 minutos para inactivar la fosfatasa alcalina endógena. El tejido fue entonces desproteinizado incubándolo con HCl 0.2 N durante 20 min. Después los tejidos se trataron con 25 µg/ml de proteinasa K durante 30 minutos a 37°C. Las muestras se fijaron de nuevo, se deshidrataron y se dejaron secar.

Para la hibridación, se cubrió la muestra con 0.4 ng/µl de la ribosonda marcada con digoxigenina y disuelta en solución de hibridación que contenía: 2x SSC; 1x Denhardt's (1% ficoll, 1% BSA, 1% polivinilpirrolidina); 0.1 M fosfato sódico, pH 6.5; 10% sulfato de dextrano; 4% formamida desionizada; 24 mM complejo Vanadyl Ribonucleasa (Sigma) y 0.5 mg/ml tRNA de levadura). El tejido se protegió con "cubres" y se incubó durante toda la noche a 42°C en una cámara húmeda.

Se realizaron distintos controles negativos para comprobar que la tinción observada era específica, tales como la omisión de la ribosonda antisentido, la hibridación con la sonda sentido marcada con digoxigenina y el tratamiento de los tejidos con 20 µg/ml de RNAsa previo a la hibridación.

5.1.5. Detección

El exceso de sonda se eliminó mediante lavados sucesivos con 2x SSC y 0.2x SSC durante 30 minutos a 37°C (1x SSC: 150 nM NaCl y 15 mM citrato sódico, pH 7.0).

Las preparaciones se incubaron con un anticuerpo frente a digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche. Mannheim, Alemania) durante 1 hora a 37°C. La detección de los híbridos de RNA se

realizó mediante la incubación de los cortes a 37°C en oscuridad con solución de revelado: 0.45% nitroazul tetrazolium (NBT) / 0.35% Xfosfato (0.75 ml de 5bromo-4-cloro-3-indol-fosfato y 50 mg/ml de sal de toluidina en dimetilformamida), sustratos de la fosfatasa alcalina que originan un precipitado insoluble de color azul oscuro. La reacción se detuvo lavando con 1x TE (10 mM Tris, pH 8.0 y 1 mM EDTA) y se procedió al montaje de los portas con 90% glicerol en PBS.

5.2. Valoración y cuantificación

Las muestras se valoraron de la misma forma que se explicó más arriba para la valoración histológica (apartado 4.3.). Además del contar el número de células-núcleos totales, se valoró el porcentaje de núcleos que hibridaban con la ribosonda para la COMP humana, del total de células por campo de gran aumento. (Figura 20).

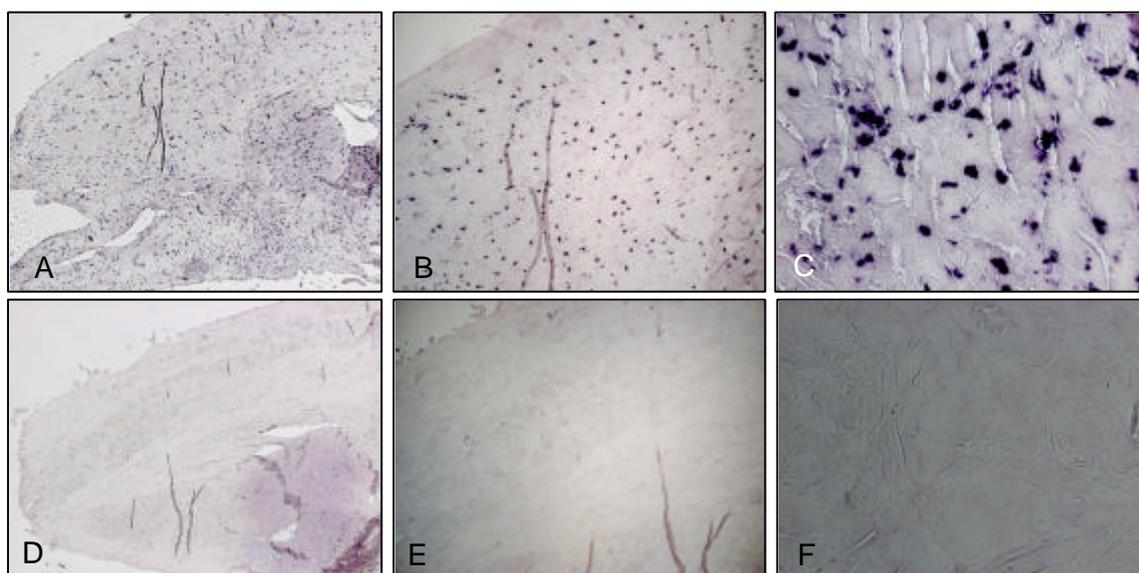


Figura 20. Detección de COMP mediante hibridación in situ.

Corte coronal de menisco interno humano inmunoteñido teñido mediante técnica de hibridación in situ frente a COMP (A) Visión al microscopio óptico a 5 aumentos, (B) a 10 aumentos y (C) a 40 aumentos. El mismo corte histológico, cortado consecutivamente al previo, en el que se omitió la ribosonda (control negativo) (E) visión al microscopio óptico a 5 aumentos, (F) a 10 aumentos (G) y 40 aumentos.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas se expresaron como la media con la desviación estándar (DE) en las variables paramétricas y como la mediana en las no paramétricas, señalando el rango en ambas. Para valorar la normalidad de los diferentes parámetros a estudio se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables cualitativas fueron expresadas en porcentajes.

Para el análisis de la significación se compararon las medias utilizando la prueba de la t de Student en las poblaciones con dos categorías (humanos) y el análisis de la varianza (ANOVA) en las poblaciones con más de dos categorías (conejos). Para realizar comparaciones múltiples entre grupos en variables con diferencias significativas con la prueba de ANOVA se empleó la prueba post-hoc de Bonferroni. La prueba de la U de Mann-Whitney se empleó para comparar variables cuantitativas que no siguieron una distribución normal (no paramétricas) entre dos categorías y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar variables cuantitativas no paramétricas entre grupos con más de dos categorías. Se empleó la prueba de la chi-cuadrado para correlacionar variables cualitativas. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$ (dos colas).

Todos los cálculos se realizaron usando el paquete estadístico SPSS versión 11.0 para Windows (Chicago, IL).

1. ESTUDIOS DE MENISCOS HUMANOS

1.1. Población celular y análisis histológico

El estudio de los cortes histológicos de los meniscos humanos reveló una media de 14 células por campo de gran aumento en el grupo de meniscos artrósicos (DE=7, rango de 5-30). En el grupo de meniscectomía parcial se observaron 47 células de media por CGA (DE=22, rango de 19-72), (Figura 21). Se observó una diferencia estadísticamente significativa para estos valores según la t de Student ($p=0,026$; figura 22).

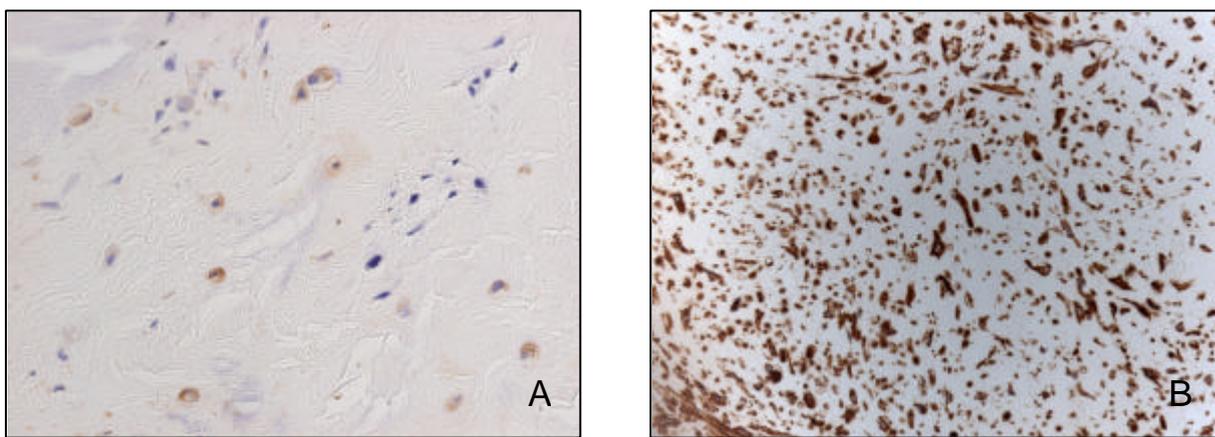


Figura 21. Inmunohistoquímica frente a COMP.

(A) Corte histológico de un menisco procedente de una rodilla artrósica humano donde se observan pocas células y un bajo porcentaje de las mismas presenta inmutinción celular positiva frente a COMP (células con citoplasma teñido de marrón alrededor de su núcleo azul). (B) El tejido procede de una meniscectomía parcial de un menisco humano. Se observa un elevado número celular con altísima inmutinción celular frente a COMP.

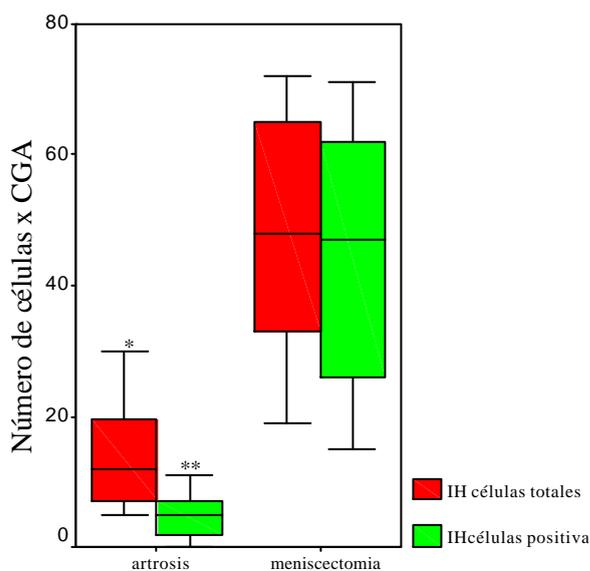


Figura 22. Población celular/COMP en meniscectomía VS artrosis.

Valoración de las muestras de meniscos humanos expresadas como número total de células por CGA (barras rojas) y como células inmunoteñidas frente a la COMP (Artrosis n=31. Meniscectomía n=5. $*p=0,026$; $**p=0,001$).

Se observaron depósitos de calcio en 5 muestras (las 5 pertenecían al grupo con artrosis avanzada, el 16% de las mismas) (Figura 23); degeneración mixoide en 6, también procedentes de pacientes con artrosis avanzada (19%) y la presencia de nidos celulares en otras 5 de las muestras del grupo de artrosis (16%) y en ninguna de las de meniscectomía parcial, (Figura 24).

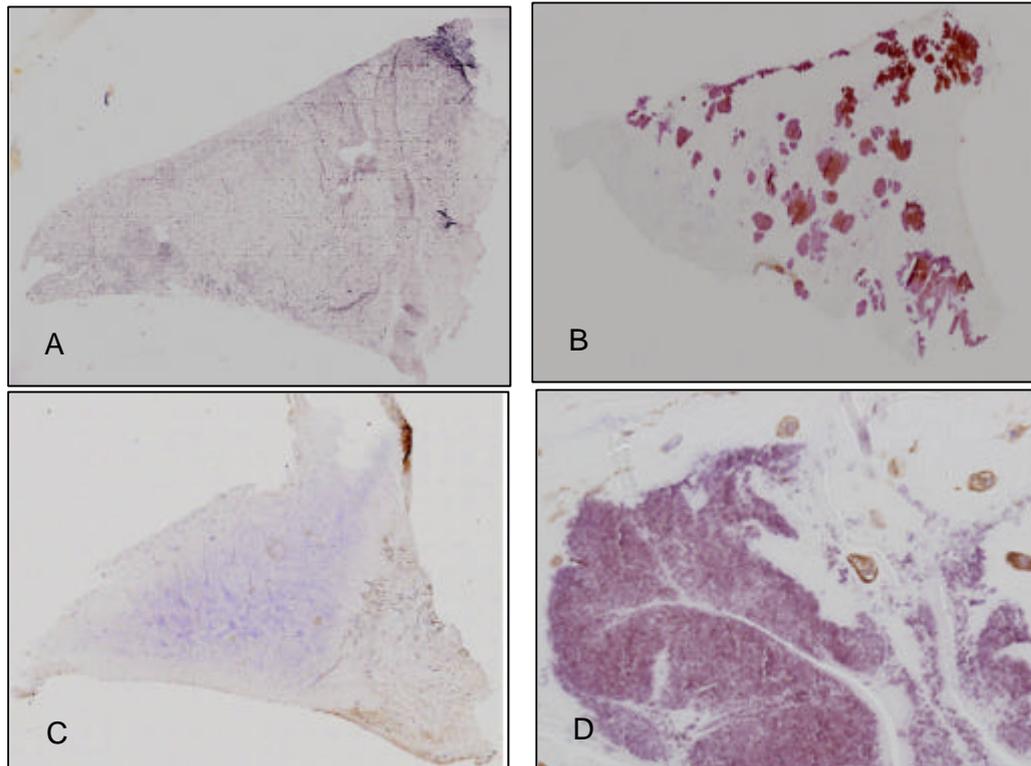


Figura 23. Depósitos de calcio.

Cortes coronales a meniscos artrósicos humanos donde se puede apreciar el típico aspecto triangular del menisco con el vértice orientado hacia el centro de la articulación de la rodilla. (A) Tinción mediante técnica de hibridación in situ frente a COMP (B) Inmunohistoquímica frente a COMP donde se observan importantísimos depósitos de calcio (C) no se aprecia calcio. (D) Detalle del calcio en el menisco correspondiente a (b).

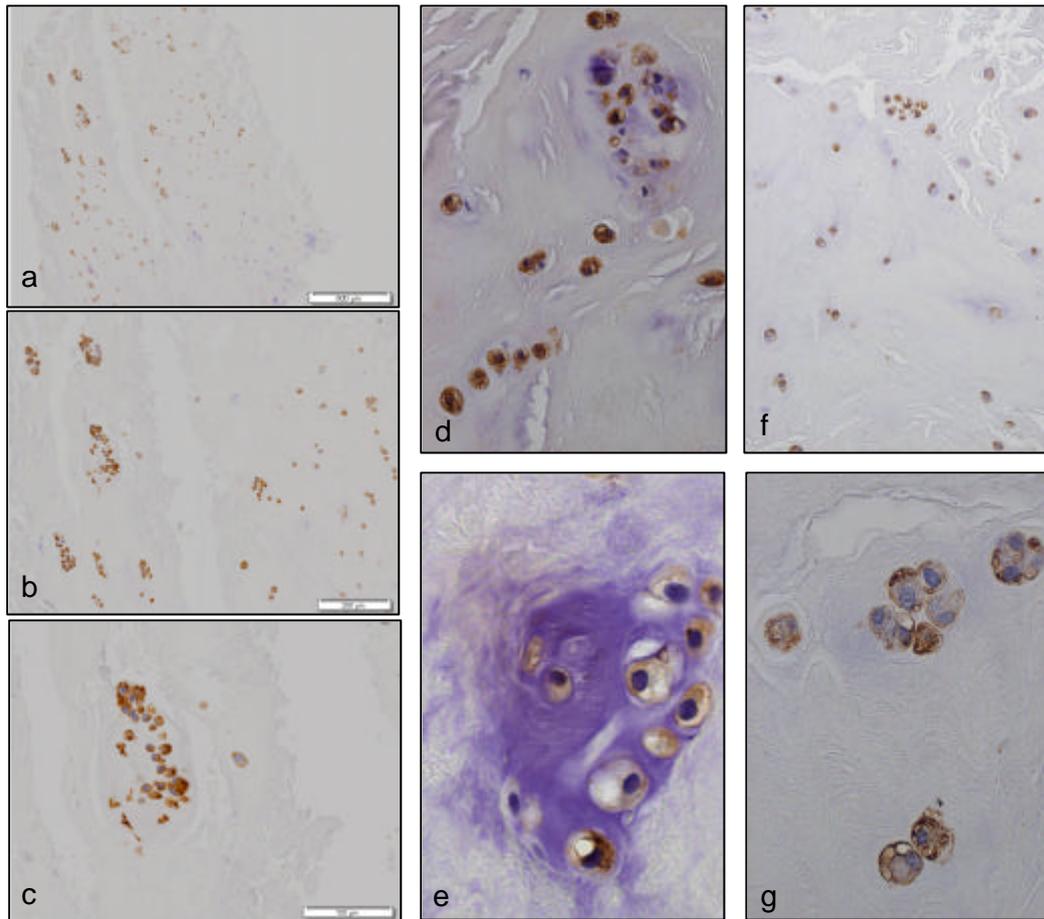


Figura 24. Nidos celulares humanos.

Inmunohistoquímica frente a COMP donde se observan nidos celulares en muestras procedentes de meniscos artrósicos humanos. Las células presentan un aspecto condroide y muestran una elevada inmunotinción con el anticuerpo frente a COMP. (a) Detalle de una región con una rotura meniscal a 16 aumentos (b) a 40 aumentos y (c) a 100 aumentos. (d) Imagen de microscopía óptica de otro menisco a 400 aumentos y (e) a 630 aumentos. (f) y (g) más ejemplos de nidos alrededor de zonas dañadas de meniscos humanos a 100 y 630 aumentos, respectivamente.

1.2. Proliferación celular y apoptosis

El estudio minucioso de los cortes histológicos teñidos con Ki67 mostró células positivas, es decir, proliferando en todas las muestras procedentes del grupo de meniscectomía parcial y sólo alrededor de un importante acúmulo de calcio en uno de los meniscos del grupo procedente de pacientes con artrosis. (Figura 25). Estas diferencias fueron muy significativas desde el punto de vista estadístico (Chi-cuadrado; $p=0,000$).

En cuanto a la tinción mediante la técnica de TUNEL, sólo una de las muestras procedentes del grupo de meniscectomía parcial (el 20%) presentó positividad. En el grupo de artrosis el 70% de las muestras mostraron células con signos de apoptosis. La prueba exacta de Fisher confirmó la significación estadística de estos resultados ($p=0,047$; figura 26).

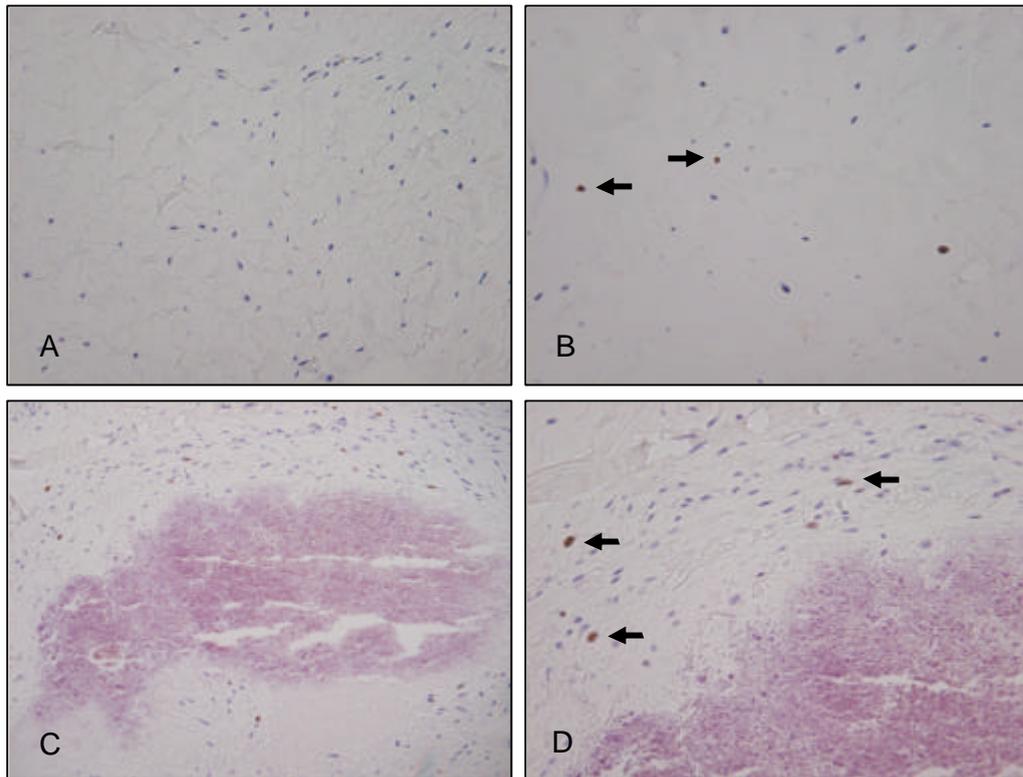


Figura 25. Proliferación celular en humanos.

(A) Corte histológico procedente de un menisco artroscópico humano donde no se observan células inmunoteñidas frente con anticuerpo frente a Ki67 (B) Corte histológico procedente de un meniscectomía parcial en humano donde se observan células inmunoteñidas frente a Ki67 (células inmunoteñidas en marrón, flechas).

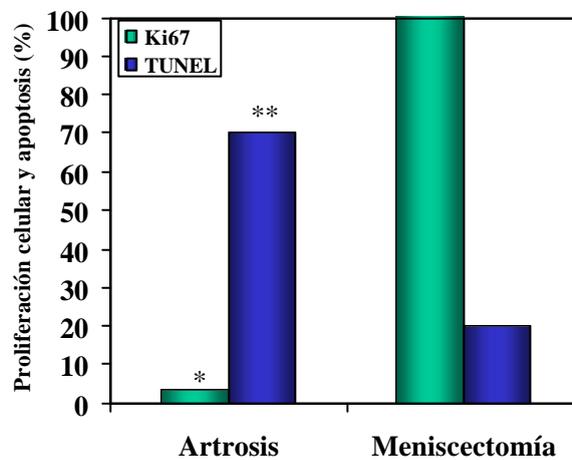


Figura 26. Proliferación celular y apoptosis en humanos.

Valoración de las muestras de humanos expresadas en porcentajes positivos con cada inmunotinción (Artrosis n=31. Meniscectomía n=5. *p=0,000; **p=0,047).

1.3. Distribución de los proteoglicanos

La valoración de la tinción con azul alcian mostró una distribución heterogénea de los proteoglicanos, con áreas muy teñidas frente a otras carentes de tinción. Por eso se valoró toda la muestra a estudio en cada caso para tener un valor absoluto sin decimales con los que comparar los

dos grupos de patologías a estudio. Los tejidos meniscales artrósicos presentaron ausencia de tinción o estuvieron poco teñidos en el 42% de las muestras. En el grupo de meniscectomía parcial se consideraron muy teñidas el 80% de las muestras. Comparando estos resultados no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (Chi-cuadrado; $p=0,354$).

Si se agrupan los resultados en cada uno de los dos grupos y se comparan las muestras con ausencia de tinción azul o poco teñidas frente a las bastante o muy teñidas, se observa que 13 de las 31 (42%) muestras con artrosis precoz teñían poco o nada con azul alcian y 18 de las 31 (58%) estaban bastante o muy teñidas. Por otro lado, 4 de los 5 tejidos procedentes de meniscectomía parcial (80%) estaban muy teñidos, lo que a pesar de no alcanzar una significación estadística (Chi-cuadrado; $p=0,350$) indica una tendencia a la disminución de los proteoglicanos con la artrosis avanzada (Tabla 2).

	Tinción con azul alcian		Total
	Nada/Poco	Bastante/Muy teñidas	
Artrosis	13	18	31
Meniscectomía	1	4	5
Total	14	22	36

Tabla 2. Valoración semicuantitativa de proteoglicanos según patología.

1.4. Inmunohistoquímica frente a COMP

Se encontró una mediana de 5 células inmunoreactivas frente al anticuerpo para la COMP por campo de gran aumento en el grupo de meniscos artrósicos (rango de 0-16). En el grupo de meniscectomía parcial se observaron 47 células de mediana por CGA (rango de 15-71) (Figuras 21 y 22).

La tinción de matriz fue heterogénea dentro de un mismo tejido. La media de 10 campos de gran aumento contiguos para este parámetro mostró poca inmunotinción para los tejidos procedentes de pacientes artrósicos (mediana de 0 puntos y rango de 0 a 1) y una mayor tinción para las muestras procedentes de meniscectomías parciales (mediana de 1 punto y rango de 0,66 a 3) (Figura 15).

La prueba de Kolmogorov-Smirnov mostró que tanto la inmunotinción de matriz frente a la COMP como el número de células inmunoreactivas frente a la COMP no seguían una distribución normal, es decir no podían ser valoradas mediante pruebas estadísticas paramétricas. Se empleó la prueba de la U de Mann-Whitney, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de patología tanto para la tinción celular ($p=0,001$) como de matriz frente a la COMP ($p=0,000$).

1.5. Hibridación in situ

Se comprobó el adecuado funcionamiento de la ribosonda para la COMP humana, lo que se desprende de la comparación de las muestras teñidas con la misma y de los controles negativos de cada muestra, en los que se obvió la ribosonda en la técnica de hibridación (Figura 20).

Se observaron 39 núcleos de media por campo de gran aumento (DE=23, rango de 18-77), de los que una media de 38 hibridaban frente a la ribosonda para la COMP humana en el grupo de meniscectomía (DE=23, rango de 18-77). En el grupo de artrosis se observaron 17 núcleos de media por campo de gran aumento (DE=10, rango de 3-38), de los que 12 hibridaban frente a la ribosonda (DE=9, rango de 0-35). La diferencia entre los dos grupos empleando la t de Student no alcanzó significación estadística ($p=0,104$ para el número total de núcleos y $p=0,063$ para el número total de núcleos positivos frente a la ribosonda) (Figura 27).

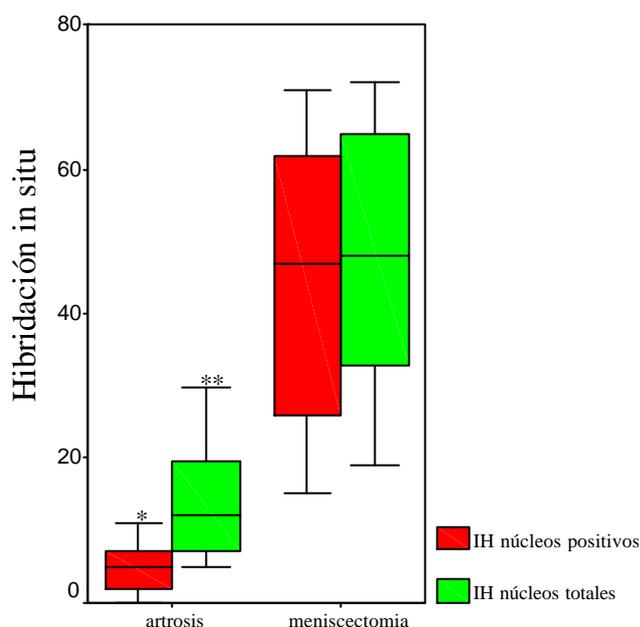


Figura 27. H in situ.

Valoración de las muestras de humanos expresadas como número de núcleos por CGA mediante técnica de hibridación in situ (Artrosis n=31. Meniscectomía n=5. * $p=0,104$; ** $p=0,063$).

1.6. Correlaciones entre los resultados de humanos

Se realizó un análisis de correlación entre las variables cuantitativas (Figura 28). Comparando los distintos resultados entre sí, se observó una correlación significativa, según el coeficiente de correlación de Pearson, entre el número medio de células por CGA, el número total de núcleos ($p=0,001$) y el número de núcleos que hibridaban frente a la ribosonda para la COMP ($p=0,000$). Así mismo, también se encontró correlación significativa entre el número de células por CGA y el número de células inmunoreactivas frente a la COMP (Rho de Spearman; $p=0,000$).

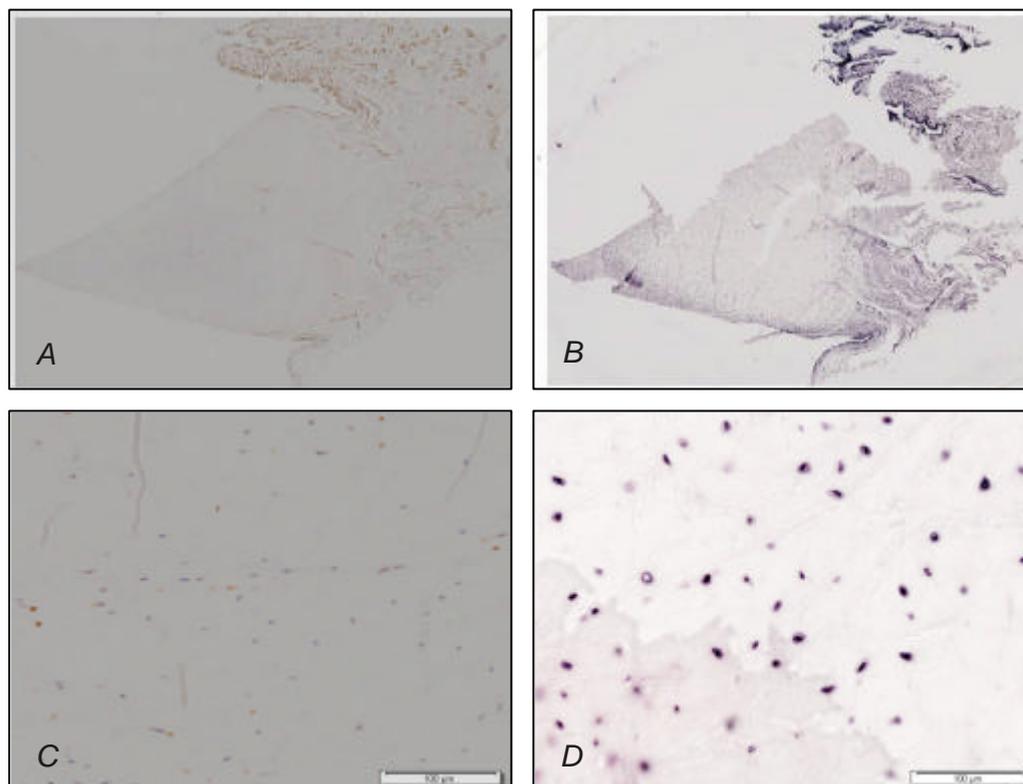


Figura 28. Comparación de técnicas de tinción para COMP.

(A) Corte coronal de menisco interno humano inmunoteñido con anticuerpo frente a COMP y (B) teñido mediante técnica de hibridación in situ frente a COMP. (C) y (D) detalles de a y b.

2. ESTUDIOS EN EL MODELO DE ARTROSIS EN CONEJOS

2.1. Efectividad de las cirugías

En el postoperatorio de todas las cirugías de sección del LCA no se apreciaron signos de infección de la herida quirúrgica. Se podría considerar un signo de salud de los animales el aumento de peso desde la cirugía hasta el sacrificio: casi 700 gramos de media.

En el momento del sacrificio se comprobó de forma mecánica, mediante la maniobra de cajón, la estabilidad de las rodillas no operadas y la presencia de cajón anterior en todas las rodillas a las que se les había seccionado dicho ligamento.

2.2. Valoración macroscópica de cartílagos y meniscos

El cartílago tibial y femoral de todas las rodillas no intervenidas no presentó lesiones, pudiendo observar el típico aspecto liso y brillante de su superficie blanco-azulada y la ausencia de fisuras o fibrilación de las superficies articulares. Sin embargo, dos de las cinco rodillas del grupo sacrificado a las 4 semanas de la sección del LCA mostraron fibrilación del cartílago y en el grupo sacrificado a las 12 semanas, ningún cartílago fue normal y 2 de los 5 conejos presentaban lesiones de

espesor completo (40%) (Figura 29). La comparación del grado de lesión del cartílago entre rodillas operadas y sanas alcanzó significación estadística (Chi cuadrado; $p=0,005$).

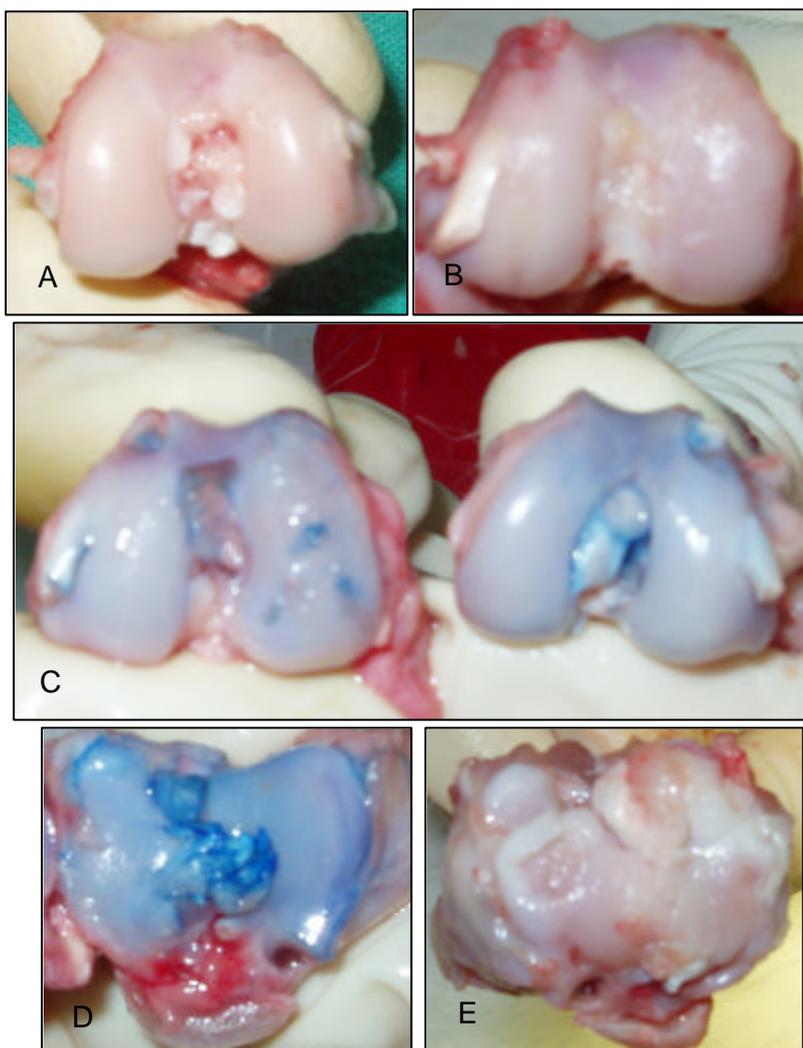


Figura 29. Aspecto macroscópico del cartílago en conejos.

(A) Condílos femorales de una rodilla sana. (B) Condílos femorales de una rodilla a las 4 semanas de la sección del LCA. Obsérvese el aspecto deslustrado con respecto a una rodilla sana. (C) A la izquierda de la imagen se observan los condílos femorales de una rodilla derecha a las 12 semanas de la sección del LCA. Los condílos de la derecha de la imagen corresponden a la rodilla izquierda del mismo conejo. Se han sumergido los cartílagos en tinta azul y se han lavado inmediatamente. Se observan depósitos de tinta en el condilo femoral interno de la rodilla derecha que se corresponde con lesiones de espesor completo en el cartílago. (D) Imagen de meseta tibial sana, teñida como en (C). (E) Lesión osteocondral en meseta tibial de una rodilla tras 12 semanas de la sección del LCA.

Ninguno de los 10 meniscos control, procedentes de rodillas no operadas, presentó signos de rotura macroscópica ni microscópica. En dos de los cinco meniscos internos del grupo sacrificado a las 4 semanas de la sección del LCA y en todos los meniscos internos y en dos de los externos del grupo sacrificado a las 12 semanas de la cirugía, se apreciaron roturas meniscales. Estos datos se recogen en la tabla 3. Las diferencias entre los meniscos procedentes de rodillas sanas y de rodillas inestables fueron estadísticamente significativas (Chi cuadrado; $p=0,000$). La comparación entre el número de

meniscos internos con lesión respecto a los externos casi alcanzó significación estadística (Chi cuadrado; $p=0,058$) (Figura 30).

	Rotura		Total
	No	Si	
sano	20		20
4 semanas	8	2	10
12 semanas	3	7	10
Total	31	9	40

Tabla 3. Valoración macroscópica de las roturas meniscales.

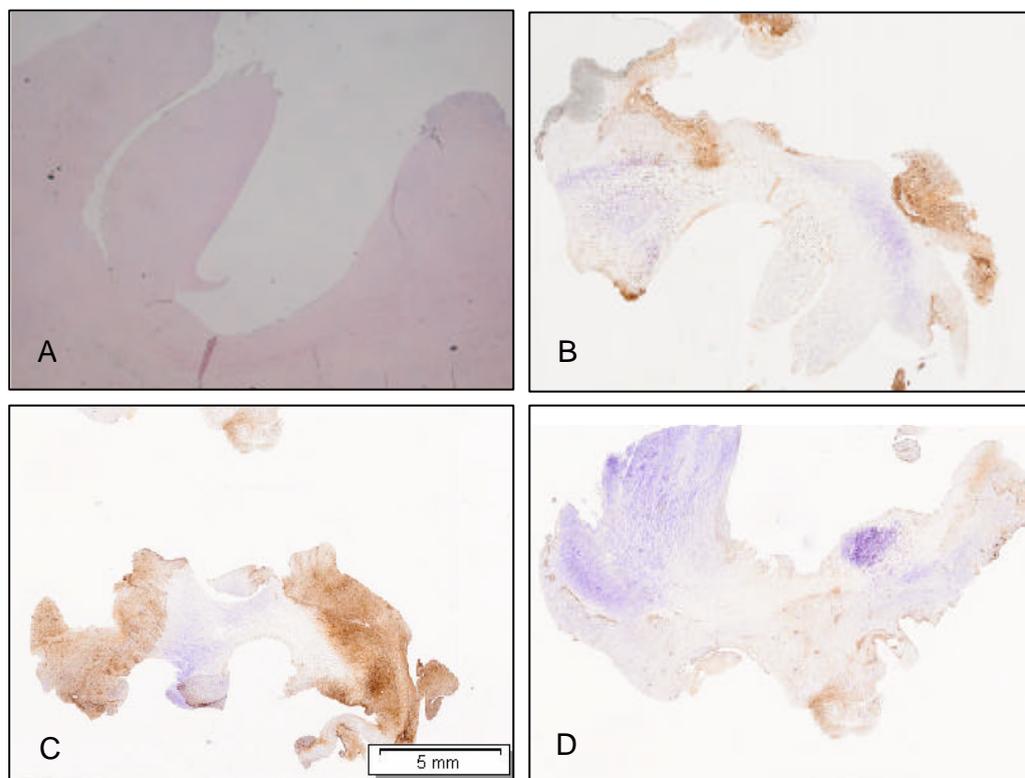


Figura 30. Roturas meniscales en conejos.

(A) Detalle de una rotura meniscal en un menisco interno tras doce semanas de la sección del LCA (tinción con hematoxilina/eosina) (B) Meniscos interno a las 12 semanas de la sección del LCA donde se aprecia una rotura longitudinal en cuerno posterior de menisco interno. Meniscos externo (C) e interno (D) inmunoteñidos frente a COMP procedentes de una rodilla de conejo a las 4 semanas de la sección del LCA donde no se aprecian roturas meniscales.

2.3. Población celular

El número medio de células por campo de gran aumento en meniscos internos sanos fue de 88 (DE=21; rango de 58-119). En meniscos internos procedentes de rodillas a las 4 semanas de la cirugía de 90 (DE=24; rango de 61-115) y en los meniscos internos a las 12 semanas de la sección del LCA

fue de 88 (DE=18; rango de 77-120). A pesar de la tendencia al aumento en la población celular tras la inestabilidad de la rodilla, con una disminución de la misma a los 3 meses, no se encontró asociación estadísticamente significativa (ANOVA; $p=0.987$).

En meniscos externos de rodillas no operadas se observaron 80 células de media (DE=19, rango de 58-114) por campo de gran aumento. A las 4 semanas de la cirugía el número de células fue de 80 (DE=32; rango de 65-137) y a las 12 semanas de la cirugía el número de células disminuyó hasta 79 (DE=47; rango de 46-158). En los meniscos externos la tendencia al aumento en la población celular tras la inestabilidad de la rodilla fue mínima, con pocos cambios entre las poblaciones celulares independientemente de ser sanos o tras cuatro o doce semanas de la sección del LCA. Tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa (ANOVA; $p=0.998$).

Comparando los meniscos internos con los externos independientemente de que fueran sanos o del tiempo de evolución de la lesión, se observó una mayor celularidad en los meniscos internos (89; DE=20) respecto a los externos (80; DE=29) pero sin significación estadística (t de Student; $p=0.261$; Figura 31).

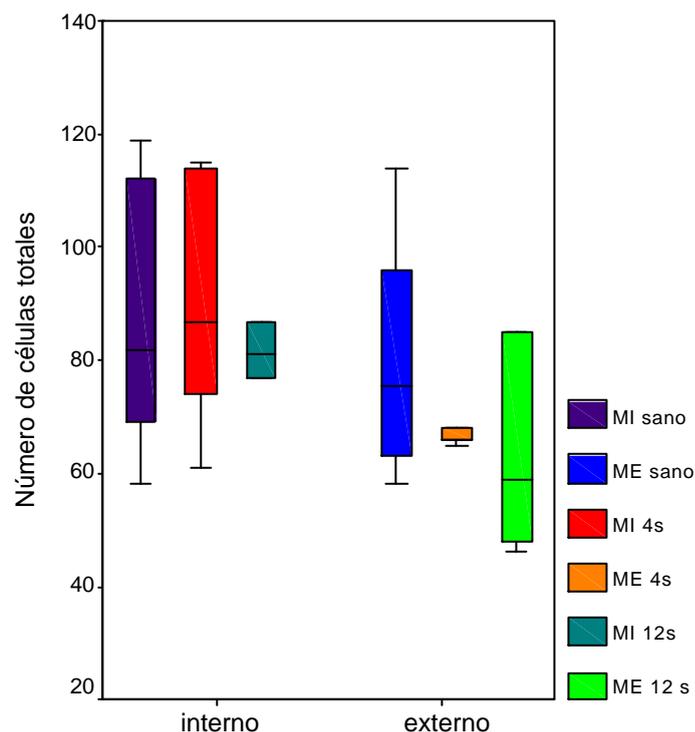


Figura 31. Células totales CONEJOS

Valoración de las muestras de conejos expresadas como número total de núcleos por CGA (* $p=0.987$; ** $p=0.998$; $p=0.261$).

En cuanto a la distribución de las células dentro de los meniscos, se observaron en los tres grupos diferencias zonales con un mayor número de células en la sinovial y el número de células disminuía desde la denominada zona roja o periférica del menisco hasta la zona blanca o central (Figura 32).

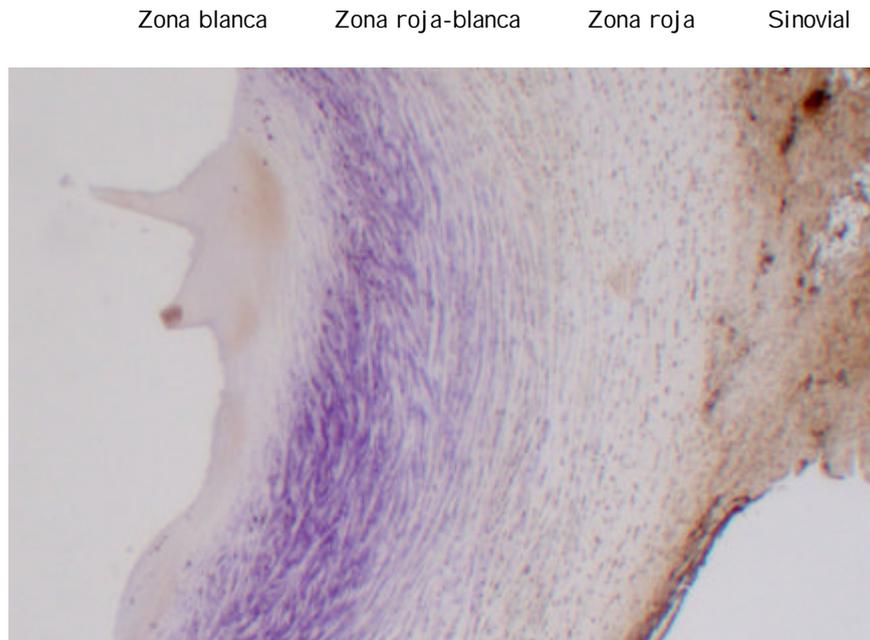


Figura 32. Distribución de la COMP en el menisco.

Detalle de un menisco de conejo teñido con anticuerpo frente a COMP en el que se observan las tres zonas clásicas según la vascularización y la sinovial. La zona blanca esta prácticamente desprovista de células, mientras que éstas son numerosas en zona roja en la unión de la sinovial con el menisco.

Se observaron agrupaciones de células de aspecto condroide alrededor de las roturas meniscales y no en otras localizaciones ni en tejidos sanos. Estos **nidos celulares** estaban rodeados de una matriz muy teñida frente a proteoglicanos y presentaban una tinción celular frente a la COMP muy positiva en la inmunohistoquímica (Figura 33). La presencia de estas agrupaciones celulares sólo en rodillas inestables fue estadísticamente significativa (Chi cuadrado; $p=0,001$) y la comparación entre meniscos internos y externos casi alcanzó la significación estadística (Chi cuadrado; $p=0,058$).

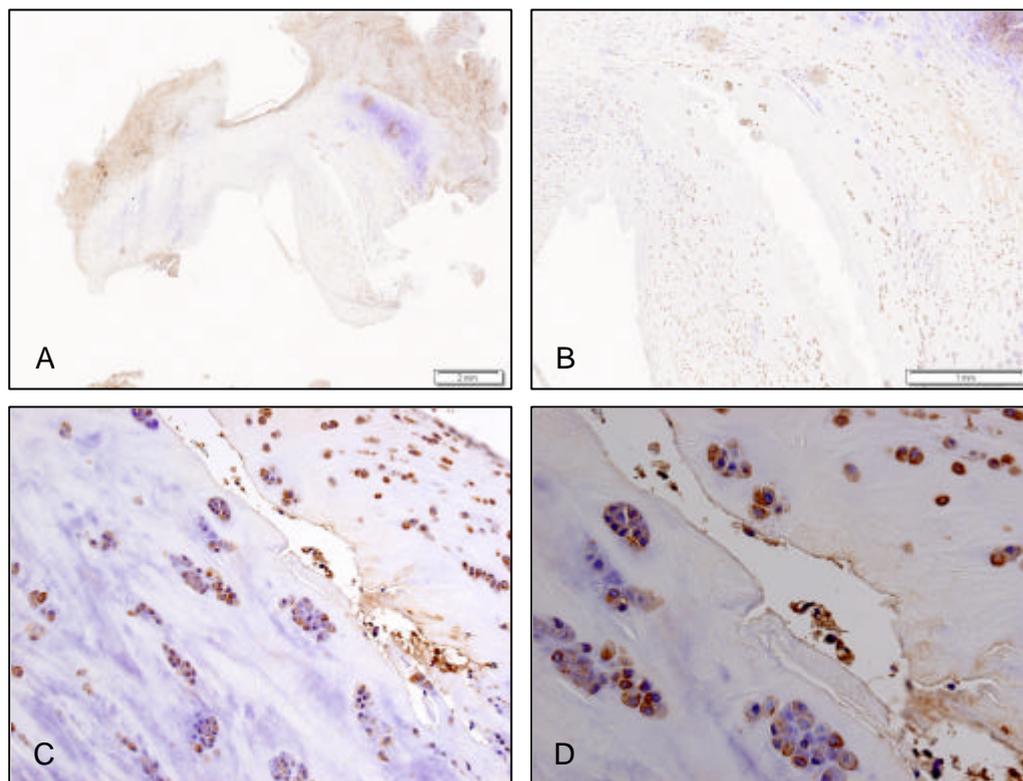


Figura 33. Nidos celulares en conejos.

(A) Se observa una rotura en un menisco interno a las 12 semanas de la sección del LCA. Magnificando la zona de la rotura 50 veces (B) se observan agrupaciones celulares. Imagen de una rotura de menisco externo a las 12 semanas de la sección del LCA magnificada 200 veces (C) y 400 veces (D) en las que podemos apreciar la presencia de nidos celulares con células de aspecto condroide, fuertemente inmunoteñidas frente a COMP, alrededor de una zona de rotura.

2.4. Proliferación celular

No se consiguió una adecuada tinción de todas las muestras de conejo con la inmunotinción para Ki67, ya que al realizar la recuperación antigénica se precisaba mantener una elevada temperatura y parte del tejido se desprendía de los portas. Por este motivo las muestras teñidas perdieron parte del tejido y no se pudo contar el número total de células positivas frente a Ki67 por 10 CGA contiguos. Para realizar la valoración de la muestra se contó el número total de células positivas en todo el tejido meniscal restante, asumiendo el error de que las superficies no eran iguales en todos los tejidos pero suponiendo que el azar habría dañado los tejidos de un modo similar en los distintos grupos.

Se observó una media de 13 células positivas frente a Ki67 (DE=21, rango de 0-50) en los meniscos internos sanos. A las 4 semanas de la sección del LCA el número medio de células positivas frente a este anticuerpo en los meniscos internos fue de 46 (DE=28 y rango de 21-76) y a las 12 semanas de la cirugía de 7 células (DE=9, rango de 0-16). Se encontró asociación estadísticamente significativa entre estos resultados (ANOVA; $p=0,047$). El empleo de la prueba *post hoc* de Bonferroni, mostró significación estadística entre las diferencias de células positivas frente a Ki67

encontradas a las 4 semanas y a las 12 en meniscos internos ($p=0,056$) y no entre meniscos internos sanos y a las 4 y 12 semanas de la sección del LCA ($p=0,125$ y $p=1,000$, respectivamente).

En cuanto a los meniscos externos sanos, se observaron 8 células positivas de media frente a Ki67 (DE=12, rango de 0 a 35 células). A las 4 semanas de la sección del LCA el número medio de células positivas en los meniscos externos fue de 31 (DE=28 y rango de 14-73) y a las 12 semanas de la cirugía de 5 células (DE=7 y rango de 0-15). Estos resultados no fueron estadísticamente significativos (ANOVA; $p=0.071$). (Figura 34).

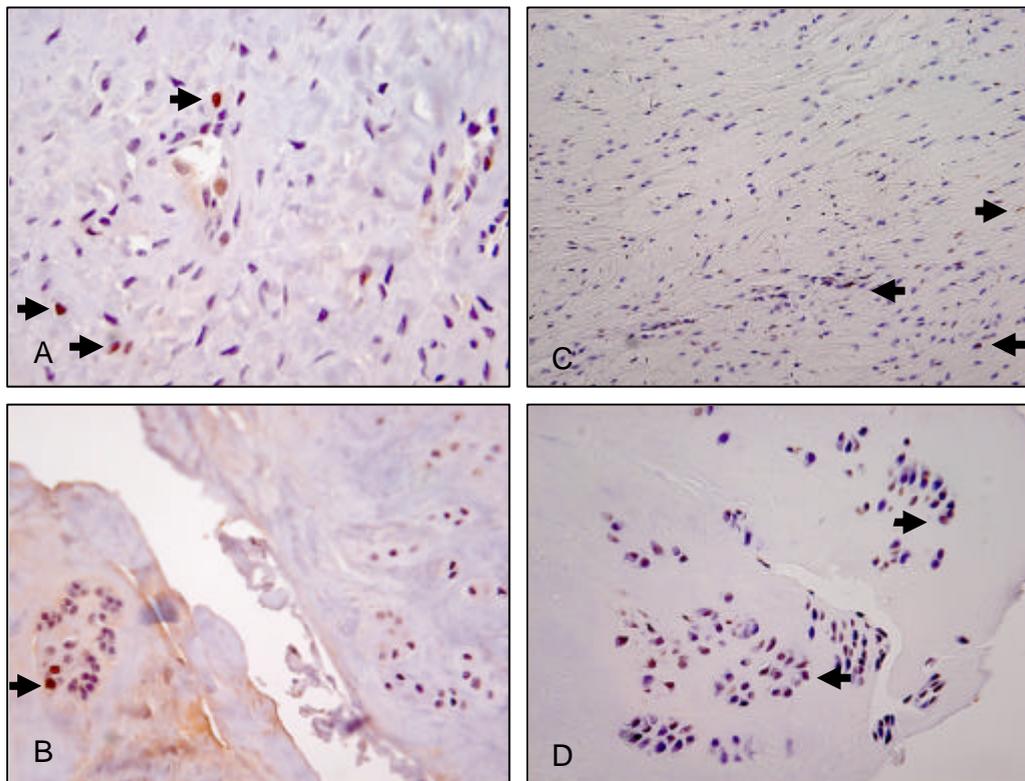


Figura 34. Proliferación celular y apoptosis en conejos.

(A) y (B) Inmunotinción con Ki67 a 400 aumentos. Las células en proliferación se tiñen de marrón (flechas). En (B) se observa un nido celular con células también en proliferación. (C) y (D) Técnica de TUNEL. Las células en apoptosis se tiñen de marrón (flechas). En (D) se observa también alguna célula en apoptosis dentro de un nido celular.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la proliferación celular comparando meniscos internos o externos (t de Student; $p=0.504$; figura 35).

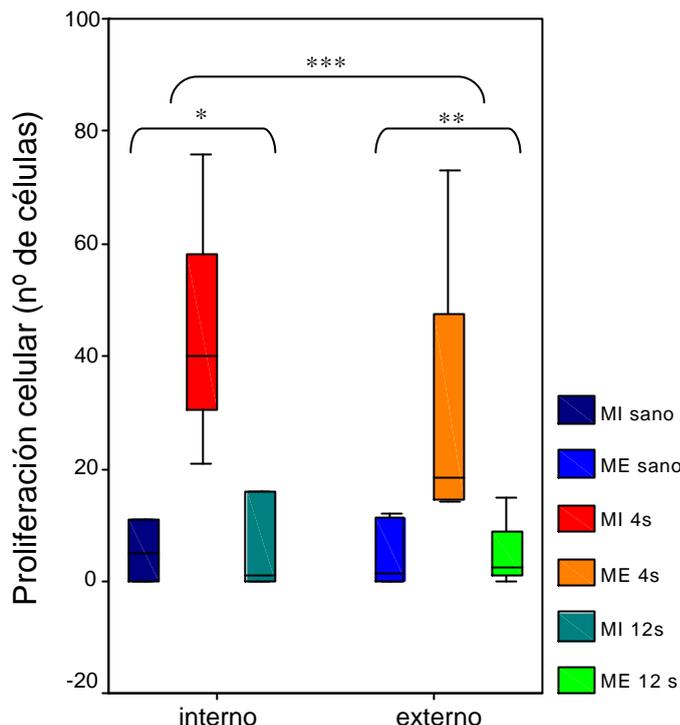


Figura 35. Proliferación celular.

Valoración de las muestras de conejos expresadas como número total de células Ki67 positivas en cada muestra (* $p=0,047$; ** $p=0,071$; $p=0,504$).

2.5. Apoptosis

El estudio de las muestras teñidas mediante la técnica de TUNEL mostró apoptosis en sólo uno de los meniscos internos sanos (10%), en 3 de los 5 meniscos internos a las 4 semanas de la sección del LCA (60%) y en 2 de los 5 meniscos internos a las 12 semanas de la inestabilidad (40%). Estos resultados no alcanzaron significación estadística (ANOVA; $p=0.129$).

Los meniscos externos sanos no mostraron apoptosis. Si lo hicieron 2 de los meniscos externos de rodillas estudiadas tras 4 semanas de la sección del LCA (40%) y otros 2 de los procedentes de rodillas de conejos sacrificados a las 12 semanas de la inestabilidad por sección del LCA (40%). Estos resultados no fueron estadísticamente significativos (ANOVA; $p=0.087$). (Figura 34).

Comparando tanto el menisco interno como el externo sanos con los enfermos (independientemente del tiempo desde la sección del LCA) si se observó significación estadística (Chi-cuadrado; $p=0.012$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico al comparar la presencia de células apoptóticas entre meniscos internos o externos independientemente de que fuesen sanos o del tiempo desde la lesión (prueba exacta de Fisher; $p=0,716$).

2.6. Distribución de los proteoglicanos

La medida semicuantitativa de la concentración de proteoglicanos analizando las tinciones de azul alcian, mostró un incremento de tinción de las muestras, y por tanto en el contenido de proteoglicanos totales en la matriz extracelular, a las 4 semanas de la cirugía de sección del LCA respecto a meniscos normales. Si bien este incremento se produjo en ambos meniscos, fue más importante en meniscos internos. A las 12 semanas de la cirugía las muestras meniscales habían aumentado aun más la concentración de proteoglicanos (Figura 36). No se encontró asociación estadísticamente significativa entre estos resultados (Chi-cuadrado; $p=0.147$) ni tan siquiera al comparar tanto meniscos internos como externos sanos con ambos meniscos a los 4 y 12 semanas tras la cirugía para la inestabilización de la rodilla (Chi-cuadrado; $p=0.130$).

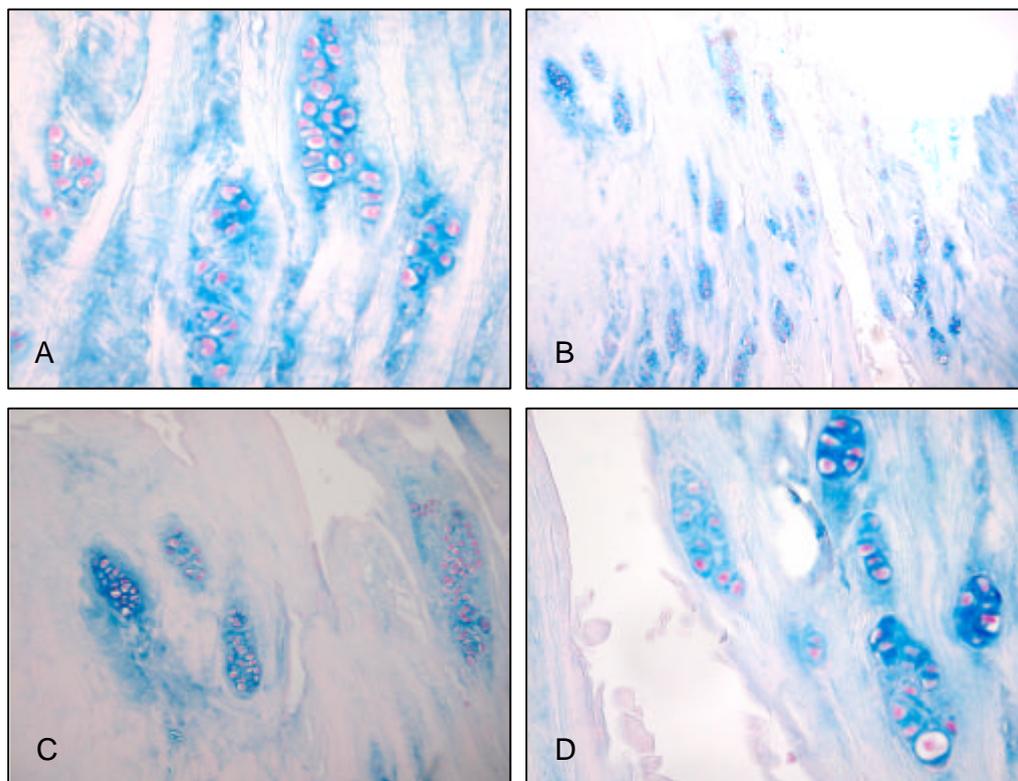


Figura 36. Proteoglicanos en conejos.

Corresponde a cortes histológicos de meniscos de conejo a las 12 semanas de la sección del LCA. (A) Muestra muy teñida con azul alcian. Presencia de nidos celulares alrededor de una rotura longitudinal, donde se observa importante presencia de proteoglicanos alrededor de los nidos celulares a 100 aumentos (B), 200 aumentos (C) y magnificada la muestra 400 veces (D).

Sin embargo, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los meniscos externos de todos los grupos (80% con mucha tinción o regular) con los meniscos internos (45% regular o muy teñidos) (prueba exacta de Fisher; $p=0,048$). También se encontró asociación estadísticamente significativa entre la concentración de proteoglicanos en los meniscos lesionados

externos (con un 20% de meniscos con poca tinción frente a azul alcian) frente a la de los internos (55% de los mismos presentaban poca tinción), independientemente del grado de lesión (Chi cuadrado; $p=0.041$).

2.7. Inmunohistoquímica frente a COMP

El número medio de células inmunoteñidas frente a la COMP por campo de gran aumento en meniscos internos sanos fue de 80 (DE=25 y rango de 44 a 112 células; el 90,27% del total de células por CGA). En meniscos procedentes de rodillas a las 4 semanas de la cirugía de sección del LCA, se observó que 83 células de media por CGA inmunoteñían frente a la COMP (DE=20, rango de 59 a 105 células por CGA; el 91,57% del total de células) y en los meniscos internos a las 12 semanas de la cirugía el número medio de células por CGA que inmunoteñían frente a la COMP fue de 77 (DE=13 y rango de 70 a 100 células; el 87,10% del total de células tiñeron con el anticuerpo). No se encontró asociación estadísticamente significativa (ANOVA; $p=0,919$).

En meniscos externos de rodillas no operadas se observaron 65 células de media por campo de gran aumento inmunoteñidas frente a la COMP (DE=22 y rango de 40 a 98 células por CGA; el 81,95% del total de células encontradas de media por CGA). A las 4 semanas de la cirugía de sección del LCA, el número medio de células por CGA inmunoteñidas con el anticuerpo para la COMP aumentó a 71 (DE=34 y rango de 52 a 132; el 88,06%). A las 12 semanas de la cirugía el número medio de células por CGA disminuyó hasta 66 (DE=44 y rango de 33 a 142 células inmunoteñidas; el 83,58%). No se encontró tampoco en este caso asociación estadísticamente significativa (ANOVA; $p=0,950$).

Se observó un mayor número de células que sintetizaban la COMP en los meniscos internos que en los externos sin significación estadística (t de Student; $p=0.120$). Además, también se observó una tendencia al incremento en la producción celular de la COMP tras la lesión inicial, pero esta capacidad de síntesis proteica de la COMP disminuía a las 12 semanas de la cirugía (Figura 37).

En cuanto a la inmunotinción de matriz extracelular con el anticuerpo frente a la COMP, se observó que al igual que sucedía con la distribución celular según las distintas zonas del menisco, la zona más inmunoteñida frente a la COMP fue la zona denominada roja del menisco, disminuyendo la intensidad hacia la denominada zona blanca y siendo aun mayor en la sinovial y en las zonas de inserción de los cuernos meniscales (Figura 32). El estudio estadístico de este parámetro con la prueba de Kolmogorov-Smirnov mostró que no seguía una distribución normal. Se observó una inmunotinción mediana de 0 en meniscos internos sanos (rango de 0,00 a 0,80); de 0,20 en meniscos

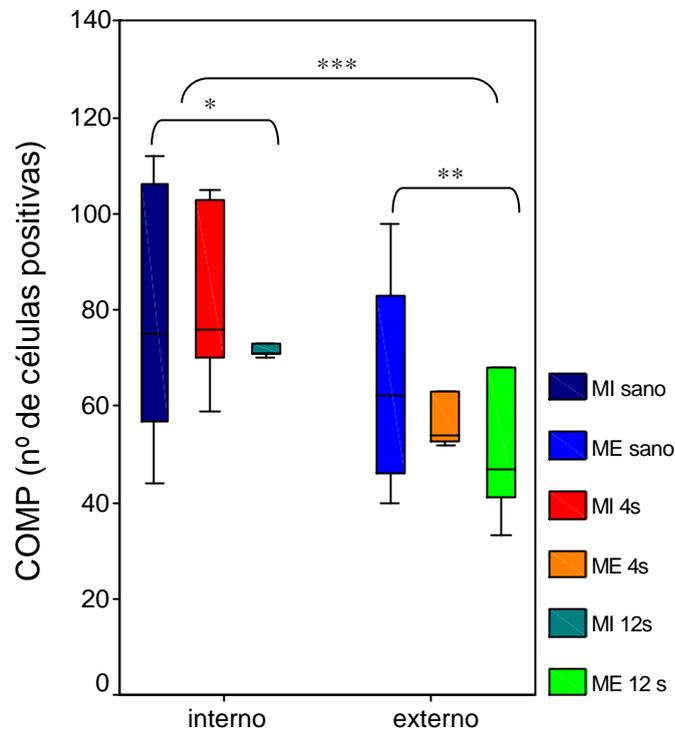


Figura 37. Células teñidas frente a COMP.

Valoración de las muestras de conejos expresadas como número total de células por CGA (* $p=0,919$; ** $p=0,950$; $p=0,120$).

internos a las 4 semanas de la sección del LCA (rango de 0,00 a 0,60) y de 0,20 a las 12 semanas (rango de 0,00 a 2,60). En meniscos externos sanos se apreció una inmunotinción de matriz frente a la COMP de 0,00 de mediana (rango de 0,00 a 0,60); a las 4 semanas de la cirugía de sección del LCA de 0,00 (rango de 0,00 a 0,80); y a las 12 semanas de 0,20 de mediana (rango de 0,00 a 2,00). La comparación de las diferencias entre estos resultados no alcanzó significación estadística (Kruskal-Wallis; $p=0,251$ para meniscos internos y $p=0,224$ para meniscos externos). Al comparar meniscos internos y externos sin tener en cuenta si eran sanos o el tiempo desde la lesión del cruzado, tampoco se encontró significación estadística (U de Mann-Whitney; $p=0,410$; figura 38).

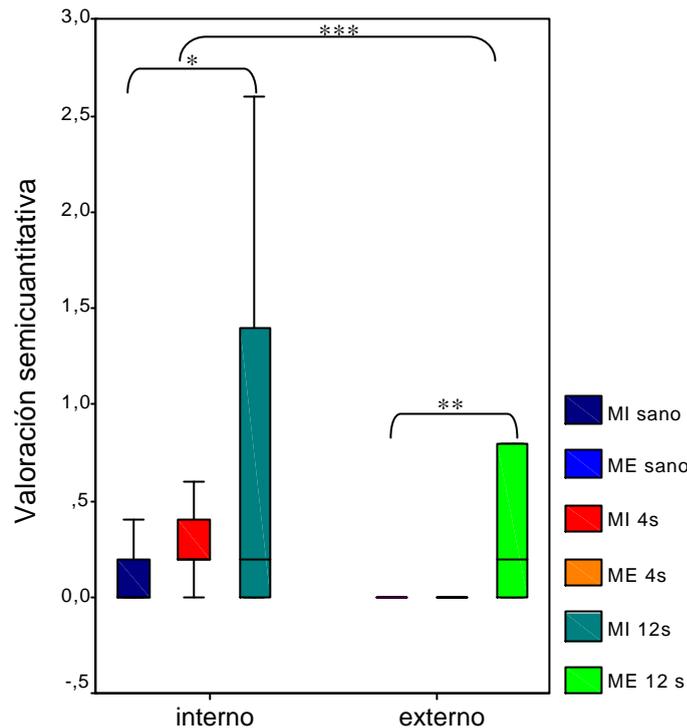


Figura 38. Tinción de COMP en matriz.

Valoración semicuantitativa de la tinción de COMP en la matriz extracelular en el modelo experimental en conejos (* $p=0,251$; ** $p=0,224$; $p=0,410$).

2.8. Correlaciones entre los resultados de conejos

Se realizó un análisis de correlación entre las distintas variables en conejos. Se observó una correlación significativa, según el coeficiente de correlación de Pearson, entre el número medio de células por CGA y el número de células inmunoteñidas frente a la COMP ($p=0,000$).

La inmunotinción de matriz extracelular frente a la COMP mostró ser una variable no paramétrica. Se encontró correlación significativa entre esta variable en conejos y el número medio de células por CGA (Rho de Spearman; $p=0,000$) y el número de células inmunoreactivas frente a la COMP (Rho de Spearman; $p=0,001$). No se encontró significación estadística con las otras variables.

3. COMPARACIÓN ENTRE CONEJOS Y HUMANOS

El empleo de un modelo secuencial, con poca variabilidad y predecible de artrosis en conejos por sección del LCA debería ayudar a extrapolar los datos obtenidos de los meniscos humanos. Al no poder realizar un estudio secuencial de los cambios en los meniscos en artrosis humana, y para tratar

de comprender si las diferencias existentes entre los tejidos meniscales procedentes de meniscectomía y los procedentes de rodillas artrósicas se corresponden con estadios precoces y tardíos de la artrosis normal de rodilla, deberíamos encontrar similitudes entre los meniscos artrósicos y los de los conejos a las 12 semanas de la cirugía y entre los meniscos procedentes de meniscectomías y los meniscos sanos de conejos o los procedentes de conejos sacrificados a las 4 semanas de la sección del LCA.

3.1. Población celular

En el grupo de meniscectomía parcial en humanos se encontraron 48 células de mediana por CGA (rango de 19-72) y la mediana de células por CGA en los meniscos de conejos sanos o a las 4 semanas tras la sección del LCA fue de 79 (rango 58-137). La comparación de los valores entre estos dos grupos mostró significación estadística (U de Mann-Whitney; $p=0,005$).

La mediana de células en el grupo de meniscos humanos artrósicos fue de 12 por CGA (rango 5-30) y en el grupo de meniscos de conejos a las 12 semanas tras la inestabilización de la rodilla por sección del LCA fue de 79 (rango 46-158). La comparación de los valores de estos dos grupos también alcanzó significación estadística (U de Mann-Whitney; $p=0,000$).

3.2. Proliferación celular

El 100% de las muestras histológicas procedentes de meniscectomías parciales en humanos mostraron inmunotinción positiva para Ki67. En el grupo de meniscos sanos de conejos o tras 4 semanas de la sección del LCA se observó positividad para Ki67 en el 83% de las muestras. No se encontró significación estadística al comparar estos dos grupos (prueba exacta de Fisher; $p=1,000$).

Sólo se observó inmunotinción positiva para Ki67 en una de las muestras procedentes de meniscos artrósicos humanos (3,2%). Por el contrario, el 70% de los meniscos a las 12 semanas de la sección del LCA presentaron tinción positiva. La comparación entre estos dos grupos mostró significación estadística (prueba exacta de Fisher; $p=0,000$).

3.3. Apoptosis

El 80% de los cortes histológicos procedentes de muestras de meniscectomía parcial y de meniscos de conejos sanos y a las 4 semanas de la sección del LCA no presentaron células inmunoreactivas con la técnica de TUNEL. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos en cuanto a la positividad para células en apoptosis (prueba exacta de Fisher; $p=0,568$).

El 71% de los cortes histológicos procedentes de meniscos artrósicos humanos y el 40% de los procedentes de meniscos a las 12 semanas de la sección del LCA, si presentaron células inmunoreactivas con la técnica de TUNEL. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos para la técnica de TUNEL (prueba exacta de Fisher; $p=0,130$).

3.4. Distribución de los proteoglicanos

La valoración de la tinción de las muestras con azul alcian procedentes de meniscetomías selectivas en humanos mostró que el 60% de los cortes histológicos presentaban intensa tinción, frente al 10% de los cortes histológicos procedentes de meniscos de conejos sanos o a las 4 semanas de la sección del LCA. La comparación de las diferencias entre los dos grupos alcanzó significación estadística (Chi cuadrado; $p=0,015$).

El 42% de las muestras procedentes de meniscos artrósicos y sólo el 10% de las procedentes de meniscos de conejos a las 12 semanas tras la sección del LCA, mostraron ausencia o leve tinción con azul alcian. La comparación de estos dos grupos no mostró asociación estadísticamente significativa (Chi cuadrado; $p=0,079$).

3.5. Inmunohistoquímica frente a COMP

El anticuerpo frente a la COMP que se empleó para la valoración de las muestras estudiadas resultó ser válido para la inmunotinción de la COMP tanto de tejidos de conejos como de humanos.

La mediana de células inmunoreactivas frente al anticuerpo para la COMP por CGA en el grupo de meniscetomía parcial en humanos fue de 47 (rango de 13-88). La mediana de células por CGA en los meniscos de conejos sanos o a las 4 semanas tras la sección del LCA fue de 70 (rango de 40-132). La comparación entre estos dos grupos mostró significación estadística (U de Mann-Whitney; $p=0,043$).

Se observaron 5 células inmunoreactivas frente al anticuerpo para la COMP de mediana por CGA (rango de 0-21) en el grupo de meniscos artrósicos humanos. En el grupo de meniscos de conejos a las 12 semanas tras la sección del LCA, la mediana de células inmunoreactivas frente a la COMP por CGA fue de 71 (rango de 33 a 142). La comparación de estos dos grupos alcanzó significación estadística (U de Mann-Whitney; $p=0,000$).

La inmunotinción de matriz extracelular con el anticuerpo frente a la COMP mostró una tinción mediana de 1 punto (rango de 0,66 a 3,00) en el grupo de meniscetomía parcial en humanos. En el grupo de meniscos de conejos sanos o a las 4 semanas tras la sección del LCA la mediana fue de 0,00 (rango de 0,00 a 0,80). Las diferencias entre estos grupos alcanzó significación estadística (U de Mann-Whitney; $p=0,000$).

La mediana en el grupo de meniscos artrósicos para la inmunotinción de la matriz extracelular con el anticuerpo frente a la COMP fue de 0 puntos (rango de 0,00 a 1,00) y de 0,20 (rango de 0,00 a 2,60) en el grupo de conejos tras 12 semanas de la cirugía de sección del LCA. Se alcanzó significación estadística al comparar las diferencias entre estos dos grupos (U de Mann-Whitney; $p=0,014$).

1. POBLACIÓN CELULAR EN LOS MENISCOS

Las agresiones a los meniscos provocan procesos de regeneración que implican una modificación en su histología y en su histoquímica (Moon *et al.*, 1984). Tras una agresión al menisco, éste intenta regenerarse y uno de los cambios más conocidos es el de la modificación en su población celular. Se produce un aumento de células de tipo fibroblástico que se podrían transformar en células con aspecto condroide (Moon *et al.*, 1984).

El número de células totales en los meniscos puede ser valorado de diferentes formas. Existen métodos automatizados para contar células mediante programas informáticos que se basan en el color de la tinción de la célula o, algunos más sofisticados, también en la forma y el tamaño de la misma. Estos programas informáticos permiten valorar imágenes fotografiadas de forma rápida tras especificar que criterios queremos que siga para identificar como positiva una célula. El problema surge cuando la muestra está sucia, presenta mucho “fondo” de tinción, las células presentan una forma difícil de dibujar o la tinción es compartida tanto por la matriz extracelular como por las células. En todos estos casos el programa puede estar contando “manchas” del mismo color que las células teñidas pero que en realidad no se corresponden con una célula positiva para la tinción a estudio. El recuento por parte del investigador del número total de células, así como del porcentaje de células teñidas para un determinado marcador, en 10 campos de gran aumento consecutivos es una práctica habitual para el estudio de muestras histológicas por parte de los patólogos (Frkovic-Grazio y Bracko, 2002; Mittal y Demopoulos, 2001; Kim *et al.*, 2007; Alsaad *et al.*, 2007), que aunque muchísimo más arduo, permite evitar el error derivado de la imposibilidad de una máquina para discernir lo que es una célula de lo que no lo es, pero también aumenta la subjetividad del observador. Para evitar este problema, los tejidos fueron estudiados por dos observadores independientes y en caso de falta de consenso en alguna de las muestras (entendido como una diferencia en el número de células contadas por campo de gran aumento mayor de un 5% o no concordancia en las medidas cualitativas) se repitieron las valoraciones conjuntamente para dichas muestras, consiguiendo así un acuerdo absoluto a la hora de la valoración de los tejidos.

El número total de células en meniscos procedentes de menisectomía fue mucho mayor que en meniscos artrósicos de pacientes que se sometieron a una cirugía de PTR, lo que implica una pérdida de población celular en los meniscos con la artrosis. Se observó que los meniscos humanos y de conejos no eran comparables en cuanto a su población celular, apreciándose una celularidad mayor en conejos que en humanos. Así mismo, se observó que la población celular en los conejos es mayor en los meniscos internos que en los externos. Se pudo apreciar también en esta tesis que existe una tendencia al aumento del número de células tras la sección del LCA (tendencia que fue mayor en los meniscos internos que en los externos) en los meniscos de conejos, con una disminución en la población celular a los 3 meses de la sección del LCA. Esos datos parecen indicar que la agresión sufrida por la rodilla del animal provoca que inicialmente aumente la población celular meniscal, pero

que a los 3 meses de la lesión esta capacidad se ha perdido con una población celular que tiende a disminuir respecto a los meniscos sanos.

Los cambios en el número de células meniscales con las agresiones a la rodilla ya se han comunicado previamente. Se observó que la inmovilización de la rodilla de conejos producía una disminución en el número de células desde 98,7 de media en meniscos normales a 28,4 células por 0,1 mm² a las 8 semanas de la inmovilización, y que se producía un incremento de hasta el 122% en el número de células con respecto a los controles si la inmovilización de la rodilla se suprimía a las 6 semanas y que no se alcanzaba el número normal de células en el menisco si la agresión desaparecía a las 8 semanas (Ochi *et al.*, 1997). Del mismo modo, se observó una significativa reducción del número de células a las 48 semanas de haber producido una rotura en asa de cubo en el menisco de perros adultos, rotura que se mantenía luxada gracias a una sutura de la misma a la cápsula anterior de la rodilla, tanto en el cuerpo meniscal como en la periferia del menisco (Nishida *et al.*, 2005). Otros autores, sin embargo, han observado una depleción celular alrededor de fisuras en los meniscos internos a las 3 semanas de la sección del LCA a conejas maduras y zonas prácticamente carentes de células con otras en las que existía un elevado número de células en forma de nidos a las 8 semanas de la sección del LCA (Hellio Le Graverand *et al.* 2001^a). No obstante, no comunicaron el número total de células, y éste se infiere de la concentración de DNA, que si bien no se modificaba en los meniscos externos, se hallaba significativamente disminuido a las 8 semanas (hasta un 66% de los valores control) en los meniscos internos (Hellio Le Graverand *et al.* 2001^d).

Se ha comunicado la capacidad proliferativa de los fibrocondrocitos meniscales en cultivo (Webber *et al.*, 1985). Sin embargo, existe cierta controversia sobre el origen de las células encargadas de reparar el menisco: origen extrínseco a partir de células mesenquimales indiferenciadas o procedentes del tejido sinovial, por ejemplo; o intrínsecas al menisco. La proliferación celular en la zona de menisco desprovista de contacto con la membrana sinovial en un menisco al que se le había producido una rotura en asa de cubo sugiere que el origen de estas células se encuentra en el mismo menisco (Nishida *et al.*, 2005) y que no depende de células extrínsecas al mismo.

Del mismo modo que se produjeron cambios en el número de células, también se comprobó que los meniscos artrósicos presentaban una inmunotinción menor frente a la COMP que los meniscos procedentes de menisctomía, lo que nos indica una posible disminución de la capacidad de síntesis proteica de las células artrósicas. También en conejos se observó un porcentaje mayor de células inmunoteñidas frente a la COMP tras la sección del LCA, porcentaje que descendía a los 3 meses. A tenor de estos datos, parece que la capacidad de síntesis proteica de las células meniscales parece perderse con la artrosis y que las agresiones iniciales causan un aumento en la síntesis proteica que se pierde antes de los 3 meses del inicio de la lesión. La relación entre la concentración de RNA y DNA en un tejido nos puede dar información de la existencia de un estado hipermetabólico en el mismo si dicha relación se encuentra incrementada. Se ha comunicado un leve aumento de la relación RNA/DNA, sólo en meniscos internos, a las 3 semanas de la sección del LCA en conejos con un

espectacular aumento de hasta un 358% a las 8 semanas (Hellio Le Graverand⁴ *et al.* 2001). En esta tesis, sin embargo, se observó un aumento de la síntesis proteica en ambos meniscos a las 4 semanas de la sección del LCA a conejos y, también en ambos meniscos, se producía un descenso a los 3 meses. No obstante, parece que si que queda contrastado que tras una agresión inicial el menisco reacciona incrementando su actividad metabólica, que tal vez se empiece a perder a los 3 meses de la lesión inicial. Este período de tiempo de 3 meses ya es apuntado en otro trabajo clásico de sección del LCA en perros donde se observó un incremento inicial en el contenido de proteoglicanos meniscales que se normalizó a los 3 a 18 meses (Adams *et al.*, 1983). Además, el tiempo que tarda el menisco en cicatrizar tras una lesión en la zona roja es de 10 semanas (Arnoczky y Warren, 1983), por lo que sería de esperar que a los 3 meses ya esté reparado el tejido y ya no se precise de un aumento en la síntesis proteica.

En cuanto a la distribución de las células dentro de los meniscos, se observaron diferencias zonales con un mayor número de células en la sinovial y que disminuía desde la denominada zona roja o periférica del menisco hasta la zona blanca o central. Estas diferencias se vieron en meniscos internos y externos tanto sanos como tras la inestabilización de las rodillas, y se corresponde a la característica vascularización del menisco (McDevitt y Webber, 1990), con un mayor número de células en las zonas más vascularizadas del menisco. Esta característica en su aporte vascular a la zona más periférica, diferencia al fibrocartilago meniscal del cartilago hialino y podría ser la causa de la mayor capacidad de menisco para repararse tras una agresión.

La presencia de nidos celulares únicamente en meniscos de rodillas de conejos a los que se les había cortado el ICA y en meniscos humanos artrósicos, sugiere la posibilidad de que estas agrupaciones sean expresión de un intento reparativo del menisco. El hecho de que los nidos celulares sólo se observaron en rodillas inestables de conejos, que su ubicación fuese alrededor de roturas meniscales y que los meniscos internos (que juegan un papel muy importante para la estabilización de la rodilla tras la sección del LCA) las presentasen con mayor frecuencia, apoya la afirmación de que los nidos celulares son consecuencia de una respuesta del tejido ante una agresión. En el estudio de Hellio Le Graverand *et al.* (2001^a) sólo se comunicó la presencia de nidos celulares en meniscos internos de rodillas a las que se les había cortado el LCA. Estos autores, comunicaron la presencia de estas agrupaciones celulares alrededor de roturas meniscales, en ocasiones con una fuerte tinción para proteoglicanos pero en otras ocasiones la matriz alrededor de las células que formaban estos nidos carecía casi por completo de ellos. En nuestro estudio el 40% de los meniscos internos a las 4 semanas de la sección del LCA presentaban nidos celulares y a las 12 semanas de la sección del LCA se observaron nidos celulares tanto en meniscos internos como en externos. Estos nidos celulares con aspecto condroide podrían corresponder a una metaplasia adaptativa de las células meniscales a una sobrecarga mecánica (Moon *et al.*, 1984). Por otro lado, se ha comunicado también la presencia de células apoptóticas en la mayoría de los nidos celulares que se producían en los meniscos tras la sección del LCA en conejos (Hashimoto *et al.*, 1999). Nidos de condrocitos han sido observados

también alrededor de zonas de cartílago articular lesionado (Okada *et al.*, 1992; Mitrovic *et al.*, 1985) y podrían tener el mismo significado que en los meniscos. Estos hallazgos indican que los nidos celulares no son específicos de los meniscos internos y que podrían estar presentes en cualquier cartílago lesionado, bien se trate de fibrocartílago o de cartílago hialino.

Una teoría más reciente sobre la formación de los nidos celulares en meniscos, y que sus autores sugirieron que podría extrapolarse a otros tejidos como por ejemplo al cartílago hialino artrósico, plantea que su origen podría deberse a una alteración de las interconexiones celulares de los fibrocondrocitos y a procesos de apoptosis y división celular con reorganización celular (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001^b) El verdadero significado de estos nidos celulares no se conoce, pero parece que podrían estar involucrados en un intento de reparación del tejido dañado. La presencia de células apoptóticas en alguno de los nidos celulares observados en los meniscos estudiados en esta tesis podría sugerir que tal vez sólo sean un infructuoso esfuerzo por parte del tejido para repararse. De lo que no parece haber duda es que, independientemente de que respondan a un proceso adaptativo de las células para sobrevivir ante una situación de sobrecarga mecánica o sean un proceso reparativo tisular, los nidos celulares no se encuentran en tejidos normales y aparecen como respuesta a una agresión.

Se ha comunicado un aumento en el contenido de RNA en los meniscos mediales tras la sección del LCA y una disminución significativa del contenido de DNA a las 8 semanas de la sección del LCA (Hellio Le Graverand *et al.* 2001^d). Los conejos estudiados en esta tesis presentaron un aumento inicial en el número de células tanto en los meniscos internos como en los externos a las 4 semanas de la sección del LCA tendiendo a disminuir a las 12 semanas, lo que se correlacionaría con un incremento de la concentración de DNA y no una disminución como la observada por Hellio Le Graverand *et al.* (2001^d). El aumento de células inmunoteñidas frente a la COMP en nuestros conejos podría ser comparable al aumento experimentado en la concentración de RNA tras la sección del LCA en el estudio de Hellio Le Graverand *et al.* (2001^d), en un intento por reparar la matriz extracelular dañada.

Vignon *et al.* (1987) estudiaron 36 rodillas de conejos a las 12 semanas de la sección del LCA. Observaron que se producían cambios histológicos que incluían la reducción del número de células, la alteración de la matriz extracelular y la presencia de amplias lagunas pericondrocíticas antes de que se produjese la fibrilación del cartílago articular. Estos datos, a pesar de haber sido obtenidos en cartílago, estarían de acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis en cuanto a que la pérdida de células observada en la artrosis puede ser una de las causas del desarrollo de la artrosis en los diferentes tejidos que forman parte de la rodilla.

2. CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y MUERTE CELULAR PROGRAMADA

La capacidad del tejido para reaccionar ante una agresión incrementando el número de células y su producción proteica, podría ser una forma de restaurar la arquitectura normal en un tejido que,

como el menisco, carece casi por completo de vascularización (Arnoczky y Warren, 1982). Además de los datos discutidos más arriba que demuestran un incremento en el número de células meniscales tras una agresión inicial a la rodilla e incluso comprobando la existencia de células en mitosis en la histología (Ochi *et al.*, 1997; Nishida *et al.*, 2005), se puede valorar la presencia de células que han abandonado la fase de reposo celular mediante técnicas inmunohistoquímicas que emplean anticuerpos contra proteínas que sólo se expresan en el núcleo de células en división. Una de estas proteínas es la Ki67, proteína nuclear no histona que se expresa en todas las fases del ciclo celular a excepción de G0, que es empleada en el estudio de células tumorales (Gerdes *et al.*, 1983; Landberg y Roos, 1991; Mittal y Demopoulos, 2001; Kim *et al.*, 2007; Alsaad *et al.*, 2007) y que ha sido utilizada para la valoración de la división celular en meniscos en estadios de artrosis precoz (Hellio Le Graverand *et al.* 2001^b).

Se observó la presencia de células con tinción nuclear frente a Ki67 en todas las muestras que procedían de meniscos de pacientes a los que se les realizó una meniscectomía parcial tras rotura meniscal aguda y sólo alrededor de un importante depósito de calcio en una de las muestras procedentes de meniscos artrósicos. Este dato nos podría indicar que las agresiones iniciales estimulan la división celular, y que en meniscos artrósicos y de ancianos, la capacidad proliferativa celular no se ha perdido, pero en las muestras de meniscos artrósicos estudiadas sólo se observaron estas células en división como si de un proceso inflamatorio se tratase para combatir el calcio, en lugar de para reparar el tejido dañado. En los conejos estudiados se observó un incremento en el número de células proliferando tras la sección del LCA en ambos meniscos, pero a los 3 meses el número de estas células disminuyó significativamente.

En un estudio de meniscos internos tras sección del LCA a conejos se evidenció también un aumento de células positivas frente al anticuerpo Ki67 ya a las 2 semanas de la cirugía y mucho mayor a las 3 semanas. Sin embargo, no se vieron en meniscos internos procedentes de rodillas no operadas (Hellio Le Graverand *et al.* 2001^b). Estos autores no estudiaron meniscos externos ni meniscos con una evolución mayor de 4 semanas tras la sección del LCA, pero sus observaciones son comparables a las obtenidas del estudio de los conejos objetos de esta tesis. Esta capacidad de reacción a distintas noxas incrementando el número de células en el tejido podría acabar por perderse en un determinado momento, bien por una agresión muy importante o por múltiples pequeñas agresiones al tejido. Una vez que esto sucediese, las células restantes no tendrían capacidad para producir y organizar la matriz extracelular y el tejido se deterioraría hasta no poder cumplir su función, contribuyendo al daño de los otros tejidos que componen la rodilla.

Del estudio de las muestras meniscales utilizadas para esta tesis, se observó que se produce un aumento en el número de células meniscales tras una agresión inicial y una pérdida de celularidad en estadios avanzados de artrosis. Esta pérdida de población celular meniscal podría deberse tanto a la pérdida de capacidad proliferativa celular como a un aumento de la muerte celular, bien por fenómenos de necrosis del tejido bien por muerte celular programada. La valoración de los tejidos

meniscales procedentes de meniscos artrósicos humanos mostró una presencia de células apoptóticas significativamente mayor que en tejidos procedentes de meniscectomía parcial. Al comparar meniscos sanos de conejos con aquellos procedentes de rodillas a los que se les había cortado el LCA, también se observó una diferencia estadísticamente significativa, con ausencia de apoptosis en todas menos una de las muestras procedentes de meniscos sanos y en casi la mitad de los procedentes de rodillas a los que se les seccionó el LCA. En un estudio de artrosis inducida en conejos por sección del LCA se observó que el número total de células apoptóticas fue significativamente más alto en meniscos de rodillas operadas, estando relacionado el porcentaje de células apoptóticas con el grado histológico de destrucción meniscal (Hashimoto *et al.*, 1999). De esta manera, se comprueba que tras un daño al menisco o en meniscos artrósicos, existe un aumento del número de células con muerte programada lo que junto a la pérdida de la capacidad de las células para dividirse puede contribuir a la disminución de la población celular del menisco y por tanto a la degeneración del mismo. Por tanto, la muerte celular en los meniscos puede contribuir al proceso destructivo del tejido al menos por dos mecanismos. En primer lugar, como consecuencia directa de la muerte de las células, se produce una depleción de los elementos responsables del mantenimiento y remodelado del tejido meniscal. En segundo lugar, se produce una alteración de la matriz extracelular, que mantiene a las células y caracteriza al tejido, por disminución o ausencia de las células.

3. DISTRIBUCIÓN DE LOS PROTEOGLICANOS EN LA MATRIZ

Es probable que la muerte celular en los meniscos contribuya a la degeneración de la matriz después de una lesión meniscal y en la artrosis. En esta tesis se ha observado que se produce una disminución del número de células y de la actividad metabólica de las mismas con la artrosis. Si las células no producen una cantidad suficiente de proteínas de matriz, ésta se desestructurará, no podrá mantener el adecuado microambiente a la célula con lo que las células cada vez tendrán más problemas para mantener la arquitectura meniscal normal, agravándose cada vez más el problema. Además, los fragmentos de moléculas de matriz liberados podrían alterar el metabolismo celular. Si a la lesión del menisco se une la liberación de productos desde el cartílago artrósico y existe una sinovial inflamada que libera metaloproteinasas, se multiplicará el efecto degradativo (Lohmander *et al.*, 1994).

El colágeno ya ha sido ampliamente estudiado tanto en su distribución como en sus cambios con la artrosis (Bullough *et al.*, 1970; Yasui, 1978; Merkel, 1980; Shindo *et al.*, 1981; Eyre y Wu, 1983; Aspden, 1985; Beaupré *et al.*, 1986; Ghosh y Taylor, 1987; Cheung, 1987; Hedbom, 1989; McDevitt y Webber, 1990; Roughley y Lee, 1994; Woo *et al.*, 1994; Wildey *et al.*, 2001; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001^a). Se prefirió el estudio de los proteoglicanos para esta tesis al considerar que éstos se comportan de forma similar a la COMP, uniendo y estabilizando las largas cadenas de colágeno que constituyen el almacén de la matriz extracelular de los meniscos (McNicol y Roughley,

1980; Nakano *et al.*, 1986; Adams y Ho, 1987; Fithian *et al.*, 1990; Roughley y White, 1992; Scott, 1996; Nakano *et al.*, 1997; Neidhart *et al.*, 1997).

Adams *et al.* (1983) estudiaron los cambios que se producían en el contenido de proteoglicanos de la matriz extracelular de meniscos de perros con artrosis de rodilla tras seccionarles el LCA. A la semana de la cirugía de inestabilización de la rodilla, el contenido de proteoglicanos en los meniscos disminuyó. Estos niveles volvieron a cifras de rodillas normales a los 3 a 18 meses tras la sección del LCA y, después de 15 a 18 meses se elevaron por encima de las cifras consideradas como normales.

Se ha comunicado que la rotura meniscal produce cambios en las concentraciones de los glicosaminoglicanos condroitín-sulfato y keratán-sulfato, con una disminución significativa de los mismos a las 48 semanas de haberse provocado la rotura en asa de cubo (Nishida *et al.*, 2005). Estos autores observaron metacromasia al teñir sus muestras con azul de toluidina (que aparece cuando existe producción celular de proteoglicanos) a las 12 y 24 semanas de haber provocado la rotura meniscal y no antes y una considerable disminución a las 48 semanas de la cirugía. Estos glicosaminoglicanos constituyen más del 85% de los que forman los proteoglicanos meniscales (Herwig *et al.*, 1984), por lo que sus modificaciones van a alterar la gran mayoría de proteoglicanos y, por tanto la matriz extracelular.

En nuestro grupo de estudio de meniscos humanos observamos una tendencia a la disminución de los proteoglicanos con la artrosis avanzada, y en el grupo de conejos con sección del LCA se producía un incremento en la concentración de proteoglicanos a las 4 semanas de la agresión (aumento más importante en los meniscos internos que en los externos), incremento que era aun mayor a las 12 semanas. Este aumento en la concentración de proteoglicanos podría estar en relación con un aumento en la concentración de agua (Herwig *et al.*, 1984). Estos resultados parecen coincidir con los de Nishida *et al.* (2005) pero al ser más agresivo nuestro modelo de artrosis en conejo los cambios aparecieron antes y al no disponer de conejos con artrosis avanzada como en humanos no podemos corroborar que se pierda la capacidad de síntesis de proteoglicanos y que disminuya su concentración en la matriz. Creemos que la agresión inicial podría poner en marcha la síntesis proteica por parte de los fibrocondrocitos meniscales incrementando la concentración de proteoglicanos de matriz y transcurrido un cierto período de tiempo se agotaría la posibilidad de incremento de proteínas de matriz. Este período de tiempo seguramente no sea el mismo en todos los animales, tanto por el diferente peso que han de soportar las rodillas como por los distintos patrones de marcha y carga de las rodillas de los diferentes animales. Todos estos datos respaldarían la hipótesis que propone que los meniscos son capaces de ciertas respuestas reparativas ante una agresión.

La pérdida de proteoglicanos grandes parece ser uno de los cambios más tempranos que aparecen en la artrosis. El envejecimiento y la inmovilización de la articulación también han sido asociados a una pérdida de los grandes agregados de proteoglicanos en el cartílago articular que conducirían al desarrollo de la enfermedad artrósica (Buckwalter *et al.*, 1985; Buckwalter *et al.*, 1994).

En otros estudios se observó una disminución en la concentración tanto de proteínas colágenas como no colágenas en las zonas de degeneración meniscal, a lo cual podría deberse la inferior capacidad mecánica de estos tejidos (Ingman *et al.*, 1974; Herwig *et al.*, 1984). Estos datos coinciden con lo observado en esta tesis en los tejidos artrósicos procedentes de pacientes ancianos que se sometieron a cirugía de PTR, cuyos meniscos presentaron una concentración menor de proteoglicanos que los de las muestras procedentes de meniscectomía parcial por rotura meniscal.

4. DISTRIBUCIÓN DE COMP EN LOS MENISCOS

La COMP se concentra principalmente dentro de la matriz territorial del condrocito con capacidad para unirse a éste y a colágenos (Hedbom *et al.*, 1992; DiCesare *et al.*, 1994) y, aunque inicialmente se pensaba que era exclusiva del cartílago hialino (Hedbom *et al.*, 1992), se ha observado en muchos otros tejidos (Fife, 1988; Neidhart *et al.*, 1997; Nguyen y Fife, 1986; Riessen *et al.*, 2001; Neidhart *et al.*, 1997; Di Cesare *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2004). Sin embargo, la función de la COMP, así como su distribución en los meniscos y los cambios en su síntesis y distribución con la artrosis, no han sido estudiados en profundidad hasta la fecha.

A diferencia de los proteoglicanos que son componentes de la matriz extracelular que se unen al agua y proporcionan el característico módulo de elasticidad de la matriz, la COMP es un componente estructural de la matriz del cartílago importante para el mantenimiento de la integridad estructural y de las propiedades mecánicas del cartílago (Hauser *et al.*, 1995; Rosemberg *et al.*, 1998; Di Cesare *et al.*, 1999; Holden *et al.*, 2001; Di Cesare *et al.*, 2002; Gómez-Barrena *et al.*, 2006). Por este motivo, resulta más difícil para el tejido recuperar la COMP perdida que los proteoglicanos.

La valoración de las muestras histológicas tanto de conejos como de los meniscos humanos objeto de este estudio, mostró que esta proteína no presenta una distribución homogénea en el menisco. Se observa en mayores concentraciones en las zonas periféricas de los meniscos (zona roja) para disminuir en las zonas centrales avasculares (zonas blancas). Además, la concentración de esta proteína es mayor en la zona de unión de los meniscos en los cuernos y se concentra profusamente en la sinovial. Estas diferencias en la distribución de la COMP en el cartílago, así como sus cambios con la artrosis o con artritis de la rodilla, y la elevada presencia de la COMP en la sinovial ya había sido comunicado previamente (Di Cesare *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 2001; Gómez-Barrena *et al.*, 2006) pero no en el menisco.

Los meniscos artrósicos mostraron una menor inmunotinción de matriz frente a la COMP respecto a las muestras procedentes de meniscectomía y lo mismo ocurría con el número de células inmunoreactivas frente a la COMP, siendo estas diferencias muy significativas desde el punto de vista estadístico. La hibridación *in situ* de los meniscos humanos también mostró una mayor presencia de núcleos la COMP positivos (hibridaban con la ribosonda anti-COMP humana) en meniscos procedentes de meniscectomías respecto a los meniscos artrósicos. Por otro lado, los meniscos de

conejos estudiados presentaron un aumento de la síntesis de la COMP tras la sección del LCA que disminuía a los 3 meses. Estos datos sugieren que una agresión al menisco podría favorecer la síntesis celular de la COMP y que el establecimiento de la artrosis de rodilla provocaría una pérdida de la capacidad de síntesis de esta proteína, disminuyendo su secreción y concentración en la matriz extracelular. De ser cierta esta afirmación, supondría que la COMP tendría un importante papel en el mantenimiento del menisco normal y que la alteración de su síntesis o distribución conduciría irremediablemente al desarrollo de la artrosis.

La COMP ha sido relacionada con las trombospondinas (TSPs), de hecho fue denominada TSP5. Comparándola con otras TSPs carece del 40% de los residuos amino-terminales, siendo las similitudes con las TSPs mayores en la región carboxi-terminal y en el dominio tipo 3 de unión al calcio, donde aproximadamente el 60% de los residuos están localizados en posiciones homólogas (Oldberg *et al.*, 1992). Al formar parte de esta familia de proteínas, la COMP comparte ciertas características con las otras TSPs pero posee funciones diferentes y un fenotipo característico que le permite diferenciarse de ellas.

La similitud de la COMP con otras TSPs ha suscitado cierta controversia a la hora de su identificación en los tejidos (Di Cesare *et al.*, 1994). El antisuero empleado por Di Cesare *et al.* (1994) frente a la COMP de rata mostró una significativa reacción cruzada frente a TSP1 bovina (Di Cesare *et al.*, 1994). En el diseño que realizamos para obtener un anticuerpo frente a la COMP, se tuvo un especial cuidado en evitar la reacción frente a otras TSPs. Tras aislar la COMP, ésta se purificó, separando las trombospondinas por afinidad cromatográfica en columnas de heparina con Sefarosa CL-6B. Las diferentes fracciones de las cromatografías fueron recogidas y analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico (Laemmli, 1980). Sólo se obtuvo una banda de 116 kDa que fue secuenciada y se determinó su región amino-terminal, la que muestra más diferencias entre la COMP y las otras TSPs, obteniendo una secuencia homóloga en un 98% con la COMP humana. Del mismo modo, se tuvo especial cuidado en el diseño de la ribosonda para la realización de la técnica de hibridación in situ, diseñando bs cebadores de acuerdo con la secuencia génica de la COMP humana, encontrada en la base de datos *GenBank*, teniendo especial cuidado en que dichos cebadores no hibridasen con otras trombospondinas humanas, de tal modo la ribosonda obtenida sólo difería en un aminoácido de la secuencia de la COMP humana. Estos datos muestran la especificidad del antisuero y de la ribosonda empleados para el estudio de la COMP en nuestras muestras histológicas de meniscos.

La función que desempeña la COMP no es del todo conocida. Se cree que interactúa intensamente con los condrocitos y con otros componentes de la matriz extracelular (Hedbom *et al.*, 1992; DiCesare *et al.*, 1994; Neidhart *et al.*, 1997). Puede unirse a colágenos I, II, y IX; y procolágenos I y II, lo que le permite unir entre sí fibras de colágeno (Rosenberg *et al.*, 1998; Thur *et al.*, 2001; Holden *et al.*, 2001). Desempeña una importante función en el ensamblaje de la matriz extracelular y en las interacciones proteicas matriz-matriz (Di Cesare *et al.*, 2002). Todos estos datos

explican su importancia en el mantenimiento de la red tridimensional típica de la matriz de los meniscos y cartílagos.

Recientemente se ha publicado un trabajo que atribuye a la COMP una importante función para evitar la muerte celular (Gagarina *et al.*, 2005). Estos autores han observado que la COMP es capaz de bloquear la activación de la caspasa-3 (tanto en presencia como en ausencia del factor de necrosis tumoral alfa) que es un enzima determinante en los procesos de apoptosis. Si se confirma que la COMP es un potente supresor de la apoptosis, tendría una gran importancia y respondería a algunas de las preguntas planteadas en esta tesis, imbricando los distintos parámetros que en ella se han estudiado. Si como se deduce en esta tesis la artrosis se caracteriza por una disminución de la población celular, de la producción proteica con disminución de la COMP y aumento de fenómenos de apoptosis; y la COMP realmente inhibe la muerte celular programada impidiendo, por tanto, la disminución del número de células productoras de las proteínas normales de la matriz extracelular (entre las que se incluye la COMP), podría indicar que la COMP no sólo posee una función estructural en el mantenimiento del menisco que se pierde con la artrosis evolucionada, sino que juega un papel fundamental dentro del ciclo de retroalimentación del control de la normal homeostasis meniscal. De este modo, se podrían desarrollar fármacos constituidos por la COMP, o por alguno de sus fragmentos, para tratar de regular la evolución de la artrosis.

La mutación en el gen que codifica la COMP provoca pseudocondroplasia (Rimoin *et al.*, 1994; Stevens, 1999; Kennedy *et al.*, 2005). Sin embargo, el normal crecimiento y desarrollo de los ratones modificados genéticamente para que no sinteticen la COMP demuestra que la mutación en la proteína y no su ausencia son la causa de la pseudocondroplasia (Stevens, 1999). Es decir, parece que la COMP es fundamental para el adecuado ensamblaje del colágeno y para que las moléculas de colágeno interaccionen adecuadamente con el condrocito, pero su ausencia no provocaría pseudocondroplasia. Si la alteración de la COMP en la pseudocondroplasia conduce a artrosis precoz, podemos pensar que esta molécula puede jugar un papel importante en el desarrollo de la artrosis. El estudio de los cambios de esta proteína en la artrosis en tejidos sometidos a un aumento de presión, como son los meniscos, sin que necesariamente signifique una pérdida del tejido como el encontrado en las zonas de cartílago con lesiones osteocondrales, nos da una idea de la trascendencia de esa molécula en el establecimiento y desarrollo de la artrosis de rodilla.

5. PAPEL DE LOS MENISCOS EN LA ARTROSIS

La importancia y la asociación entre las lesiones meniscales junto a lesiones del cartílago articular femorotibial son ampliamente conocidas. Lewandrowski *et al.* (1997) en un estudio retrospectivo de 1740 rodillas, describieron la asociación entre roturas longitudinales, en asa de cubo y complejas del menisco con la presencia de daño del cartílago articular, observadas mediante artroscopia. Estos autores encontraron una asociación mucho mayor entre estos tipos de rotura

meniscal y el daño del cartílago que con roturas horizontales o radiales. Así mismo, encontraron que la frecuencia de lesiones en el menisco medial estaba mucho más relacionada con degeneración del cartílago femorotibial que las lesiones del menisco lateral y que el grado de degeneración del menisco también se encuentra relacionado con el grado de lesión tanto en el compartimento femorotibial medial como en el lateral.

También se conoce la asociación entre la inestabilidad de la rodilla por insuficiencia del LCA y la rotura longitudinal del menisco medial asociado a un aumento en el daño del cartílago articular (Kobayashi *et al.*, 1998) y se ha encontrado asociación entre el grado de artrosis de rodilla y la presencia de roturas meniscales (Noble y Hamblen, 1975). Sin embargo, y a pesar de encontrar una frecuencia del 57% de roturas meniscales en el estudio macroscópico de 115 rodillas de cadáveres, Fahmy *et al.* (1983) no encontraron asociación entre la patología meniscal y el grado de lesión o distribución de la lesión del cartílago femorotibial. Del mismo modo Casscells (1978) en un estudio de 369 rodillas de cadáver y 100 artroscopias no seleccionadas de rodilla, observó un cartílago articular sin lesiones en un 7,5% de las rodillas de cadáver y en un 20% de las artroscopias que presentaban lesiones meniscales. Además, el 52,5% de las rodillas que estudió con meniscos intactos mostraban diferentes grados de degeneración de la superficie del cóndilo femoral adyacente. A pesar de que este autor no pudiera establecer una relación causa-efecto entre las roturas meniscales y las lesiones del cartílago articular, parece ampliamente demostrado por otros estudios (Hashimoto *et al.*, 1999, Krause *et al.*, 1976; Seedholm y Hageaves, 1979; Kurosawa *et al.*, 1980; Ahmed y Burke, 1983; Hellio Le Graverand *et al.* 2001^{a,b,c,d}), incluidos los experimentales (Moskowitz *et al.*, 1973), que existe relación entre las lesiones meniscales y el desarrollo de gonartrosis, pero si confirma el hecho de que no todos los meniscos de las rodillas artrósicas están dañados.

Se han comunicado los cambios que acontecen tras la sección del LCA en los meniscos de conejos, tanto en sus células, en la matriz extracelular como en su estructura molecular sugiriendo incluso que dichos cambios podrían preceder a los que se producen en el cartílago articular (Hellio Le Graverand *et al.* 2001^{a,b,c,d}). En nuestro estudio encontramos una alta coincidencia entre las lesiones del cartílago y las meniscales tras sección del LCA en conejos, lesiones severas que se producían incluso antes de los 3 meses de la inestabilización de la rodilla. Estos hallazgos coinciden con los comunicados por otros autores que observaron lesiones en el cartílago humano tras la rotura del LCA en menos de 3 meses desde la lesión, incluyendo fracturas condrales (Fang *et al.*, 2001).

En esta tesis se encontraron meniscos degenerados y con roturas en los pacientes que se sometieron a cirugía de prótesis total de rodilla, pero no en todos los casos la lesión meniscal fue tan grave como se esperaba en relación a la lesión del cartílago femorotibial. No obstante, la artrosis de rodilla no se desarrolla de una manera uniforme, ni existe una única causa de gonartrosis como se apuntó en la introducción. La artrosis de rodilla es una enfermedad multifactorial y las lesiones meniscales son una de las causas conocidas que conducen al deterioro del cartílago articular.

Los meniscos tienen una función biomecánica muy importante en la rodilla. La consecuencia inmediata de la resección de los meniscos es una disminución del área de contacto de un 50 a un 75% y a un incremento de dos a tres veces de la presión de contacto (Krause *et al.*, 1976; Seedholm y Hagraeves, 1979; Kurosawa *et al.*, 1980; Ahmed y Burke, 1983), lo que explicaría la degeneración del cartílago femorotibial tras una menisctomía. Una lesión crónica del menisco provoca una incapacidad crónica, en parte relacionada con la capacidad limitada del menisco para regenerarse. Las lesiones meniscales pueden ser causa de gonartrosis secundaria y, en la mayoría de los casos de artrosis de rodilla la enfermedad también afecta a los meniscos.

La rodilla precisa de todos sus elementos en perfectas condiciones y completamente coordinados para que su función sea la adecuada, por eso, independientemente de cual sea la causa inicial que desencadene la artrosis o el tejido en el que se produzca el daño inicial, la alteración en una de sus estructuras provocará que el resto se deteriore. Si, por ejemplo, existe una rotura meniscal asociada a una inestabilidad ligamentosa en un individuo con un eje de carga alterado, el deterioro de un cartílago articular por lo demás sano será mucho más acelerado. Por otro lado, si existe una incongruencia del cartílago articular por una lesión condral u osteocondral se producirá sinovitis con liberación de sustancias degradativas al líquido articular y roturas meniscales, por el efecto mecánico de la lesión y por la alteración del microambiente, al alterarse la nutrición y los procesos reparativos del fibrocartílago meniscal. Creemos que en la gonartrosis primaria es más probable que coexistan más de dos patologías en la rodilla (degeneración del cartílago y roturas meniscales, por ejemplo) a que exista una relación de causalidad entre ellas; es decir, que más que la enfermedad dañe un tejido concreto, ésta afecte a todos los tejidos de la articulación en mayor o menor medida y que la interacción entre los tejidos dañados empeore la patología.

Al igual que ocurre con el cartílago hialino, el fibrocartílago meniscal también se caracteriza por cambios relacionados con la edad que incluyen alteraciones de su estructura y elevada frecuencia de calcificaciones anormales (Hough y Weber, 1990; Fahmy *et al.*, 1983; Noble y Hamblen 1975; Hashimoto *et al.*, 1999). Es frecuente observar calcificaciones en el lugar que corresponde a los meniscos en muchas radiografías de pacientes de cierta edad, ya que los meniscos son las estructuras más frecuentemente afectadas por depósito de cristales de pirofosfato cálcico dihidratado. Estos cristales se han observado cerca de áreas con una importante degeneración meniscal (Brandes y Muller, 1995) y también se observaron formaciones de cristales alrededor de células condrocíticas hipertróficas (Masuda *et al.*, 1991; Ohira *et al.*, 1988). La muerte celular programada en el menisco podría contribuir a la pérdida de matriz extracelular y a la calcificación de los meniscos (Hashimoto *et al.*, 1999). Los cuerpos apoptóticos derivados de condrocitos contienen fosfatasa alcalina que puede precipitar calcio (Hashimoto *et al.*, 1998^{a,b}). En nuestro estudio, encontramos que el 16% de los meniscos procedentes de pacientes con gonartrosis que se sometieron a cirugía de prótesis de rodilla, presentaban importantes calcificaciones en los cortes histológicos estudiados, cifra muy próxima al 18% de meniscos calcificados en un estudio de 400 meniscos de cadáver (Noble y Hamblen, 1975).

La función protectora de los meniscos sobre el cartílago de la rodilla se mantiene aun cuando estén degenerados. Ésta afirmación está avalada por el hecho de que las rodillas mejor conservadas o con una mayor cantidad de cartílago hialino conservado presentan meniscos conservados y por la asociación entre meniscectomías y la presencia de hueso ebúrneo desprovisto de cartílago hialino (Fahmy *et al.*, 1983). En nuestro grupo de estudio de inestabilidad en conejo por sección del LCA, también encontramos una asociación entre el daño del cartílago y las roturas meniscales. A las 12 semanas de la sección del LCA, ninguna de las rodillas operadas mostró un cartílago normal, con un 40% de rodillas con lesiones del cartílago de espesor completo y con roturas meniscales en todas las rodillas operadas. Estos datos confirman la asociación entre lesiones del cartílago y del menisco, además del hecho de que suelen asociarse lesiones mayores meniscales con grados mayores de degeneración del cartílago hialino, independientemente de donde se haya originado inicialmente la lesión.

6. COMPARACIÓN ENTRE MENISCOS HUMANOS Y DE CONEJOS

Se han estudiado ampliamente los cambios que se producen en los tejidos de la rodilla artrósica, en especial las modificaciones que se producen respecto a rodillas sanas en el cartílago articular y en la sinovial (Buckwalter *et al.*, 1985; Buckwalter *et al.*, 1986; Buckwalter y Roughley, 1987; Brandt *et al.*, 1991; Okada *et al.*, 1992; Mankin y Brandt, 1992; Von der Mark *et al.*, 1992; Salter, 1993; Chevalier *et al.*, 1994; Buckwalter y Martin, 1995; Blanco *et al.*, 1995; Mankin *et al.*, 1995; Buckwalter y Lane, 1996; Martin y Buckwalter, 1996^a; Buckwalter y Mankin, 1997; Di Cesare *et al.*, 1997; Di Cesare *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2001; Gómez-Barrena *et al.*, 2006). Sin embargo, se han estudiado mucho menos los cambios que acontecen en los meniscos de rodillas artrósicas, o si éstos podrían preceder en algunas ocasiones a los que ocurren en los otros tejidos de la rodilla.

Si resulta complicado conocer los cambios que se producen con la artrosis en la rodilla, mucho más difícil es estudiar los cambios precoces, y más difícil aun es conocer estas modificaciones en el ser humano. Varios modelos experimentales han ofrecido la oportunidad de conocer que sucede en las primeras fases de la enfermedad (Moskowitz *et al.*, 1973; Oegema y Visco, 1999; Brandt, 2002), siendo la inestabilización de la rodilla por sección del LCA uno de los modelos más ampliamente empleados (Pond y Nuki, 1973; Vignon *et al.*, 1987; Yoshioka *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1998^b; Sah *et al.*, 2003). Hashimoto *et al.* (1998^b) comunicaron los cambios que se producían de forma precoz en el cartílago hialino y en la sinovial de conejos tras la sección del LCA. Adams *et al.* (1983) fueron los primeros en comunicar cambios del menisco tras sección del LCA en perros, pero en realidad sólo describieron cambios en la morfología de los mismos, tales como la presencia de fibrilación o roturas, y en la concentración de agua y glicosaminoglicanos. Hellio Le Graverand *et al.* (2001^{a,d}) si aportaron información sobre los cambios que se producían en los meniscos tras sección del

LCA tanto a nivel histológico (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001^a) como molecular (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001^d).

No se han publicado trabajos hasta la fecha en los que se estudien cambios secuenciales en meniscos humanos. Es evidente que éste tipo de ensayo clínico no es viable desde el punto de vista ético, por eso nosotros tratamos de valorar los cambios en meniscos procedentes de rodillas humanas con artrosis avanzadas y compararlos con los que supusimos serían cambios similares a los estadios iniciales de artrosis. Para ello, diseñamos un grupo de pacientes para el estudio que debían cumplir unos criterios muy restrictivos. Consideramos que la parte más representativa de la lesión meniscal era el cuerno posterior del menisco interno, al ser la zona más frecuentemente dañada por soportar las mayores cargas en rodillas varas. Pensamos que las roturas traumáticas en pacientes jóvenes, de menos de 3 meses de evolución y en los que se comprobaba mediante la técnica quirúrgica (en este caso la meniscectomía selectiva artroscópica) que el estado del cartílago era saludable y que nos proporcionase una cantidad suficiente de tejido para el estudio, podría ser la situación más parecida a una lesión inicial controlada y predecible en un hipotético ensayo clínico en humanos. A pesar de que no podemos saber si estos tejidos se corresponderían exactamente con los cambios iniciales en los meniscos artrósicos, creemos que podría aceptarse que un menisco de una rodilla sana y estable experimentaría cambios tras una rotura del mismo modo que lo haría en el seno de las fases iniciales de una enfermedad de desgaste que, como la artrosis, provocaría cambios en todos los tejidos que forman parte de la rodilla.

Al no poder realizar un estudio secuencial de los cambios en los meniscos en artrosis humana, y para tratar de comprender si las diferencias existentes entre los tejidos meniscales procedentes de meniscectomía y los procedentes de rodillas artrósicas se corresponden con estadios precoces y tardíos de la artrosis normal de rodilla, se diseñó un modelo secuencial, con poca variabilidad y predecible de artrosis en conejos por sección del LCA. Este modelo de artrosis por inestabilidad ha sido ampliamente empleado en experimentación, inicialmente en perros (Pond y Nuki, 1973) y después en conejos donde se han demostrado cambios característicos de lesiones artrósicas en períodos de tiempo más cortos que en los perros (Vignon *et al.*, 1987; Sah *et al.*, 2003; Yoshioka *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1998^b).

Podría discutirse el hecho de haber empleado las rodillas no operadas de los conejos como control en lugar de rodillas sanas de otros conejos, argumentando que las rodillas no operadas habrían estado sometidas a una sobrecarga intentando evitar el apoyo de la lesionada. Sin embargo, el empleo de las rodillas contralaterales como controles evita el sufrimiento de un mayor número de animales.

La comparación entre los tejidos meniscales de conejos procedentes de rodillas sanas o tras 4 semanas de la sección del LCA y los procedentes de meniscectomía parcial en humanos (en cuanto a número de células, proliferación celular, apoptosis, síntesis de la COMP y proteoglicanos de matriz) presentó más similitudes que la comparación de los tejidos procedentes de meniscos humanos artrósicos y los de rodillas de conejos tras 12 semanas de la sección del LCA. El número de células fue

muy diferente entre los meniscos humanos y de conejo, tanto en meniscos poco dañados o sanos como en los muy deteriorados. Salvando las diferencias entre especies, podríamos tratar de equiparar los meniscos sanos o los procedentes de rodillas tras 4 semanas de la sección del LCA con meniscos humanos sanos o con los fragmentos obtenidos de meniscectomía parcial tras rotura meniscal traumática. Sin embargo, no parecen comparables los meniscos procedentes de rodillas de conejos a los 3 meses de la sección del LCA con meniscos procedentes de rodillas humanas con artrosis avanzadas, ya que estos últimos llevarían mucho más tiempo sufriendo las distintas agresiones y el daño sufrido no se debería sólo a la inestabilidad de la rodilla.

Posiblemente hubiese sido muy interesante haber podido relacionar los cambios en el cartílago con los de los meniscos, tanto a nivel celular como molecular. Sin embargo, por un lado no existía la posibilidad de obtener cartílago de zona de carga correspondiente a los meniscos internos, ya que todos nuestros pacientes que se sometieron a cirugía de PTR presentaban lesiones avanzadas con pérdida del cartílago en dicha localización (todas eran rodillas varas con mayor afectación del compartimento femorotibial medial) y por otro lado no existía la posibilidad de estudiar el cartílago en el grupo de pacientes con rotura del cuerno posterior del menisco interno, ya que eran pacientes por lo demás sanos y no tendría justificación alguna el haber cogido muestras de un cartílago sano de un paciente vivo con el único propósito de realizar este estudio. Podríamos haber estudiado cartílago de otras localizaciones de las rodillas artrósicas, pero no se habrían correspondido con las zonas más dañadas y tampoco disponíamos de cartílago sano para comparar. Este problema se podría haber subsanado comparando con tejidos procedentes de cadáver, pero no podríamos haber seleccionado el estado meniscal previo, y el interés de nuestro estudio se centraba en conocer lo que sucedía en los meniscos, tejido por otro lado mucho menos estudiado que el cartílago hialino. Además, los meniscos procedentes de autopsias habrían presentado cambios anóxicos con cambios autolíticos precoces que habrían impedido conocer la población celular normal del menisco y el número de células en mitosis y en apoptosis en condiciones normales.

En resumen, los meniscos experimentan cambios en la distribución de sus células y en la composición y organización de la matriz extracelular con la artrosis y lo mismo sucede con la proteína oligomérica de la matriz del cartílago. Esta proteína de relativamente reciente descripción, parece jugar un papel fundamental en el mantenimiento de la matriz extracelular de muchos tejidos. En los meniscos la alteración de su síntesis o la alteración en su distribución en la matriz extracelular, parece que provoca la desorganización de la red tridimensional de colágeno y cambia las propiedades del fibrocartílago y por tanto de sus funciones.

Con los resultados de este trabajo se puede rechazar la hipótesis nula que abogaba porque los meniscos no tienen capacidad reparativa ni sufren cambios en su composición durante la artrosis, al haber comprobado que estos cambios se producen tanto en las células como en la matriz extracelular. En respuesta a los objetivos concretos planteados en esta tesis, puede concluirse que:

IA. En respuesta al primer objetivo planteado, sobre el número de células en los meniscos y los cambios en la población celular con la artrosis, se observa que:

- Existe una pérdida del número de células en los meniscos artrósicos
- Las lesiones iniciales del menisco provocan un aumento en la síntesis celular y en la concentración de proteínas de matriz.
- Tras confirmar que el modelo de inestabilidad de la rodilla por sección del LCA conduce a la lesión macroscópica de los meniscos y del cartílago en menos de 3 meses, se observa que estas lesiones producen cambios en la composición de los meniscos.

IB. Se produce un aumento de la proliferación celular en los meniscos en fases iniciales de la artrosis y esta capacidad se pierde cuando la enfermedad está evolucionada, conclusión que se deduce porque:

- Los meniscos sanos reaccionan ante una agresión mediante un aumento en el número de células en división, lo que permite aumentar su número total. En fases de artrosis avanzadas apenas se observan células en división.
- Se detecta una pérdida de población celular en los meniscos en fases avanzadas de la artrosis. Esta reducción en el número de células se debe en parte al aumento de fenómenos de muerte celular programada, ya que se observa un aumento de células en apoptosis en meniscos artrósicos.
- Se observan áreas de abundantes nidos celulares alrededor de roturas meniscales, lo que puede tener importancia en las interpretaciones de la literatura que relacionan estas estructuras con un proceso reparativo o de sobrecarga en el tejido.

II. En respuesta al segundo objetivo de la tesis, los cambios que en la concentración de proteoglicanos sufren los meniscos con la artrosis, hay que decir que estos cambios se caracterizan por una tendencia al aumento de los mismos en la matriz extracelular tras una agresión inicial al menisco, que parece perdurar al menos durante 3 meses, y que en los estadios finales de la artrosis existe una tendencia a la depleción de dichos proteoglicanos.

III. En cuanto a los cambios que sufre la Proteína Oligomérica de la Matriz del Cartílago (COMP) se concluye que:

- Se ha conseguido diseñar una ribosonda específica para la COMP capaz de hibridar con la secuencia de DNA humana y un anticuerpo específico para la COMP que permitió conocer la concentración de esta proteína en la matriz y en el citoplasma celular de humanos y conejos.
- La COMP se encuentra distribuida por todo el menisco, aunque su concentración es mayor en la sinovial y en las zonas próximas a la sinovial (la denominada zona roja del menisco), así como en las zonas de inserción de los cuernos meniscales.
- Las agresiones al menisco producen un aumento en la síntesis de la COMP y en fases avanzadas de artrosis se observa una depleción de la misma así como una disminución en la síntesis por parte de las células meniscales. Estos datos refuerzan la función de la COMP en el mantenimiento de la arquitectura meniscal normal.

- Adams ME, Billingham ME, Muir H. The glycosaminoglycans in menisci in experimental and natural osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1983; 26: 69-76.
- Adams ME, Ho YA. Localization of glycosaminoglycans in human and canine menisci and their attachments. *Connect Tissue Res.* 1987; 16: 269-79.
- Ahlbäck S. Osteoarthrosis of the knee. A radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn.* 1968; 227 (suppl): 7-72.
- Ahmed AM. The load-bearing role of the knee menisci. In: Mow VC, Arnoczky SP, Jackson DW, eds. *Knee meniscus: Basic and clinical foundations.* New York Raven Press. 1992. p. 59-73.
- Ahmed AM, Burke DL. In-vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints-- Part I: Tibial surface of the knee. *J Biomech Eng.* 1983; 105: 216-25.
- Alsaad KO, Serra S, Schmitt A, Perren A, Chetty R. Cytokeratins 7 and 20 immunoexpression profile in goblet cell and classical carcinoids of appendix. *Endocr Pathol.* 2007; 18: 16-22.
- Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986; 29: 1039-1049.
- Anderson H, Bro-Rasmussen F. Histochemical studies on the histogenesis of the joints in human fetuses with special reference to the development of the joint cavities in the hand and foot. *Am J Anat.* 1961; 108: 111-122.
- Anderson JJ, Felson DT. Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am J Epidemiol.* 1988; 128: 179-189.
- Aspden RM, Yarker YE, Hukins DKL. Collagen orientation in the menisci of the knee joint. *Journal of Anatomy.* 1985; 140: 371-380.
- Arnoczky SP, Marshall JL, Joseph A, Jahre C, Yoshioka. Meniscal diffusion: an experimental study in the dog. *Trans Orthop Res Soc.* 1980; 5: 42.
- Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med.* 1982; 10: 90-95.
- Arnoczky SP, Warren RF. The microvasculature of the meniscus and its response to injury: an experimental study in the dog. *Am J Sports Med.* 1983; 11: 131-141.
- Assimakopoulos U, Katonis PG, Agapitos MV, Exarchou EI. The innervation of the human meniscus. *Clin Orthop* 1992; (275): 232-236.
- Athanasou NA. Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis.* 1995; 54: 392-394.
- Aydelotte MB, Michal LE, Reid DR, Schumacher BL. Chondrocytes from the articular surface and deep zone express different, but stable phenotypes in alginate gel culture. *Trans Orthop Res Soc.* 1996; 21: 317.

- Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE. Heterogeneity of articular chondrocytes. In: Kuettner KE, Scheleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC, editors. Articular cartilage and osteoarthritis. New York: Raven Press; 1992. p. 237-249.
- Baratz ME, Fu FH, Mengato R. Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee. A preliminary report. *Am J Sports Med.* 1986; 14: 270-5.
- Barlannd P, Novikoff AB, Hamerman D. Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol.* 1962; 14: 207- 220.
- Basdra EK, Huber LA, Komposch G, Papavassiliou AG. Mechanical loading triggers specific biochemical responses in mandibular condylar chondrocytes *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1222: 315-322.
- Beaupré A, Choukroun R, Guidouin R, Carneau R, Gerardin H. Knee menisci: correlation between microstructure and biomechanics. *Clin Orthop Relat Res.* 1986; 208: 72-75
- Bird MD, Sweet MB. A system of canals in semilunar menisci. *Ann Rheum Dis.* 1987; 46: 670-673.
- Bird MD, Sweet MB. Canals in the semilunar meniscus: brief report. *J Bone Joint Surg.* 1988; 70(B): 839.
- Blanco F.J., Ochs R.L., Schwarz H., Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol.* 146: 75-85, 1995
- Bland YS, Ashhurst DE. Changes in the content of the fibrillar collagens and the expression of their mRNAs in the menisci of the rabbit knee joint during development and ageing. *Histochem J.* 1996; 28: 265-274.
- Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Sola L, Ng KH, Boruguignon J, Lasselin C et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res.* 1994; 212: 97-104.
- Bornstein P. The biosynthesis of collagen. *Annu Rev Biochem* 1974; 43: 567- 603.
- Bornstein P, Sage EH. Thrombospondins. *Methods Enzymol.* 1994; 245: 62–85.
- Bornstein P, O'Rourke K, Wikstrom K, Wolf FW, Katz R, Li P, et al. A second, expressed thrombospondin gene (Thbs2) exists in the mouse genome. *J Biol Chem.* 1991; 266: 12821 - 12824.
- Brandes A, Muller KM. Calcinosis of the meniscus: morphologic and roentgenographic findings for zonal classification. *Pathologie.* 1995; 16: 269–277.
- Brandt KD. Animal models of osteoarthritis. In: Slotz JF, ed. *Mechanobiology: Cartilage and Chondrocyte.* Vol 2. Amsterdam: IOS Press; 2002. p. 221-236.

- Brandt KD, Fife RS, Braunstein EM, Katz B. Radiographic grading of the severity of knee osteoarthritis: relation of the Kellgren and Lawrence grade to a grade based on joint space narrowing, and correlation with arthroscopic evidence of articular cartilage degeneration. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 1381-1386.
- Bredella MA, Tirman PF, Peterfy CG, Zarlingo M, Feller JF, Bost FW, et al. Accuracy of T2-weighted fast spin-echo MR imaging with fat saturation in detecting cartilage defects in the knee: comparison with arthroscopy in 130 patients. *AJR Am J Roentgenol.* 1999; 172: 1073-1080.
- Briggs MD, Chapman KL. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2002; 19: 465-478.
- Buckwalter JA, Kuettner KE, Thonar EJM. Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *J Orthop Res.* 1985; 3: 251-257.
- Buckwalter JA. Activity vs. rest in the treatment of bone, soft tissue and joint injuries. *Iowa Orthop J.* 1995; 15: 29-42.^a
- Buckwalter JA. Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse and abuse: experimental studies. *J Rheumatol.* 1995; 43 (supplement): 13-15.^b
- Buckwalter JA, Lane NE. Aging, sports and osteoarthritis. *Sports Med and Arthrosc Rev.* 1996; 4: 276-287.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone and Joint Surg.* 1997; 79-A: 600-611.^a
- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthrosis, repair regeneration and transplantation. *J Bone and Joint Surg.* 1997; 79-A: 612-632.^b
- Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LC. Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *Microsc Res Tech.* 1994; 28: 398-408.
- Buckwalter JA, Mow VC. Cartilage repair in osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ, editors. *Osteoarthritis, diagnosis and medical/surgical management.* Philadelphia: Saunders. 1992. p. 71-107.
- Buckwalter JA, Martin JA. Degenerative joint disease. *Clinic Symp.* 1995, 47: 1-32.
- Buckwalter JA, Rosenberg LC, Tang LH. The effect of link protein on proteoglycan aggregate structure. *J Biol Chem.* 1984; 259: 5361-5363.
- Buckwalter JA, Roughley PJ. Age-related changes in human articular cartilage proteoglycans. *Orthop Transact.* 1987; 11: 307-308.
- Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB. Articular cartilage: composition, structure, response to injury and methods of facilitation repair. In: Ewing JW, ed. *Articular cartilage and knee joint function. Basic science and arthroscopy.* New York: Raven Press. 1990. p. 19-56.

- Buckwalter JA, Woo SLY, Goldberg VM, Hadley EC, Booth F, Oegema TR, Eyre DR. Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone and Joint Surg.* 1993; 75-A: 1533-1548.
- Bullough PG, Jagannath A. The morphology of the calcification front in articular cartilage. Its significance in joint function. *J Bone Joint Surg Br.* 1983; 65: 72-78.
- Bullough PG, Munuera L, Murphy J, Weinstein AM. The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure. *J Bone Joint Surg.* 1970; 52(B): 564-567.
- Bullough PG, Yawitz PS, Tafra L, Boskey AL. Topographical variations in the morphology and biochemistry of adult canine tibial plateau articular cartilage. *J Orthop Res.* 1985; 3: 1-16.
- Cao M, Stefanovic-Racic M, Georgescu HI, Miller LA, Evans CH. Generation of nitric oxide by lapine meniscal cells and its effect on matrix metabolism: stimulation of collagen production by arginine. 1998; *J Orthop Res.* 16: 104-111.
- Casscells SW. The torn or degenerate meniscus and its relationship to degeneration of the weight-bearing areas of the femur and tibia. *Clin Orthop.* 1978; 132: 196-200.
- Chen H, Deere M, Hecht JT, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein is a calcium-binding protein, and a mutation in its type 3 repeats causes conformational changes. *J Biol Chem.* 2000; 275: 26538– 26544.
- Cheung HS. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res.* 1987; 16: 343-356.
- Chevalier X, Groult N, Larget-Piet B, Zardi L, Hornebeck W. Tenascin distribution in articular cartilage from normal subjects and from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 1013-1022.
- Clark JM. The organization of collagen in cryofractured rabbit articular cartilage: a scanning electron microscopic study. *J Orthop Res.* 1985; 3(1):17-29
- Clarke IC. Articular cartilage: a review and scanning electron microscope study. II. The territorial fibrillar architecture. *J Anat.* 1974; 118: 261-80.
- Clark CR, Ogden JA. Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury. *J Bone Joint Surg.* 1983; 65: 538-547.
- Cs-Szabó G, Roughley PJ, Plaas AHK, Glant TT. Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilages. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 660-668.
- Daniel DM, Biden EN. The language of knee motion. In: Jackson DW, Drez D, eds. *The anterior cruciate deficient knee: new concepts in ligament repair.* St Louis: CV Mosby, 1987.
- Day B, Mackenzie WG, Shim SS, Leung G. The vascular and nerve supply of the human meniscus. 1985; 1(1):58-62.

- Delbruck A, Dresow B, Gurr E, Reale E, Schroder H. In-vitro culture of human chondrocytes from adult subjects. *Connect Tissue Res.* 1986; 15: 155-172.
- DeHaven KE. The role of the meniscus. In: Ewing Jw, ed. *Articular cartilage and knee joint functions: Basic science and arthroscopy.* New York: Raven Press; 1990. p. 103-115.
- Di Cesare PE, Carlson CS, Stollerman ES, Chen FS, Leslie M, Perris R. Expression of cartilage oligomeric matrix protein by human synovium. *FEBS Lett.* 1997; 412: 249-252.
- Di Cesare PE, Chen FS, Moergelin M, Carlson CS, Leslie MP, Perris R, et al. Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. *Matrix Biol.* 2002; 21: 461-470.
- Di Cesare PE, Fang C, Leslie MP, Della Valle CJ, Gold JM, Tulli H, et al. Localization and expression of cartilage oligomeric matrix protein by human rheumatoid and osteoarthritic synovium and cartilage. *J Orthop Res.* 1999; 17: 437-445.
- DiCesare PE, Mörgelin M, Mann K, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage, electron microscopic structure, and chondrocyte binding. *Eur J Biochem.* 1994; 223: 927-937.
- Egli PS, Hunziker EB, Schenk RK. Quantitation of structural features characterizing weight and less-weight-bearing regions in articular cartilage – a stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits. *Anat Rec.* 1988; 222: 217-227.
- Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 2002; 4: 30-35.
- Eyre DR. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science.* 1980; 207: 1315-1322.
- Eyre DR, Wu JJ. Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett.* 1983; 158: 265-270.
- Fahmy NR, Williams EA, Noble J. Meniscal pathology and osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg.* 1983; 65(B): 24-28.
- Fang C, Johnson D, Leslie MP, Carlson CS, Robbins M, Di Cesare PE. Tissue distribution and measurement of cartilage oligomeric matrix protein in patients with magnetic resonance imaging-detected bone bruises after acute anterior cruciate ligament tears. *J Orthop Res.* 2001; 19: 634-641.
- Felson DT. The epidemiology of knee osteoarthritis: results from the Framingham Osteoarthritis Study. *Semin Arthritis Rheum.* 1990; 20: 42-50.
- Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1988 Jul 1; 109: 18-24.
- Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* 2000; 133: 635-646.

- Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1992; 116: 535-539.
- Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman B, Aliabadi P, et al. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 728-733.
- Fischer AE, Carpenter TA, Tyler JA, Hall LD. Visualization of mass transport of small organic molecules and metal ions through articular cartilage by magnetic resonance imaging. *Magnet Res Imag.* 1995; 13: 819-826.
- Fife RS, Brandt KD. Identification of a high-molecular-weight (> 400000) protein in hyaline cartilage. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 802: 506-514.
- Fife RS. Identification of cartilage matrix glycoprotein in synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31: 553-556.
- Fife RS, Brandt KD, Braunstein EM, Katz BP, Shelbourne KD, Kalasinski LA, et al. Relationship between arthroscopic evidence of cartilage damage and radiographic evidence of joint space narrowing in early osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 377-382.^a
- Fife RS, Brandt KD, Braunstein EM, Myers SL, Katz BP, Ehlich J, et al. The presence of cartilage matrix glycoprotein in serum as determined by immunolocation analysis is not a sensitive indicator of “early” osteoarthritis of the knee. *J Lab Clin Med.* 1991; 117: 332-338.^b
- Fithian D.C., Kelly M.A., Mow V.C. Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin Orthop.* 1990; 2: 19-31.
- Franzen A, Heinegård D, Solursh M. Evidence for sequential appearance of cartilage matrix proteins in developing mouse limbs and in cultures of mouse mesenchymal cells. *Differentiation.* 1987; 36: 199-210.
- Frkovic-Grazio S, Bracko M. Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J Clin Pathol.* 2002; 55: 88-92.
- Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T. Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1992; 31: 593-598.
- Gagarina V, Carlberg AL, Pereira-Mouries L, Hall DJ. Cartilage Oligomeric Matrix Protein Protects Cells against Death by Elevating Members of the IAP Family of Survival Proteins. *J Biol Chem.* 2008; 283: 648-659.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.

- Ghadially FN, Ailsby RL, Yong NK. Ultrastructure of the haemophilic synovial membrane and electron-probe X-ray analysis of haemosiderin. *J Pathol.* 1976; 120: 201- 208.
- Ghadially FN, Lalonde JM, Wedge JH. Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat.* 1983; 136: 773-791.
- Ghosh P, Taylor TKF. The knee joint meniscus: a fibrocartilage of some distinction. *Clin Orthop Relat Res.* 1987; 224: 52-63.
- Gómez-Barrena E, Lindroos L, Ceponis A, López-Franco M, Sánchez-Pernaute O, Mönkkönen J, et al. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is modified by intra-articular liposomal clodronate in an experimental model of arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24 (6): 622-628.
- Graves PN, Olsen BR, Fietzek PP, Prockop DJ, Monson JM. Comparison of NH₂-terminal sequences of chick type I procollagen chains synthesized in an mRNA-dependent reticulocyte lysate. *Eur J Biochem* 1981; 118: 363-369
- Guccione AA, Felson DT, Anderson JJ, Anthony JM, Zhang Y, Wilson PW, et al. The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. *Am J Public Health.* 1994; 84: 351-358.
- Guerne PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 960-968.
- Guo Y, Bozic D, Malashkevich VN, Kammerer RA, Schulthess T, Engel J. All-transretinol, vitamin D and other hydrophobic compounds bind to the axial pore of the five-stranded coiled-coil domain of cartilage oligomeric matrix protein. *EMBO J.* 1998; 17: 5265-72.
- Habata T, Ohgushi H, Takakura Y, Tohno Y, Moriwake Y, Minami T, et al. Relationship between meniscal degeneration and element contents. *Biol Trace Elem Res.* 2001; 79: 247-256.
- Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J. Aggrecan, the chondroitin/keratan sulphate proteoglycan from cartilage. In Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC, eds. *Articular Cartilage and Osteoarthritis.* New York: Raven Press, 1992. p. 5-20
- Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 3094-3099.^a
- Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 1266-1274.^b
- Hashimoto S, Takahashi K, Ochs RL, Coutts RD, Amiel D, Lotz M. Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 2123-2131.

- Hashimoto Y, Tomiyama T, Yamano Y, Mori H. Mutation (D472Y) in the type 3 repeat domain of cartilage oligomeric matrix protein affects its early vesicle trafficking in endoplasmic reticulum and induces apoptosis. *Am J Pathol.* 2003; 163: 101-110.
- Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci.* 1994; 107: 17-27.
- Hauser N, Paulsson M, Kale AA, Di Cesare PE. Tendon extracellular matrix contains pentameric thrombospondin-4 (TSP-4). *FEBS Lett* 1995; 368: 307-10.
- Hayashi T, Abe E, Jasin HE. Fibronectin synthesis in superficial and deep layers of normal articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 1996; 39:567-573.
- Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, et al. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem.* 1992; 267: 6132-6136.
- Hedbom E, Heinegard D. Interaction of a 59 kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem.* 1989; 264: 6898-6905.
- Heinegård D, Larsson T, Sommarin Y, Franzén A, Paulsson M, Hedbom E. Two novel matrix proteins isolated from articular-cartilage show wide distributions among connective tissues. *J Biol Chem.* 1986; 261: 13866-13871.
- Heinegård D, Lorenzo P, Sommarin Y. Articular cartilage matrix proteins. In: Kuettner KE, Goldberg VM, eds. *Osteoarthritic disorders.* Rosemont, Illinois: The American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1995. p. 229-237.
- Heinegård D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 1989; 3: 2042-2051.
- Heinegård DK, Pimentel ER. Cartilage matrix proteins. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JGP, Hascall VC, editors. *Articular cartilage and osteoarthritis.* New York: Raven Press. 1992. p. 95-111.
- Hellio Le Graverand MP, Vignon E, Otterness IG, Hart DA. Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development (Part I): Cellular and matrix alterations. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001; 9: 56-64.^a
- Hellio Le Graverand MP, Vignon E, Otterness IG, Hart DA. Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development (Part II): Molecular alterations. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001; 9: 65-72.^d
- Hellio Le Graverand MP, Sciore P, Eggerer J, Rattner JP, Vignon E, Barclay L, et al. Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus. *Arthritis Rheum.* 44 (8): 1808-1818, 2001.^b

- Hellio Le Graverand MP, Ou YC, Schield-Yee T, Barclay L, Hart D, Natsume T, et al. The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat.* 2001; 198: 525-35.
- Herrero-Beaumont G, Guerrero R, Sánchez-Pernaute O, Acebes C, Palacios I, Mas S, et al. Cartilage and bone biological markers in the synovial fluid of osteoarthritic patients after hyaluronan injections in the knee. *Clin Chim Acta.* 2001; 308: 107-115.
- Herwig J, Egner E, Buddecke E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis.* 1984; 43: 635-640.
- Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor-beta. *Biochem J.* 1994; 302: 527-534.
- Hochberg MC, Altman RD, Brandt KD, Clark BM, Dieppe PA, Griffin MR, Moskowitz RW, Schnitzer TJ. Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1541-1546.
- Holden P, Meadows RS, Chapman KL, Grant ME, Kadler KE, Briggs MD. Cartilage oligomeric matrix protein interacts with type IX collagen, and disruptions to these interactions identify a pathogenetic mechanism in a bone dysplasia family. *J Biol Chem.* 2001; 276: 6046-6055.
- Hosea TM, Tria AJ, Bechler JR. Evolution and embryology of the knee. In: Insall JN, Scott WN, editors. *Surgery of the knee 3rd edition. Vol 1.* New York: Churchill-Livingstone; 2001. p. 3-12.
- Hough AJ, Webber RJ. Pathology of the meniscus. *Clin Orthop Relat Res.* 1990; 252: 32-40.
- Hsieh HH, Walker PS. Stabilizing mechanisms of the loaded and unloaded knee joint. *J Bone Joint Surg Am.* 1976; 58: 87-93.
- Hunziker EB. Articular cartilage structure in humans and experimental. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JGP, Hascall VC, editors. *Articular cartilage and osteoarthritis.* New York: Raven Press. 1992. p. 183-199.
- Ingman AM, Ghosh P, Taylor TK. Variation of collagenous and non-collagenous proteins of human knee joint menisci with age and degeneration. *Gerontologia.* 1974; 20: 212-223.
- Jacobsen K. Osteoarthrosis following insufficiency of the cruciate ligaments in man. A clinical study. *Acta Orthop Scand.* 1977; 48: 520-526.
- Jerosch J, Prymka M, Castro WH. Proprioception of knee joints with a lesion of the medial meniscus. *Acta Orthop Belg.* 1996; 62: 41-45.
- Jordan JM, Linder GF, Renner JB, Fryer JG. The impact of arthritis in rural populations. *Arthritis Care Res.* 1995 Dec; 8(4):242-50

- Karvonen RL, Fernández-Madrid F, Lande MA, Hazlett L, Barrett R, An T, et al. Proteoglycans from osteoarthritic human articular cartilage influence type II collagen *in vitro* fibrillogenesis. *Connect Tissue Res.* 1992; 27: 235-250.
- Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16: 494-502.
- Kennedy JC, Alexander IJ, Hayes KC. Nerve supply of the human knee and its functional importance. *Am J Sports Med.* 1982; 10: 329-335.
- Kennedy J, Jackson G, Ramsden S, Taylor J, Newman W, Wright MJ, et al. COMP mutation screening as an aid for the clinical diagnosis and counselling of patients with a suspected diagnosis of pseudoachondroplasia or multiple epiphyseal dysplasia. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13: 547-555.
- Key JA. The synovial membrane of joints and bursae. In: Cowdry EB, ed. *Special cytology vol. II*, 2nd ed. New York: Paul B Hoeber. 1932. p. 1055-1076.
- Kim YJ, Ketter R, Steudel WI, Feiden W. Prognostic significance of the mitotic index using the mitosis marker anti-phosphohistone H3 in meningiomas. *Am J Clin Pathol.* 2007; 128: 118-125.
- Kobayashi T, Yoshihara Y, Samura A, Tanaka O, Shimmei M. Chondrocalcin as a marker of articular cartilage degeneration in anterior cruciate ligament-deficient knees. *Orthopedics.* 1998; 21: 773-776.
- Krause WR, Pope MH, Johnson RJ, Wilder DG. Mechanical changes in the knee after meniscectomy. *J Bone Joint Surg.* 1976; 58-A: 599-604.
- Krey PR, Cohen AS, Smith CB, Finland M. The human fetal synovium; histology, fine structure and changes in organ culture. *Arthritis Rheum.* 1971; 14: 319- 341.
- Kuettner KE, Goldbeg VM. Introduction. In: Kuettner KE, Goldbeg VM, eds. *Osteoarthritic disorders*. Rosemont: American Academy of Orthopedic Surgeons; 1995.p. xxi-xxv.
- Kurosawa H, Fukubayashi T, Nakajima H. Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci. *Clin Orthop Relat Res.* 1980; 149: 283- 290.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1980; 277: 680.
- Lai WM, Mow VC, Roth V. Effects of nonlinear strain-dependent permeability and rate of compression on the stress behavior of articular cartilage. *J Biomech Eng.* 1981; 103: 61-66.
- Landberg G, Roos G. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in human malignant hematopoietic cells. *Acta Oncol.* 1991; 30: 917-921.
- Lane NE, Michel B, Bjorkengren A, Oehlert J, Shi H, Bloch DA, et al. The risk of osteoarthritis with running and aging: a 5-year longitudinal study. *J Rheumatol.* 1993; 20: 461-468.

- Lane NE, Nevitt MC. Osteoarthritis, bone mass, and fractures: how are they related? *Arthritis Rheum.* 2002 Jan; 46(1):1-4.
- Lawler J, Duquette M, Wittaker CA, Adams JC, McHenry K, DeSimone DW. Identification and characterization of thrombospondin-4, a new member of the thrombospondin gene family. *J Cell Biol.* 1993; 120: 1059-1067.
- Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 778-799.
- Lehninger AL. *Principles of biochemistry.* New York: Worth Publishers; 1982.
- Levy IM, Torzilli PA, Fish ID. The contribution of the menisci to the stability of the knee. In: Mow VC, Arnoczky SP, Jackson DW, eds. *Knee meniscus: Basic and clinical foundations.* New York: Raven Press; 1992. p. 107-115.
- Levy IM, Torzilli PA, Warren RF. The effect of medial meniscectomy on anterior-posterior motion of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 1982; 64:883-8.
- Lewandrowski KU, Muller J, Schollmeier G. Concomitant meniscal and articular cartilage lesions in the femorotibial joint. *Am J Sports Med.* 1997; 25: 486-494.
- Linn FC, Sokoloff L. Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. *Arthritis Rheum.* 1965; 8: 481-494.
- Little CB, Ghosh P. Differential effect of TGB- β on proteoglycan synthesis by chondrocytes from defined weight bearing regions of articular cartilage. *Trans Orthop Res Soc.* 1995; 20: 370.
- Little CB, Ghosh P. Variation in proteoglycan metabolism by articular chondrocytes in different joint regions is determined by post-natal mechanical loading. *Osteoarthritis Cartilage.* 1997; 5 (1): 49-62.
- Lo IKY, Thornton G, Miniaci A, Frank CB, Rattner JB, Bray RC. Estructura y funcionamiento de las diartrodias. En: McGynty JB, Burkhart SS, Jackson RW, Johnson DH, Richmond JC, editors. *Artroscopia quirúrgica.* Madrid: Marbán SL; 2005. p 41- 126.
- Lohmander LS, Saxne T, Heinegård DK. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1994; 53: 8-13.
- Lysholm J, Hamberg P, Gillquist J. The correlation between osteoarthrosis as seen on radiographs and on arthroscopy. *Arthroscopy.* 1987; 3(3):161-5.
- Mankin HJ. The water of articular cartilage. In: Simon WH, editor. *The human joint in health and disease.* Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1978. p. 37-42.
- Mankin HJ, Brandt KD. Biochemistry and metabolism of articular cartilage in osteoarthritis. In: Moskowitz RW, ed. *Osteoarthritis: diagnosis and medical-surgical treatment.* Philadelphia: WB Saunders Company; 1992. p. 109-154.

- Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA, Iannotti JP, Ratcliffe A: Articular cartilage structure, composition, and function. In Buckwalter JA, Eidhorn TA, Simon SR, eds. Orthopaedic basic science: Biology and biomechanics of the musculoskeletal system 2nd edition. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2000:443-470.
- Mapp PI, Revell PA. Fibronectin production by synovial intimal cells. *Rheumatol Int.* 1985; 5: 229-237.
- Markolf KL, Bargar WL, Shoemaker SC, Amstutz HC. The role of joint load in knee stability. *J Bone Joint Surg.* 1981(A); 63: 570-585.
- Markolf KL, Mensch JS, Amstutz HC. Stiffness and laxity of the knee--the contributions of the supporting structures. A quantitative in vitro study. *J Bone Joint Surg Am.* 1976 Jul; 58(5): 583-94.
- Maroudas A: Physicochemical properties of articular cartilage. In Freeman MAR, ed. Adult articular cartilage, 2nd edition. London: Pitman Medical. 1979: p. 215-290.
- Maroudas A, Schneiderman R. "Free" and "exchangeable" or "trapped" and "non-exchangeable" water in cartilage. *J Orthop Res.* 1987; 5: 133-138.
- Martin JA, Buckwalter JA. Articular cartilage aging and degeneration. *Sports Med and Arthrosc Rev.* 1996; 4: 263-275.^a
- Martin JA, Buckwalter JA. Fibronectin and cell shape affect age-related decline in chondrocyte synthetic response to IGF-1. *Trans Orthop Res Soc.* 1996; 21: 306.^b
- Masuda I, Ishikawa K, Usuku G. A histologic and Immunohistochemical study of calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *Clin Orthop.* 1991; 263: 272-287.
- Matsubara T, Spycher MA, Rüttner JR, Fehr K. The ultrastructural localization of fibronectin in the lining layer of the rheumatoid arthritis synovium: the synthesis of fibronectin by type B lining cells. *Rheumatol Int.* 1983; 3: 75- 79.
- McAlinden A, Dudhia J, Bolton MC, Lorenzo P, Heinegard D, Bayliss MT. Age-related changes in the synthesis and mRNA expression decorin and aggrecan in human meniscus and articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001; 9 (1): 33-41.
- McAlindon TE, Wilson PW, Aliabadi P, Weissman B, Felson DT. Level of physical activity and the risk of radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham study. *Am J Med.* 1999; 106: 151-157.
- McDevitt C, Gilbertson E, Muir H. An experimental model of osteoarthritis; early morphological and biochemical changes. *J Bone Joint Surg Br.* 1977 Feb; 59(1):24-35.
- McDevitt CA, Webber RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 1990; 252: 8-18.

- McNicol D, Roughley PJ. Extraction and characterization of proteoglycan from human meniscus. *Biochem J.* 1980; 185: 705-713.
- Meachim G. Articular cartilage lesions in osteo-arthritis of the femoral head. *J Pathol.* 1972 Jul; 107(3):199-210.
- Meachim G, Denham D, Emery IH, Wilkinson PH. Collagen alignments and artificial splits at the surface of human articular cartilage. *J Anat.* 1974; 118: 101- 118.
- Melching LI, Roughley PJ. The synthesis of dermatan sulfate proteoglycans by fetal and adult human articular cartilage. *Biochem J.* 1989; 261: 501-508.
- Merkel KHH. The surface of human menisci and its aging alterations during age: a combined scanning and transmission electron microscopic examination (SEM, TEM). *Arch Orthop Trauma Surg.* 1980; 97: 185-191.
- Messner K, Gao J. The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *Journal of Anatomy* 1998; 193, 161-178.
- Mitrovic DR, Garcia F, Front P, Guillermet V. Histochemical and cellular changes induced in the rabbit knee joint by an intraarticular implantation of a sheet of polyethylene. *Lab Invest.* 1985; 53: 228-239.
- Mittal K, Demopoulos RI. MIB-1 (Ki-67), p53, estrogen receptor, and progesterone receptor expression in uterine smooth muscle tumors. *Hum Pathol.* 2001; 32: 984-987.
- Mok SS, Masuda K, Häuselmann HJ, Aydelotte MB, Thonar EJ. Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools. *J Biol Chem.* 1994; 269: 33021-33027.
- Mollenhauer J, Bee JA, Lizarbe MA, von der Mark K. Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J. Cell Biol.* 1984; 98:1572-1579.
- Moon MS, Kim JM, Ok IY. The normal and regenerated meniscus in rabbits. Morphologic and histologic studies. *Clin Orthop Relat Res.* 1984; 182: 264-269.
- Moon MS, Kim YS. Collagen fibres and mechanoreceptors in regenerated menisci of rabbits. *Int Orthop.* 1997; 21: 239-42.
- Moore KL. The articular and skeletal systems. In: *The developing human*, 2nd ed. Philadelphia: WB Sanders, 1977.
- Mörgelin M, Heinegård D, Engel J, Paulsson M. Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five armed structure. *J Biol Chem.* 1992; 267: 6137-6141.

- Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, et al. Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum.* 1973; 16: 397-405.
- Mow VC, Fithian DC, Kelly MA. Fundamentals of articular cartilage and meniscus biomechanics. In: Ewing JW, ed. *Articular cartilage and knee joint function.* New York: Raven Press. 1990. p. 1-18.
- Mow VC, Rosenwasser MP. Articular cartilage. Biomechanics. In: Woo SLY, Buckwalter JA, editors. *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues.* Illinois: The American Academy of Orthopaedic Surgeons. 1988; p 427-463.
- Mow VC, Setton LA, Guilak F, Ratcliffe A. Mechanical factors in articular cartilage and their role in osteoarthritis. In: Kuettner KE, Goldberg VM, editors. *Osteoarthritic disorders.* Illinois: The American Academy of Orthopaedic Surgeons. 1995; p 147-171.
- Munuera L. Fisiopatología del cartílago articular y de la membrana sinovial. En: Munuera L, editor. *Introducción a la traumatología y cirugía ortopédica.* Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, SAU; 1996. p.86-95.
- Myllylä R, Risteli L, Kivirikko KI. Assay of collagen-galactosyltransferase and collagen-glucosyltransferase activities and preliminary characterization of enzymic reactions with transferases from chick-embryo cartilage. *Eur J Biochem.* 1975; 52: 401-410.
- Nakano T, Dodd CM, Scott PG. Glycosaminoglycans and proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *J Orthop Res.* 1997; 15: 213-222.
- Nakano T, Thompson JR, Aherne FX. Distribution of glycosaminoglycans and the nonreducible collagen crosslink, pyridinoline in porcine menisci. *Can J Vet Res.* 1986; 50: 532-536.
- Nazawa-Inoue K, Takagi R, Kobayashi T, Ohashi Y, Maeda T. Immunocytochemical demonstration of synovial membrane in experimentally induced arthritis of the rat temporomandibular joint. 1998; 61: 451-456.
- Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, Di Cesare PE, Michel BA, Häuselmann HJ. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol.* 1997; 36: 1151-1160.
- Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics.* 1994; 24: 435-439.
- Nguyen BQ, Fife RS. Vitreous contains a cartilage related protein. *Exp Eye Res.* 1986; 43: 375 - 382.
- Nishida K, Inoue H, Murakami T. Immunohistochemical demonstration of fibronectin in the most superficial layer of normal rabbit articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* 1995; 54: 995-998.

- Nishida M, Higuchi H, Kobayashi Y, Takagishi K. Histological and biochemical changes of experimental meniscus tear in the dog knee. *J Orthop Sci.* 2005; 10: 406-413.
- Noble J, Hamblen DL. The pathology of the degenerate meniscus lesion. *J Bone Joint Surg.* 1975; 57-B: 180-186.
- Norton WL, Lewis DC, Ziff M. Electron-dense deposits following injection of gold sodium thiomalate and thiomalic acid. *Arthritis Rheum.* 1968; 11: 436- 443.
- Ochi M, Kanda T, Sumen Y, Ikuta Y. Changes in the permeability and histologic findings of rabbit menisci after immobilization. *Clin Orthop Relat Res.* 1997; 334: 305-315
- O'Connor BL. The histological structure of dog knee menisci with comments on its possible significance. *Am J Anat.* 1976; 147: 407-417.
- Oegema TR Jr, Visco DM. Animals models of osteoarthritis. In: An YH, Friedman RJ, ed. *Animal models in orthopaedic research.* Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc. 1999. p. 349-367.
- Ohira T, Ishikawa K, Masuda I, Yokoyama M, Honda I. Histologic localization of lipid in the articular tissues in calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *Arthritis Rheum.* 1988; 31: 1057–1062.
- Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, et al. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest.* 1992; 66: 680-690.
- Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegård D. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem.* 1992; 267: 22346– 22350.
- Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 1134-1141
- Orts Llorca F. Aparato locomotor. Generalidades. En: *Anatomía Humana.* 6ª edición. Editorial Científico-Médica. Madrid, 1986. p. 31-60.
- Otterness IG, Swindell AC, Zimmerer RO, Poole AR, Ionescu M, Weiner E. An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis: segregation of the markers into clusters and distinguishing osteoarthritis at baseline. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000; 8: 180-185.
- Paulino J, Pineo A, Wong C, Crespo D. EPISER. Estudio general de la frecuencia de las enfermedades reumáticas en una población determinada con fines epidemiológicos. *Rev Esp Reumatol.* 1982; 9: 1-8.
- Palmiter RD, Davidson JM, Gagnon J, Rowe DW, Borstein P. NH₂-terminal sequence of the chick proalpha1(I) chain synthesized in the reticulocyte lysate system. Evidence for a transient hydrophobic leader sequence. *J Biol Chem.* 1979; 254: 1433-1436.

- Pfäffle M, Borchert M, Deutzmann R, von der Mark K, Fernandez M P, Selmin O, et al. Anchorin CII, a collagen-binding chondrocyte surface protein of the calpactin family. *Prog Clin Biol Res.* 1990; 349:147-157.
- Pelletier JP, Martel Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, ed. *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology.* 13th. Baltimore: Williams & Wilkins; 2001. p. 2195-2245.
- Petersson IF, Boegård T, Dahlström J, Svensson B, Heinegård D, Saxne T. Bone scan and serum markers of bone and cartilage in patients with knee pain and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6: 33-39.^a
- Petersson IF, Boegård TB, Svensson D, Heinegård D, Saxne T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. *Br J Rheumatol.* 1998; 37: 46-50.^b
- Pond MJ, Nuki G. Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis.* 1973; 32: 387-388.
- Poole AR. Proteoglycan in health and disease: structures and functions. *Biochem J.* 1986; 236: 1-14.
- Poole CA, Matsuoka A, Schofield JR. Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheumatism.* 1991; 34: 22-35.
- Proctor CS, Schmidt MB, Whipple RR, Kelly MA, Mow VC. Material properties of the normal medial bovine meniscus. *J Orthop Research.* 1989; 7: 771-782.
- Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res.* 1986; 213: 34-40.
- Ramachandran GN, Reddi AH, eds. *Biochemistry of collagen.* New York: Plenum; 1976.
- Revell PA. Synovial lining cells. *Rheumatol Int.* 1989, 9: 49-51.
- Riessen R, Fenchel M, Chen H, Axel DI, Karsch KR, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 47-54.
- Rimoin DL, Rasmussen IM, Briggs MD, Roughley PJ, Gruber HE, Warman ML, et al A large family with features of pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: exclusion of seven candidate gene loci that encode proteins of the cartilage extracellular matrix. *Hum Genet* 1994; 93: 236- 242.
- Rosenberg K, Olsson H, Mörgelin M, Heinegård D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem* 1998; 273: 20397-20403.

- Rosenberg, LC: Structure and function of dermatan sulfate proteoglycans in articular cartilage. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC, eds. *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York: Raven Press, 1992. p. 45-63.
- Rosenberg LC, Buckwalter JA. Cartilage proteoglycans. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC, eds. *Articular cartilage biochemistry*. New York: Raven Press, 1986. p. 39-57.
- Rosenberg LC, Choi HU, Tang LH, Johnson TL, Pal S, Webber C, et al. Isolation of dermatan sulphate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J Biol Chem*. 1985; 260: 6304-6313.
- Rothfuss J, Mau W, Zeidler H, Brenner MH. Socioeconomic evaluation of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a literature review. *Semin Arthritis Rheum*. 1997; 26: 771-779.
- Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech*. 1994; 28: 385-397.
- Roughley PJ, White RJ. Age-related changes in the structure of the proteoglycan subunits from human articular cartilage. *J Biol Chem*. 1980; 255: 217-224.
- Roughley PJ, White RJ. The dermatan sulfate proteoglycans of the adult human meniscus. *J Orthop Res*. 1992; 10: 631-637.
- Roy S, Ghadially FN. Synthesis of hyaluronic acid by synovial cells. *J Pathol Bacteriol*. 1967; 93: 555- 557.
- Sah RL, Yang AS, Chen AC, Hant JJ, Halili RB, Yoshioka M, et al. Physical properties of rabbit articular cartilage after transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res*. 1997; 15: 197-203.
- Sánchez-Corra P, Antón LC, Alcolea JM, Marqués G, Sánchez A, Vivanco F. Separation of active and inactive forms of the third component of human complement, C3, by fast protein liquid chromatography. (FPLC). *J Immunol Methods* 1989; 122: 105-113.
- Salter DM. Tenascin is increased in cartilage and synovium from arthritic knees. *British J Rheum*. 1993; 32: 780-786.
- Sandy JD. Extracellular metabolism of aggrecan. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JGP, Hascall VC, editors. *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York: Raven Press. 1992. p. 21-23.
- Savarese JJ, Erickson H, Scully SP. Articular chondrocyte tenascin-C production and assembly into de novo extracellular matrix. *J Orthop Res*. 1996; 14: 273-281.
- Schouten JS, de Bie RA, Swaen G. An update on the relationship between occupational factors and osteoarthritis of the hip and knee. *Curr Opin Rheumatol*. 2002; 14: 89-92.
- Scott JE. Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry*. 1996; 35: 8795-8799.

- Seedholm BB, Hagreaves DJ. Transmission of the load in the knee joint with special reference to the role of the menisci. *Eng Med*. 1979; 8: 220-228.
- Sharif M, Saxne T, Shepstone L, Kirwan JR, Elson CJ, Heinegård D, et al. Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. *Br J Rheumatol*. 1995; 34: 306-310.
- Sharma L. Local factors in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2001; 13: 441-446.^a
- Sharma L, Lou C, Felson DT, Dunlop DD, Kirwan-Mellis G, Hayes KW, et al. Laxity in healthy and osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum*. 1999; 42: 861-870.
- Sharma L, Song J, Felson DT, Cahue S, Shamiyeh E, Dunlop DD. The role of knee alignment in disease progression and functional decline in knee osteoarthritis. *JAMA*. 2001; 286: 188-195.^b
- Shindo H, Karube S, Masuda M, Hayashi Y, Igarashi M. Biochemical study of human articular cartilage and meniscus on aging and joint disease. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1981; 55: 17-30.
- Silveri F, Brecciaroli D, Argentati F, Cervini C. Serum levels of insulin in overweight patients with osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol*. 1994; 21: 1899-1902.
- Simonet WS. Genetics of primary generalized osteoarthritis. *Mol Genet Metab*. 2002; 77: 31-34.
- Sledge CB. Some morphological and experimental aspects of limb development. *Clin Orthop* 1966; 44: 241-264.
- Sledge CB y Zaleske DJ. Developmental anatomy of joints. In: Resnick D, Niwayama G, eds. *Diagnosis of bone and joint disorders*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1988.
- Slowman SD, Brandt KD. Composition and glycosaminoglycan metabolism of articular cartilage from habitually loaded and habitually unloaded sites. *Arthritis Rheum*. 1986; 29: 88-94.
- Sommerlath K. The importance of the meniscus in unstable knees. A comparative study. *Am J Sports Med* 1989; 17: 773-777.
- Sowers M. Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: systemic factors. *Curr Opin Rheumatol*. 2001; 13: 447-451.
- Spector TD, Harris PA, Hart DJ, Cicuttini FM, Nandra D, Etherington J, et al. Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis Rheum*. 1996; 39: 988-995.
- Spindler KP, Mayes CE, Miller RR, Imro AK, Davidson JM Regional mitogenic response of the meniscus to platelet-derived growth factor (PDGF-AB). *J Orthop Res*. 1995; 13(2): 201- 207.
- Stevens CR, Mapp PI, Revell PA. A monoclonal antibody (Mab 67) marks type B synoviocytes. *Rheumatol Int*. 1990; 10: 103-106.
- Stevens JW. Pseudoachondroplastic dysplasia: an Iowa review from human to mouse. *Iowa Orthop J*. 1999; 19: 53-65.

- Takahasi M, Suzuki M, Kushida K, Hoshino H, Inoue T. The effect of aging and osteoarthritis on the mature and senescent cross-links of collagen in human meniscus. *Arthroscopy*. 1998; 14: 366-372.
- Tanaka T, Fujii K, Kumagae Y. Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 1999; 7: 75-80.
- Tang LH, Buckwalter JA, Rosenberg LC. Effect of link protein concentration on articular cartilage proteoglycan aggregation. *J Orthop Res*. 1996; 14: 334-339.
- Thompson WO, Fu FH. The meniscus in the cruciate-deficient knee. *Clin Sports Med* 1993; 12: 771-796.
- Thonar EJ, Shinmei M, Lohmander LS. Body fluid markers of cartilage changes in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 1993; 19: 635-657.
- Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, Pihlajamaa T, Ala-Kokko L, Heinegård D, et al. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J Biol Chem*. 2001; 276: 6083-6092.
- Trelstad RL. Glycosaminoglycans: mortar, matrix, mentor. *Lab Invest* 1985; 53: 1-4.
- Turner AP, Barlow JH, Heathcote-Elliott C. Long term health impact of playing professional football in the United Kingdom. *Br J Sports Med*. 2000; 34: 332-336.
- Vignon E, Bejui J, Mathieu P, Hartmann JD, Ville G, Evreux JC, et al. Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1987; 14:104-106.
- Vilím V, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Kraus VB, Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10: 707-713.
- Vilím V, Voburka Z, Vytásek R, Senolt L, Tchetverikov I, Kraus VB, et al. Monoclonal antibodies to human cartilage oligomeric matrix protein: epitope mapping and characterization of sandwich ELISA. *Clin Chim Acta*. 2003; 328: 59-69.
- Vivanco-Martínez F, Bragado R, Albar JP, Juárez C, Ortiz-Masllorens F. Chemical modification of carboxyl groups in human Fc γ fragment: structural role and effect on the complement fixation. *Mol Immunol* 1980; 17: 327-336.
- Voloshin AS, Wosk J. Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study. *J Biomed Eng*. 1983 Apr; 5:157-61.
- Von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K, et al. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum*. 1992; 35: 806-811.

- Vos HL, Devarayalu S, de Vries Y, Bornstein P. Thrombospondin 3 (Thbs 3), a new member of the thrombospondin gene family. *J Biol Chem.* 1992; 267: 12192-12196.
- Webber RJ, Harris MG, Hough AJ Jr. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res.* 1985; 3: 36-42.
- Werb Z, Reynolds JJ. Stimulation by endocytosis of secretion of collagenase and neutral proteinases from rabbit synovial fibroblasts. *J Exp Med.* 1974; 140: 1482- 1497.
- Wildey GM, Billetz AC, Matyas JR, Adams ME, McDevitt CA. Absolute concentrations of mRNA for type I and Type VI collagen in the canine meniscus in normal and ACL-deficient knee joints obtained by RNase protection assay. *J Orthop Res.* 2001; 19 (4): 650-658.
- Wilkinson LS, Pitsillides AA, Worrall JG, Edwards JC. Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 1179-1184.
- Wislowska M, Jablonska B. Cartilage oligomeric matrix protein in serum in systemic lupus erythematosus and knee osteoarthritis. Preliminary communication. *Rheumatol Int.* 2005; 25: 373-378.
- Woo SY, Kai-Nan A, Arnoczky SP, Wayne JS, Fithian DC, Myers BS. Anatomy, biology and biochemics of tendon, ligament and meniscus. In: Simon SR, ed. *Orthopedic basic sciences.* Illinois: The American Academy of Orthopaedic Surgeons. 1994. p. 45-88.
- Xiao Y, Kleeff J, Guo J, Gazdhar A, Liao Q, Di Cesare PE, et al. Cartilage oligomeric matrix protein expression in hepatocellular carcinoma and the cirrhotic liver. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 19: 296-302.
- Yasui K. Three dimensional architecture of human normal menisci. *J Jpn Orthop Assoc.* 1978; 52: 391-399.
- Yielding KL, Tomkins GM, Bunim JJ. Synthesis of hyaluronic acid by human synovial tissue slices. *Science.* 1957; 125: 1300.
- Yoshida S, Aoyagi K, Felson DT, Aliabadi P, Shindo H, Takemoto T. Comparison of the prevalence of radiographic osteoarthritis of the knee and hand between Japan and the United States. *J Rheumatol.* 2002; 29: 1454-1458.
- Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4 (2): 87-98.
- Zhang Y, Xu L, Nevitt MC, Aliabadi P, Yu W, Qin M, Lui LY, Felson DT. Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 2065-2071.
- Zimny ML, Albright DJ, Dabezies E. Mechanoreceptors in the human medial meniscus. *Acta Anat (Basel).* 1988; 133: 35-40.