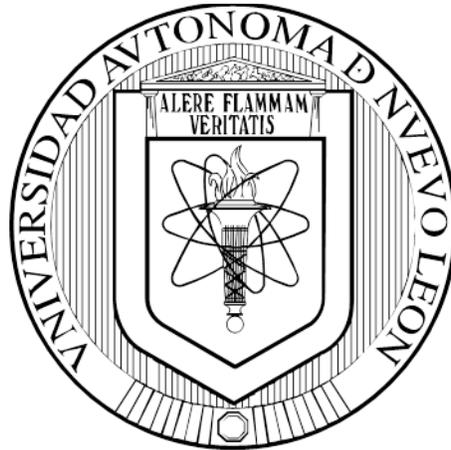


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LOS FIBROBLASTOS SOBRE UNA MATRIZ SINTÉTICA
EN LA RECONSTRUCCIÓN DEL LIGAMENTO CRUZADO
ANTERIOR: ESTUDIO EN CONEJOS**

POR

SANTIAGO DE LA GARZA CASTRO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

AGOSTO, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LOS FIBROBLASTOS SOBRE UNA MATRIZ SINTÉTICA
EN LA RECONSTRUCCIÓN DEL LIGAMENTO CRUZADO
ANTERIOR: ESTUDIO EN CONEJOS**

POR

SANTIAGO DE LA GARZA CASTRO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

AGOSTO, 2018

**EFFECTO DE LOS FIBROBLASTOS SOBRE UNA MATRIZ SINTÉTICA EN
LA RECONSTRUCCIÓN DEL LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR:
ESTUDIO EN CONEJOS.**

Aprobación de la Tesis:

**Dr. med. Óscar de la Garza Castro
Director de Tesis**

**Dr. med. Félix Vílchez Cavazos
Co-Director de Tesis**

**Dr. med. Víctor Manuel Peña Martínez
Miembro de la Comisión de Tesis**

**Dr. med. Carlos Alberto Acosta Olivo
Miembro de la Comisión de Tesis**

**Dr. C. Jorge Lara Arias
Miembro de la Comisión de Tesis**

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Sub-Director de Estudios de Postgrado**

El presente trabajo se realizó en el Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y en el Área de Cirugía Experimental del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Med. Óscar de la Garza Castro y la co-dirección del Dr. Med. Félix Vílchez Cavazos.

ÍNDICE

Contenido	Página
Lista de Tablas	i
Lista de Figuras	ii
Abreviaturas	iii
CAPÍTULO I	
RESUMEN	
CAPÍTULO II.	
INTRODUCCIÓN	1
2.1. La rodilla	1
2.1.1. Estructura ósea de la articulación	1
2.1.2. Articulación femoro-tibial	2
2.1.3. Articulación patelo-femoral	3
2.2. Cuadriceps	3
2.3. Tendón patelar	5
2.4. Estructuras sinoviales	5
2.4.1. Plica	5
2.4.2. Almohadilla grasa	5
2.5. Menisco	5
2.6. Ligamento cruzado anterior	6
2.6.1. Histología	7
2.6.2. Anatomía macroscópica	8
2.6.3. Inserción femoral	9

Contenido	Página
2.6.4. Inserción tibial	11
2.6.5. Vascularización e inervación	12
2.7. Función del ligamento cruzado anterior	13
2.7.1. Estabilidad anteroposterior	13
2.7.2. Estabilidad rotacional	14
2.8. Selección de injerto en reconstrucción de ligamento cruzado anterior	15
2.9. Tipos de injerto y sus características	16
2.9.1. Tendón rotuliano	16
2.9.2. Tendones flexores (isquitibiales)	17
2.9.3. Tendón cuadricipital	18
2.9.4. Aloinjertos	19
2.9.5. Injertos sintéticos	19
2.10. Otras alternativas	21
2.10.1. Terapia celular	21
2.10.2. Terapia génica	21
2.10.3. Factores de crecimiento	22
2.10.4. Scaffolds/matrices	23
2.10.5. Kevlar®	24
CAPÍTULO III	
JUSTIFICACIÓN	26
CAPÍTULO IV	
4.1. HIPÓTESIS	26

Contenido	Página
4.2. HIPÓTESIS NULA	26
CAPÍTULO V	
OBJETIVOS	27
5.1. Objetivo General	27
5.2. Objetivos Particulares	27
CAPÍTULO VI	
MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1. Diseño del estudio	28
6.2. Modelo experimental	28
6.3. Grupos de estudio	28
6.4. Lugar del estudio	31
6.5. Recursos Materiales	31
6.6. Toma de biopsia	31
6.7. Ensayo de viabilidad	32
6.8. Cuidado pre-quirúrgico	32
6.9. Técnica quirúrgica	32
6.10. Anestesia	35
6.11. Cuidado post-quirúrgico inmediato	35
6.12. Cuidado post-quirúrgico tardío	35
6.13. Funcionalidad	35
6.14. Eutanasia	36
6.15. Tinciones histológicas	36
6.16. Análisis molecular	37

Contenido	Página
6.17. Análisis histológico	38
6.18. Estadística	39
CAPÍTULO VII	
RESULTADOS	40
7.1. Ensayo de viabilidad	40
7.2. Funcionalidad	42
7.3. Análisis histológico	48
7.4. Análisis molecular	50
CAPÍTULO VIII	
DISCUSIÓN	52
CAPÍTULO IX	
CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO X	
BIBLIOGRAFÍA	56
APÉNDICE A	
TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	68
A.1. Preparación de la Muestra	68
A.2. Técnica de Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E)	68
A.3. Técnica de Tinción con el Método Tricrómico de Massón	68
APÉNDICE B	
PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES	70
B.1. Solución de Formalina al 10%	70
B.2. PBS 10x	70

Contenido	Página
B.3. PBS 1x	70
B.4. Hematoxilina de Gill	70
B.5. Eosina	71
B.6. Solución de Alcohol-ácido	71
B.7. Solución de Agua Amoniacal	71
B.8. Hematoxilina Férrica de Weigert	71
B.9. Solución de Fuscina Ácida y Escarlata de Briebich	72
B.10. Solución Ácida Fosfomolíbdica y Fosfotúngstica	72
B.11. Solución de Azul de Anilina	72
B.12. Solución Acuosa de Ácido Acético al 10%	72
B.13. Solución Fijadora de Bouin	72
B.14. Solución Enjuagadora Sulfurosa	72
B.15. Solución Metabisulfito de Sodio al 10%	72

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Clasificación de los diferentes injertos utilizados	15
Tabla 2. Propiedades biomecánicas en diferentes injertos disponibles para la reconstrucción del LCA	17
Tabla 3. Ventajas y desventajas e los injertos sintéticos	20
Tabla 4. Secuencias de los primers usados para la amplificación molecular de colágeno I	38

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Anatomía de la rodilla	2
Figura 2. Mecanismo extensor de la rodilla	4
Figura 3. Distribución de los grupos de estudio	29
Figura 4. Toma de biopsia, extracción, cultivo de los fibroblastos	40
Figura 5. Inclusión de los fibroblastos en fibrina y cultivo en el Kevlar®	41
Figura 6. Fibroblastos incluidos en fibrina. Se observó la proliferación de las células entre las fibras del Kevlar®	41
Figura 7. Viabilidad de los fibroblastos incluidos en la fibrina y en contacto en el Kevlar®	42
Figura 8. Localización y escisión del ligamento cruzado anterior	43
Figura 9. Paso del Kevlar® a través de los túneles ubicados en los puntos isométricos	44
Figura 10. Adición de la fibrina con 1x10⁶ fibroblastos sobre el Kevlar®	44
Figura 11. Parámetros normales y anormales para evaluar la funcionalidad de la rodilla de los conejos	45
Figura 12. Rangos de movilidad en grados a las 6 y 12 semanas postquirúrgicas en las rodillas derechas e izquierdas de los conejos sujetos de estudio	46

Figura	Página
Figura 13. Prueba de Lachman realizada a los conejos sujetos de estudio	47
Figura 14. Análisis de la marcha en los conejos sujetos de estudio	47
Figura 15. Corte histológico con H&E. Se observa un proceso inflamatorio, así como una osificación circundante al Kevlar®. 10X.	48
Figura 16. Tinción con H&E que demuestra el material de tejido conectivo celular que cubrió al Kevlar® sin datos aparentes de inflamación. 10X y 40X	49
Figura 17. Tinción con Tricrómico de Masson. Se determinó que el material circundante al Kevlar® fueron fibras de colágeno	50
Figura 18. Productos amplificados que corresponden a un amplicón para COL1A2 de 227 pares de bases	51

ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
μ	Micras
μ l	Microlitros
%	Porcentaje
®	Registrado
°C	Grados Centígrados
°	Grados
Ac.	Ácido
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros Cuadrados
Cols	Colaboradores
c/u	Cada uno
Dr.	Doctor
etc	Etcétera
FGF2	Factor de Crecimiento de Fibroblastos Tipo 2
Gr	Gramos
HCL	Cloruro de Hidrógeno
Hrs	Horas
H&E	Hematoxilina y Eosina
IGF1	Factor de Crecimiento Tipo Insulina 1
KCl	Cloruro de Potasio
Kg	Kilogramos

Kh₂PO₄	Fosfato monopotásico
LCA	Ligamento Cruzado Anterior
mg	Miligramos
min	Minutos
mm	Milímetros
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
N	Normal
NaCl	Cloruro de Sodio
Na₂HPO₄	Fosfato disódico
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
pH	Logaritmo Negativo de la Concentración de Iones Hidrógeno
TGF β	Factor de Crecimiento Transformante

CAPÍTULO I

RESUMEN

Santiago de la Garza Castro

Fecha de Graduación: Agosto, 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Facultad de Medicina

Título del Estudio: EFECTO DE LOS FIBROBLASTOS SOBRE UNA MATRIZ SINTÉTICA EN LA RECONSTRUCCIÓN DEL LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR: ESTUDIO EN CONEJOS.

Número de Páginas: 72

Área de Estudio: Ortopedia y Traumatología.

Introducción: El ligamento cruzado anterior (LCA) impide el desplazamiento anterior de la tibia con relación al fémur. La ruptura del LCA produce cambios degenerativos entre 10 y 15 años después de la lesión. El injerto ideal para la reparación del LCA debe reproducir las propiedades estructurales, baja tasa de morbilidad, fácil disponibilidad, baja reacción inmunogénica y proveer una fijación fuerte. La aplicación de estructuras sintéticas o biológicas han sido utilizadas en medicina regenerativa a modo de soportes de matriz extracelular. **Objetivo:** Evaluar la biocompatibilidad y el efecto de los fibroblastos adheridos a la matriz sintética de Kevlar® en la reconstrucción del ligamento cruzado anterior en modelos experimentales. **Material y Métodos:** Se formaron tres grupos de 9 conejos cada uno. Las rodillas izquierdas se utilizaron como control sano y las rodillas derechas fueron utilizadas como experimentales. Se agruparon como grupos de lesión, reemplazo Kevlar® y reemplazo Kevlar®/Fibroblastos. Ambas extremidades se evaluaron con pruebas clínicas, biomecánicas, histológicas y moleculares. **Resultados:** Se observó una distribución de los fibroblastos a través de las fibras de Kevlar®. El tejido óseo integró a este material sintético con hueso compacto en la zona de los túneles. Las pruebas de funcionalidad mostraron que al reconstruir el LCA con Kevlar®, había estabilidad en las rodillas sujetas de estudio en comparación con el grupo de escisión del LCA. Los fibroblastos incluidos en la fibrina fueron capaces de sintetizar un tejido conectivo a base de colágeno de tipo I entre las fibras del Kevlar®. **Conclusiones:** Los fibroblastos incluidos en el adhesivo de fibrina, son capaces de sustituir la matriz de fibrina por colágena de tipo I para recubrir las fibras del Kevlar®. Se requiere mayor tiempo de seguimiento a las rodillas tratadas con el reemplazo de Kevlar®/Fibroblastos para poder determinar la completa integración ósea del material sintético, así como el comportamiento del tejido conectivo circundante al Kevlar®.

Dr. med. Óscar de la Garza Castro.

Director de Tesis

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

2.1. La rodilla

La rodilla es la articulación más grande del cuerpo humano, se le considera una articulación tipo bisagra la cual permite la flexo-extensión y además una ligera rotación

(1). Se considera que la rodilla esta compuesta de dos articulaciones:

1. La articulación femoro-tibial que articula los cóndilos femorales con los cóndilos tibiales, esta articulación transmite el peso corporal y permite el movimiento de rotación de la articulación

2. La articulación patelo-femoral entre la patela y el fémur, esta articulación crea un mecanismo de polea el cual permite la flexo-extensión (2).

2.1.1. Estructura ósea de la articulación

La porción ósea de la rodilla está conformada por fémur, patela y tibia (3). La parte distal del fémur se divide en dos porciones, un cóndilo lateral y un medial separado por un surco intercondileo, estos cóndilos una estructura adaptada para su contacto con el platillo tibial, esto es importante ya que permite el adecuado movimiento de la articulación

(4). La porción proximal de la tibia está formada por el platillo tibial el cual se divide en dos partes por la espina tibial. Los meniscos recubren el contorno del platillo tibial dando un soporte para el contacto entre los cóndilos femorales y los platillos tibiales (5)

(Figura1).

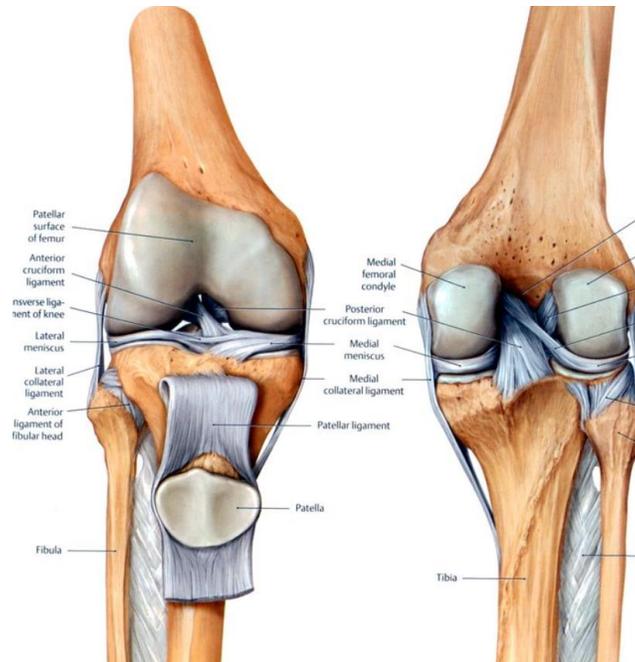


Figura 1. Anatomía de la rodilla. (Obtenido de <https://www.pinterest.com.mx/pin/501307002245530470/>)

2.1.2. Articulación femoro-tibial

La estabilidad de esta articulación es proporcionada por varios elementos tanto dinámicos como estáticos. La estabilidad dinámica está dada por los músculos que cruzan la rodilla, principalmente el musculo cuádriceps el cual actúa como el principal desacelerador de la rodilla, además de ser antagonista del ligamento cruzado anterior y previene la subluxación posterior en caso de haber lesión del ligamento cruzado posterior. Los músculos isquiotibiales actúan principalmente como antagonistas del ligamento cruzado posterior además de prevenir la subluxación anterior en caso de lesión del ligamento cruzado anterior. Otra función es tensar los ligamentos capsulares tanto mediales como laterales, esto elimina la laxitud de la articulación e incrementa el área de carga de la misma. La estabilidad estática está dada por los ligamentos, los meniscos y la topografía de las superficies articulares (6).

2.1.3. Articulación patelo-femoral

También llamada mecanismo extensor de la rodilla y está compuesto por 6 músculos (recto femoral, vasto medial, vasto intermedio, vasto lateral, musculo articular de la rodilla o articularis genu y el musculo vasto medial oblicuo) el tendón de cuádriceps, el ligamento rotuliano y la patela. La patela es el hueso sesamoideo más grande del cuerpo humano. Y es un componente crítico del mecanismo extensor de la rodilla, ya que proporciona una gran estabilidad dinámica en la flexo-extensión de la rodilla. Además de los componentes ya mencionados, también existen otras partes importantes que conforman el mecanismo extensor de la rodilla como la almohadilla grasa que se encuentra bajo el ligamento patelar desde el polo inferior de la patela hasta el tubérculo tibial. Otros componentes son la bursa prepatelar la cual se encuentra entre la piel y la superficie anterior patelar, la bursa infrapatelar se encuentra detrás del ligamento patelar pero en frente de la almohadilla grasa, estas bursas frecuentemente presentan inflamación debido a trauma o sobre uso (7).

2.2. Cuadricéps

El musculo cuádriceps está compuesto por 7 cabezas musculares (recto femoral, vasto medial, vasto intermedio, vasto lateral, musculo articular de la rodilla o articularis genu, el musculo vasto medial oblicuo y el musculo lateral oblicuo) las cuales son la principal unidad motora del mecanismo extensor (8) (Figura 2). El músculo genu articular es la cabeza más profunda de este equipo de músculos y es el único que no se inserta directamente en la patela, su inserción es en la plica sinovia superior, elevándola y protegiéndola en la flexo- extensión de la articulación. El vasto intermedio se origina en

la superficie antero-lateral del fémur y se inserta en la parte superior de la patela. El recto femoral discurre paralelo al vasto intermedio, se origina en la espina iliaca anteroinferior y pasa a formar parte del tendón del cuádriceps, el tendón del musculo recto femoral aunque es paralelo al tendón del musculo vasto intermedio los separa una pequeña bursa. Los músculos recto femoral, vasto medial, vasto lateral, el vasto medial oblicuo y lateral oblicuo terminan en una aponeurosis común la cual converge con el tercio anterior de la capsula articular, lo cual lo convierte en un retináculo el cual se une a la porción superficial de la patela y distalmente pasa a formar parte del periostio de la tibia. Los músculos restantes del componente extensor se insertan sobre el eje del fémur en diferente angulación (6).

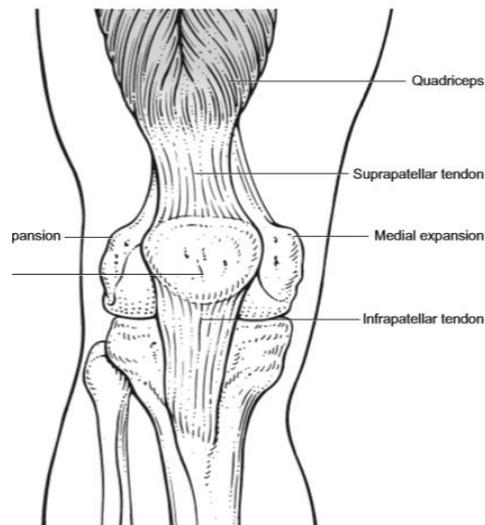


Figura 2. Mecanismo extensor de la rodilla. (Frandyly y Homel 2011, obtenido de: www.sportsmedarthro.com).

2.3. Tendón patelar

El tendón patelar se extiende del polo inferior de la patela y se inserta en el tubérculo de la tibia. El tendón patelar se encuentra separado de la parte proximal del tubérculo tibial por la bursa infrapatelar (9).

2.4. Estructuras sinoviales

2.4.1. Plica

La plica es un remanente embriológico su forma y desarrollo es muy variable y cambia de persona a persona (10). Normalmente tiene el grosor de una hoja de papel aunque puede engrosarse, romperse o sufrir contracturas causando anquilosis (9).

2.4.2. Almohadilla grasa

La almohadilla Grasa infrapatelar esta compuesta principalmente por tejido graso primario y por un aporte vascular de las arterias geniculadas inferiores, estas arterias también el soporte vascular al ligamento cruzado anterior (LCA). La almohadilla se encuentra suspendida del surco intercondíleo por el ligamento mucoso. Cuando esta estructura recibe daño constante puede causar anquilosis, bloqueo de la rodilla o dolor a la extensión.

2.5. Menisco

Los meniscos tienen una anatomía compleja y una amplia variedad de funciones biomecánicas como carga de peso, rotación, estabilidad y traslación (11, 12). El menisco

medial es más amplio que el menisco lateral, aunque su cuerpo es ligeramente más delgado. Se coloca de manera amplia sobre el surco intercondíleo, se encuentra anclado en el centro de la región posterior en la espina intercondílea, en su periferia se ancla a través de la porción menisco-tibial del ligamento del ligamento capsular. El menisco lateral tiene una forma parecida a un platillo la cual entra en armonía con la topografía del platillo tibial, en su parte anterior se une al ligamento cruzado anterior en su sitio de inserción, en su parte posterior se ancla a los ligamentos de Wrisberg y Humphry.

2.6. Ligamento cruzado anterior

Los ligamentos cruzados de la rodilla son los encargados de regular la cinemática articular y los órganos sensores que informan de la musculatura periarticular, influyendo sobre la posición de las superficies articulares, la dirección y la magnitud de las fuerzas y también, de forma indirecta, sobre la distribución de las tensiones articulares. Una de las funciones fundamentales del ligamento cruzado anterior (LCA) es impedir el desplazamiento anterior de la tibia con relación al fémur y, en menor medida, controlar en carga la laxitud en varo, en valgo y la rotación. La ruptura del LCA, aislada o combinada con lesiones meniscales o de los ligamentos colaterales, produce cambios degenerativos entre el 60 y el 90% de los pacientes entre 10 y 15 años después de la lesión, por lo cual es fundamental un profundo conocimiento en la anatomía y morfología del ligamento cruzado anterior (LCA) para su reconstrucción anatómica (13).

2.6.1. Histología

Los ligamentos cruzados consisten en una matriz de colágeno altamente organizada, que representa aproximadamente tres cuartas partes de su peso seco. La mayoría del colágeno es tipo I (90%) y el resto es tipo III (10%).

En el LCA, este colágeno se organiza en múltiples haces de fibras de 20 μm que se agrupan en grupos de 20-400 μm de diámetro. Los fibroblastos y otras sustancias, como la elastina (5%) y los proteoglicanos (1%), constituyen el resto del peso seco. El agua constituye el 60% del peso neto en condiciones fisiológicas. A nivel microscópico, las inserciones de ligamentos y tendones en el hueso tienen una estructura distinta que consiste en fibrillas de colágeno directamente continuas con fibrillas dentro del hueso. Entre los fascículos de colágeno se encuentran fibroblastos, componentes elásticos y oxitalán (6%) (14). En el LCA las moléculas de colágeno se agrupan de forma multidireccional configurando la unidad estructural más pequeña del ligamento que es la fibrilla, la fibrilla (25- 250 nm diámetro) se agrupa formando una red de fibras (10-20 μm) que a su vez se organizan en unidades subfasciculares (100-250 μm) (15). Dichas unidades se agrupan entre sí formando los subfascículos y dichos están rodeados por el endotenón (16). La unión de 3 a 20 subfascículos origina un fascículo (250 μm -2mm), envuelto a su vez por el epitenón. El LCA se forma de la unión de múltiples fascículos orientados en espiral y recubiertos por el paratenón. El LCA se inserta en el hueso gracias a una zona de transición de fibrocartílago y fibrocartílago mineralizado. Esto permite un cambio gradual de las propiedades mecánicas del ligamento y previene la concentración de fuerzas de estrés en los puntos de inserción (17). Existe un área histológicamente distinta en el LCA: más avascular y con presencia de células parecidas

a tenocitos y condrocitos. Corresponde al área de contacto del mismo contra el techo de la escotadura (impingement fisiológico) (18). Su presencia podría explicarse como adaptación funcional del ligamento a las fuerzas compresivas recurrentes causadas por el contacto directo del hueso con el ligamento con la extensión de la rodilla (18). Aunque el LCA se describe generalmente como una estructura formada por dos haces funcionalmente diferenciados (19, 20), en la mayoría de los estudios publicados no se han encontrado evidencias histológicas de dicha subdivisión.

2.6.2. Anatomía macroscópica

El LCA se origina proximalmente en la parte posterior de la superficie medial del cóndilo lateral femoral y se inserta distalmente en el platillo tibial en la fosa intercondílea anterior, entre la espina tibial lateral y medial. Circula oblicuamente a través de la escotadura intercondílea, con dirección posteroanterior, lateromedial y distal en la articulación (21). Antes de insertarse en la tibia, el ligamento realiza un giro y torsión sobre sí mismo bajo el techo de la escotadura intercondílea. El ligamento está formado por un conjunto de fibras de diferente longitud según su punto de inserción. Aunque se ha dividido el ligamento hasta en 3 (anteromedial, intermedio y posterolateral) (11, 22, 23) e incluso 4 haces distintos (24), se acepta que el LCA está formado por 2 fascículos principales (25-27). En 1968 Lam y colaboradores denominan a estos dos fascículos como anteromedial (AM) y posterolateral (PL) en función de la localización de su inserción tibial (24). Las dimensiones del ligamento varían por un lado en función de los fascículos estudiados y, por otro, de la elasticidad de los mismos (según Beauchamp (28) pueden alargarse un 25-30% de su longitud). La longitud intraarticular media del LCA es de 32 mm (rango 22-

41 mm) (29). La diversidad de medidas que se encuentran en la literatura (Tabla 1) se explica por los diferentes sistemas de medición empleados, el modo de cálculo, el sexo, la edad y el espécimen estudiado (30). Por regla general, los estudios con mediciones directas en cadáver calculan la longitud de las fibras más anteriores del LCA (31), que corresponden en realidad a las fibras del haz AM. La anchura media del LCA es de 10 ± 2 mm (7-12 mm). No es una dimensión uniforme a lo largo del ligamento, ya que las inserciones en la tibia y el fémur pueden llegar a ser el doble de anchas que en su porción media. Su forma varía según el ángulo de flexión de la rodilla (circular, oval, elíptica) (32). Atendiendo a su división bifascicular, la anchura del haz AM sería de $5,1 \pm 0,7$ mm y la del PL $4,4 \pm 0,8$ mm. El área de sección es de 28-58 mm² en la porción media del ligamento (44 mm² en hombres y 36 mm² en mujeres ajustando talla y peso) (33). Aumenta desde los 34 mm² de media cerca de la inserción femoral hasta los 42 mm² cerca de la inserción tibial (21). El área que ocupan cada uno de sus fascículos es de aproximadamente un 50% del total.

2.6.3. Inserción femoral

El LCA se inserta en la parte posterior de la superficie medial del cóndilo femoral lateral. El límite anterior del ligamento está marcado por una pendiente ósea que llega hasta el cartílago articular: la línea intercondilaris (cresta intercondilar o “cresta del residente”) (34). En un 80% de personas, en el cóndilo femoral lateral existe la llamada cresta bifurcada, que separa el origen de los dos fascículos del LCA y es perpendicular a la línea intercondilaris.

Se ha descrito la inserción femoral considerando el LCA bien como un haz único o bien dividido en dos fascículos. A continuación, se explica la forma de la huella de inserción, sus dimensiones (lineales y de superficie) y su localización. Respecto a este último dato, para ubicar la inserción femoral se han utilizado dos métodos. El primero referencia el punto central de la huella o su perímetro respecto a puntos anatómicos reconocibles de la zona. El segundo localiza la huella de inserción empleando referencias obtenidas inicialmente en radiografías. Considerando el LCA como una unidad, Girgis (35) describe su inserción como un área semicircular de parte anterior verticalizada y parte posterior convexa, de dirección oblicua con respecto a la diáfisis femoral. Sin embargo, estudios ulteriores dibujan un área más ovalada (36) o circular, cuyo origen sería más posterior.

El área de inserción del ligamento está cubierta por una capa de membrana sinovial. Dependiendo de la técnica empleada, esta descrito en la literatura las diferencias en las medidas de esta superficie. Las de menor tamaño se realizan tras quitar la membrana sinovial y están entre 65 y 83 mm². Si se preserva dicha membrana, las medidas son mayores siendo de media 113 ± 27 mm². En cuanto a sus dimensiones, el diámetro mayor de dicha inserción es de 18 mm de media (13-25 mm); el diámetro menor de 11 mm (6-13 mm). El ángulo de inclinación con la diáfisis femoral es de 26±7 grados. El punto de referencia más frecuentemente utilizado para localizar la inserción femoral del LCA es la cortical posterior del cóndilo femoral lateral, en la unión entre el techo y la pared lateral de la escotadura intercondílea. Es el llamado "over the top". La distancia desde ese punto al borde posterior del LCA sería de 4 mm de media (2,5-4,5 mm) (37).

El haz AM mide 9 mm de diámetro mayor (7-11) y 7 mm de diámetro menor (4-11). El haz PL mide 6 mm de diámetro mayor (4-10) y 7 mm de diámetro menor (4-11).

2.6.4. Inserción tibial

A medida que se acerca a su inserción en la tibia, el LCA se abre en forma de abanico anteriormente hacia un área amplia y deprimida situada por delante y lateral al tubérculo intercondilar medial. En su trayecto, pasa por debajo del ligamento meniscal intertransverso y manda algunas de sus fibras al cuerno anterior del menisco lateral y, de forma inconstante, al cuerno posterior del mismo. Los haces del LCA toman su nombre por su posición relativa en la inserción tibial. Así, el haz AM se inserta anteromedial en la superficie de inserción tibial mientras que el PL lo hace en la zona posterolateral de la misma (38). Las dimensiones de la inserción del haz AM son 12 ± 2 mm (8-17) de longitud y 5 ± 1 mm (3-9) de diámetro. El haz PL es algo menor y mide 10 ± 2 mm (7-14) de longitud y 4 ± 1 mm (2-7) de diámetro (39). El área que ocupa cada uno de los haces en el cómputo global de la superficie de inserción es de 67 mm^2 (haz AM) y de 52 mm^2 (haz PL) (39, 40) La distancia entre el centro de los dos haces es de $8,4 \pm 0,6$ mm (7-8 mm). Si se toma como referencia el cuerno anterior del menisco lateral, el centro del haz AM estaría alineado con la parte posterior del mismo, y el centro del haz PL se encontraría a 7-8 mm hacia posterior. La distancia desde la inserción anterior del menisco medial (41) al centro del haz AM es de $2,7 \pm 0,5$ mm hacia posterior y $5,2 \pm 0,7$ mm a medial. El PL se encuentra $11,2 \pm 1,2$ mm posterior y $4,1 \pm 0,6$ mm medial a dicho menisco.

La distancia del centro de los haces al margen anterior del platillo tibial es de 13-17 mm en el caso del haz AM ($28,6 \pm 5,3$ % de la longitud AP del platillo) y 20-25 mm el PL^{71,98,99} ($32,1 \pm 5,9$ %) (40). Otra referencia ósea empleada para determinar la posición de la inserción del LCA es la espina tibial medial⁷⁴. El centro del haz AM está $3,0 \pm 1,6$ mm lateral a la espina, y el centro del PL a $7,2 \pm 1,8$ mm. La distancia desde el centro del haz AM y PL al “over-the-back” es de 17 ± 2 mm y de 10 ± 1 mm respectivamente (42, 43).

2.6.5. Vascularización e inervación

El aporte sanguíneo del LCA procede principalmente de ramas de la arteria geniculada media (44), con contribución de algunas ramas de la arteria geniculada lateral inferior. Se forma una red vascular periligamentosa que penetra al ligamento de forma transversal y se anastomosa con una red de vasos endoligamentosos orientados longitudinalmente. Recibe también cierta vascularización del plexo sinovial a lo largo de su recorrido. La inserción del ligamento en el hueso se nutre de los vasos sinoviales que se anastomosan con los del periostio (45, 46). En cuanto a su inervación, el LCA recibe fibras nerviosas procedentes del nervio tibial. Penetran a la articulación por la cápsula posterior y corren entre la sinovial y los vasos periligamentosos que rodean al ligamento. En su mayoría tienen función vasomotora. Algunas fibras podrían tener también una función sensorial o propioceptiva. Las fibras nociceptivas son virtualmente inexistentes. Hay muy pocos receptores en el LCA, y se sabe que estos disminuyen con la edad y la presencia de microlesiones. Se han identificado dos tipos diferentes de mecanoreceptores, que se sitúan por debajo de la sinovial y cerca de las inserciones óseas del ligamento: los

receptores primarios de Ruffini y los corpúsculos de Pacini. También encontramos terminaciones nerviosas libres, que podrían desarrollar una función nociceptiva o ser efectores locales de neuropéptidos con efecto vasoactivo (47).

2.7. Función del ligamento cruzado anterior

2.7.1. Estabilidad anteroposterior

La estabilidad anteroposterior de la rodilla depende de la acción combinada de elementos capsuloligamentosos (cápsula articular, ligamentos laterales, meniscos y ligamentos cruzados) y elementos musculares accesorios. El LCA dirige el deslizamiento del cóndilo femoral en dirección anterior durante la flexión de la rodilla. Es considerado el principal restrictor primario de la traslación anterior de la tibia respecto al fémur, ejerciendo su actividad con mayor resistencia entre los 15 y los 30 grados de flexión (48, 49). Está globalmente tenso en extensión y flexión completa. Durante la flexión pasiva, las fibras posteriores se distienden en mayor grado que las anteriores, para tensarse de nuevo con la flexión completa. Cada uno de sus fascículos contribuye de forma individual asegurando dicha estabilidad (50). Aunque se comportan de forma biomecánicamente diferente, muestran cierto sinergismo en su función (51). Con la rodilla en extensión los fascículos AM y PL son prácticamente paralelos entre sí, estando el PL tenso y el AM moderadamente laxo. Con la flexión de la rodilla, el AM hace un giro lateral sobre el PL, aumentando gradualmente su tensión mientras el PL se relaja¹⁰⁰. El haz AM es considerado el principal limitador de la traslación anterior de la tibia sobre el fémur con la rodilla en flexión (52).

2.7.2 Estabilidad rotacional

Con la rodilla en extensión, el LCA funciona como estabilizador secundario controlando la rotación interna, y algo menos la externa. En flexión, limita la rotación externa sin tener ninguna acción sobre la interna. Así como el haz AM es básico para la estabilidad anteroposterior de la rodilla, el haz PL es clave para mantener la estabilidad rotacional de la misma. Por isometría se entiende la conservación de la distancia entre dos puntos. Aplicado a la biomecánica de los ligamentos cruzados, la isometría presupone un estado de longitud constante entre los dos extremos de inserción de los mismos durante el rango de movimiento de la rodilla. Los ligamentos cruzados nativos tienen la habilidad de mantener una tensión casi uniforme a lo largo del movimiento gracias a su arquitectura compleja. El concepto de isometría tiene mayor validez cuando se analiza una fibra única que para el LCA, LCP o sus correspondientes injertos. Se han realizado numerosos estudios biomecánicos en diferentes condiciones definiéndose cambios de longitud entre los puntos de inserción del LCA durante la flexo-extensión de hasta 4-6 mm de media. Se acepta por tanto que el LCA no es estrictamente isométrico (53). Se reconoce la existencia de un “comportamiento isométrico” por el cual variaciones en la longitud del ligamento de 2 a 3 mm son consideradas normales, y no afectan a la función del mismo. Si atendemos a la división bifascicular del LCA, el haz AM es el más isométrico de los dos, alargándose máximo 3 mm con la flexión de la rodilla sin carga de peso. El haz PL, no sigue las leyes de la isometría, mostrando una mayor variabilidad con alargamientos mayores de 5 mm con la extensión de la rodilla (54). Los movimientos de rotación de la rodilla también afectan la longitud del LCA: la rotación tibial interna alarga más las fibras del LCA que la externa (55); no obstante, en valor absoluto la longitud del LCA no se

afecta con la rotación tibial. Existen en la literatura publicada una amplia variedad de puntos de inserción femoral y tibial que reproducen dicho comportamiento isométrico (56, 57). En cuanto a la inserción femoral, la mayor parte de los autores revisados sitúan la inserción isométrica en el punto central del área de inserción (58, 59). No obstante, hay publicaciones que la sitúan en la región más posterior de la misma, mientras otras lo hacen en la región más anterior.

2.8. Selección de injerto en reconstrucción de ligamento cruzado anterior

El injerto ideal debe reproducir las propiedades estructurales del LCA normal, debe tener una baja tasa de morbilidad, fácil disponibilidad, baja reacción inmunogénica y proveer además una fijación fuerte para permitir una rehabilitación precoz y exigente (1). Por otro lado, el uso de determinado tipo de injerto debe ser seleccionado según cada paciente en relación con su actividad deportiva y expectativas.

Tabla 1. Clasificación de los diferentes injertos utilizados

Autoinjertos	Alloinjertos	Injertos sintéticos
Tendón patelar	Aquiles / Tendón patelar	Matrices
Tendones isquiotibiales	Isquiotibiales / Tendon cuadricipital	Stents
Tendón cuadricipital	Tibial anterior o posterior / Fascia lata	Prótesis

* En el grupo de autoinjertos se considera los más ampliamente utilizados

2.9. Tipos de injerto y sus características

2.9.1. Tendón rotuliano

El injerto se obtiene del tercio central del tendón patelar con la pastilla ósea de patela y tuberosidad tibial adyacente en los extremos respectivos. Ha sido considerado históricamente cómo el gold standard (3,4) para la reconstrucción del LCA, basado en su extenso uso; al ser uno de los primeros injertos utilizados, es también el que tiene un mayor seguimiento. Sus ventajas radican en la incorporación más temprana de la pastilla ósea (6 semanas) (5), debido a que la interfase hueso-hueso logra una consolidación mejor que la interfaz tejido blando-hueso de los otros injertos. Además, su fijación es segura, siendo superior a los injertos de partes blandas, alcanzando tanto con tornillos metálicos como bioabsorbibles una resistencia de 552 a 558 N (6). Ambas características permiten una rehabilitación más agresiva y un retorno deportivo más precoz. Otras ventajas comparativas son que no altera la fuerza de los isquiotibiales sanos y que se asocia a un menor costo relacionado con los medios de fijación. Los principales riesgos descritos (7) para este injerto son la fractura patelar tanto intraoperatoria como después de la cirugía (2,3%), la fractura de fatiga de la tibia, el daño articular del cartílago patelar y la rotura tendinosa. Este injerto se ha asociado a un mayor riesgo de dolor en la cara anterior de la rodilla, con una incidencia del 17,4 al 47%(8). Por otra parte, el autoinjerto de los tendones isquiotibiales presenta dolor en la rodilla en el 11,8% (9) de los casos y no existe diferencia en el dolor anterior al comparar injerto de tendón patelar con el aloinjerto. Por eso se ha pensado que la incidencia de dolor anterior obedece en cierta medida a un programa de rehabilitación deficiente y no al tipo de injerto. Otras

complicaciones descritas (8) incluyen el desarrollo de tendinosis (6%) y daño de la rama infrapatelar del nervio safeno. Si bien se ha descrito atrofia de cuádriceps tras la cirugía en el 10% de los casos (8), otros estudios muestran que la toma del injerto patelar no disminuye la fuerza del músculo cuádriceps en pacientes que siguen un programa de rehabilitación intensiva (10). Técnicamente, también ofrece algunas dificultades en reconstrucciones anatómicas, donde los túneles son más cortos y este injerto puede ser de mayor longitud, comprometiendo la fijación ósea en el túnel tibial.

Tabla 2. Propiedades biomecánicas en diferentes injertos disponibles para la reconstrucción del LCA.

Injerto	Carga de tracción máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Área sección transversal
Ligamento cruzado anterior nativo	2150	242	44
Tendón patelar (10 mm) auto y aloinjerto	2977	455(auto) 620 (alo)	32
Tendón semitendinoso–gracilis auto y aloinjerto	4090	776	53
Tendón del cuádriceps (10mm) autoinjerto	2176	463	62
Tendón de Aquiles	4617	685	67
Aloinjerto tibial anterior	4122	460	48
Aloinjerto tibial posterior	3592	379	44

2.9.2. Tendones flexores (isquiotibiales)

Este injerto se obtiene de los tendones de inserción de los músculos semitendinoso y gracilis. Existe una diversidad de técnicas descritas en cuanto a utilizarlo cuádruple, triple o quíntuple, así como en los sistemas de fijación utilizados para ellos. Sus ventajas están dadas por ser un procedimiento más estético, con mayor resistencia biomecánica del injerto cuádruple (11) y menor dolor en la zona dadora. En las reconstrucciones anatómicas ofrece ventajas técnicas a considerar. En relación con sus desventajas, se

debe considerar que su diámetro no es predecible, lo que es fundamental dado un mayor riesgo de rotura en diámetros inferiores a 8 mm. También la integración del tendón al hueso es más lenta (12 semanas) y presenta menor resistencia en sus fijaciones, especialmente en el túnel tibial. Se ha demostrado una mayor elongación del injerto, principalmente en mujeres, niños y pacientes hiperlaxos (12). Las complicaciones asociadas a su uso consisten en el daño del nervio safeno y las eventuales complicaciones neurovasculares. La debilidad de la musculatura isquiotibial residual demuestra que se corrige a partir del tercer mes, sin observarse implicancia en los resultados clínicos (1).

2.9.3. Tendón cuadricipital

Quizá menos popular que el tendón patelar y los isquiotibiales en nuestro medio, es una alternativa viable para la reconstrucción del LCA. Staubli *et al* (13) demostraron las propiedades biomecánicas del tendón y Fulkerson *et al* (14) vieron buenos resultados iniciales. El injerto se toma con una pastilla ósea, de 10 × 20 mm, de la patela proximal y resecao aproximadamente 7 cm de tendón hacia proximal, puede presentar una mayor dificultad técnica, ya que se debe evitar dañar el receso suprapatelar. El tendón cuadricipital tiene la ventaja de ofrecer una mayor área de sección transversal para la porción intraarticular del injerto, otorgando buenas propiedades biomecánicas. Tiene menor tasa de dolor anterior postoperatorio comparado con el tendón patelar, pero puede generar una cicatriz antiestética (15). Otra desventaja es debilidad muscular postoperatoria, al comprometer el aparato extensor (16).

2.9.4. Aloinjertos

La gran ventaja de los aloinjertos es evitar la morbilidad de la zona dadora. Sin embargo, presenta el riesgo potencial de transmisión de enfermedades y, por esta razón, existe un estricto control del tejido cosechado y del historial médico del donante. En la bibliografía solo existe un caso descrito de transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y dos casos de transmisión de hepatitis C (17). El riesgo estimado para transmisión de VIH es de 1: 600.000(18) y de 26 en 1.000.000 para infección bacteriana (16). El aloinjerto ofrece una amplia variedad de alternativas, con diversidad de tamaños, permitiendo elegir según la longitud, el grosor, la resistencia y el tipo de fijación (ósea o partes blandas). El tendón patelar y el tendón de Aquiles son los más utilizados, aunque aloinjertos de músculo Tibial anterior, músculo tibial posterior y del tendón del músculo peroneo largo han demostrado una mayor resistencia biomecánica (19). El aloinjerto necesita mayor tiempo de incorporación y tiene menor resistencia biomecánica inicial comparado con los autoinjertos. Influye en esta menor resistencia el proceso de esterilización requerido para su uso. Rappe *et al* (20) demostraron un 33% de fallos en el aloinjerto de tendón de Aquiles irradiado con 2 a 2,5 Mrad, comparado con el 2,4% del aloinjerto no irradiado. Se debe considerar además su disponibilidad y mayor costo.

2.9.5. Injertos sintéticos

Con el objetivo de encontrar un injerto ideal, se han desarrollado y utilizado injertos sintéticos (Tabla 3). Estos pueden ser clasificados en matrices, stents o prótesis (21). Una matriz es fabricada a partir de biomateriales sintéticos (fibra de carbono, tereftalato de polietileno, etc.) que estimulan el crecimiento del tejido fibroso; a este grupo pertenece

el LARS (Ligament augmentation and reconstruction system). Los stents están pensados para proteger la consolidación de un injerto biológico durante su fase de incorporación; el LAD (Kennedy ligament augmentation device) es un buen ejemplo. Las prótesis son sustitutos del injerto biológico, fabricados con poliéster y GORE-TEX®; en esta categoría encontramos implantes como el ABC (active biosynthetic composite, Surgicraft Ltd.). Desafortunadamente, estos dispositivos presentan una alta tasa de fracasos y complicaciones (22). Las matrices de fibras de carbono se asocian a sinovitis, fracaso del crecimiento tisular e integración con los túneles óseos, con la subsecuente pérdida de las propiedades biomecánicas. En nuestro medio no se consideran como alternativa, ya que los utilizados previamente mostraron un alto grado de complicaciones, así como fracaso de la plastia.

Tabla 3. Ventajas y desventajas e los injertos sintéticos.

Prótesis	Ventajas	Desventajas
Carbón	Reducción – Distribución del estrés entre el injerto y la unión del tejido blando. Estimula el crecimiento de colágeno en el implante.	Migración de partículas de desgaste de carbono y ruptura de implantes. Ruptura de implantes.
Gore – Trex	Resistencia a la tracción 3X LCA humano.	Aflojamiento progresivo a largo plazo
Dacron	El revestimiento de poliéster protege el implante de abrasiones	Poca estabilidad a largo plazo.
Leeds-Keio Ligamento Artificial	Actúa como medio para crecimiento de tejido. Mayor fuerza tensil que excede la del ACL nativo .	Rupturas de injerto a largo plazo.
Kennedy LAD	Protege el injerto de fuerzas excesivas	Inflamción intraarticular, sinovitis y efusiones.
Ligamento LARS	Imita la estructura y la estructura del LCA nativo, reduce la fuerza de cizallamiento del implante, la porosidad fomenta el crecimiento de tejido.	Laxitud postoperatoria residual. No cuenta con estudios de seguimiento a largo plazo.

Ingeniería de tejidos / Mallas	Duplica las propiedades mecánicas y estructurales del LCA nativo.	Pierde fuerza con el tiempo. La alogenicidad puede llevar al rechazo. Variabilidad de lote a lote. El colágeno no es tan modificable como los polímeros biodegradables.
-----------------------------------	---	---

2.10. Otras alternativas

2.10.1. Terapia celular

Las células madre mesenquimales son capaces de diferenciarse en fibroblastos que permiten la regeneración de los ligamentos y otros tejidos. La aplicación de estas células mediante inyecciones intraarticulares en rupturas parciales del LCA han demostrado buenos resultados en estudios en ratas. Esta técnica precisa de más estudios que avalen el uso de esta terapia para conseguir la diferenciación específica de las células madre mesenquimales en células especializadas en la reparación tisular, así como mejorar el desarrollo y mantenimiento de las células en el lugar de la lesión(60).

2.10.2. Terapia génica

La transferencia de genes permite, a través del uso de vectores, modular la expresión de factores de crecimiento en las células encargadas de la regeneración tisular modificando la síntesis de proteínas. Actualmente estudios basados en el uso de vectores virales en conejos con el LCA roto buscan incrementar la expresión de colágeno y otros factores de crecimiento en las células del LCA, con resultados que muestran incremento en la concentración de estas moléculas durante 6 semanas (61). Otro estudio reciente muestra que las células del LCA tratadas con vectores adenovirales consiguen expresar FGF-2

de forma mantenida que permite aumentar el proceso de curación en las lesiones del LCA en humanos (62). El uso de terapia génica se ve limitado por la necesidad de mantener esta expresión a lo largo del tiempo, y el riesgo potencial de desarrollo de tumores inducidos por los vectores.

2.10.3. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento (IGF, TGF, PDGF, VEGF, FGF, NGF) han demostrado ser capaces de regular y mejorar la proliferación celular, el crecimiento de matriz extracelular y de diferenciar a las células madre mesenquimales hacia fibroblastos. Diferentes estudios avalan el uso de estos factores como potenciadores en la reparación de ligamentos dañados (63). El plasma rico en plaquetas (PRP) ha sido empleado recientemente como tratamiento en distintas lesiones musculoesqueléticas. Este método permite obtener de forma sencilla una alta concentración de factores de crecimiento mediante la separación por centrifugación de las plaquetas y la sangre. El uso de PRP se fundamenta en el hecho de que las plaquetas inicialmente alcanzan el lugar de la lesión y liberan numerosas señales que favorecen la restitución del tejido dañado (64). Son relevantes en el desarrollo y producción de fibroblastos y colágeno los factores PDGF y TGF. El uso de PRP en el tratamiento de las lesiones del LCA ha sido estudiado por diversos autores que han encontrado mejoras en la reparación de lesiones del LCA in vitro y en modelos animales (65). No obstante, un reciente artículo indica que el uso aislado de PRP no es suficiente para promover la cicatrización en cruzados rotos tratados mediante sutura directa. Uno de los principales inconvenientes del uso de factores de crecimiento es la corta duración del efecto que presentan, así como el mantenimiento de

los factores en el lugar de la lesión y el desarrollo de técnicas que permitan su reproducción.

2.10.4. Scaffolds/matrices

El uso de matrices consiste en la aplicación de estructuras sintéticas o biológicas que han sido utilizadas en medicina regenerativa a modo de soportes de matriz extracelular. En el caso del LCA se han empleado diversas matrices de colágeno mostrando resultados prometedores en la regeneración del LCA. La submucosa de intestino delgado de cerdo contiene un alto contenido en colágeno, así como diversas citoquinas y factores de crecimiento útiles para la cicatrización de tejidos conectivos (66). Uno de estos estudios, utilizando una cabra como modelo, indica que a través de una matriz extracelular basada en submucosa de intestino delgado de cerdo se acelera la curación en la sutura directa tras una ruptura controlada del LCA, con una hipertrofia limitada del tejido y cierta mejoría en las propiedades biomecánicas (67,68). No obstante, un estudio reciente indica que el uso de matrices basadas en colágeno de forma aislada no mejora las propiedades funcionales en LCA tratados mediante sutura directa en modelos animales.

Se han presentado recientemente estudios que avalan el uso de una matriz extracelular basada en colágeno suplementado con PRP y sutura directa que mejora la reparación del LCA en animales comparado con la sutura directa aislada del LCA lesionado (69). Esta técnica combinada de matriz extracelular y PRP se fundamenta en la hipótesis de que la reparación espontánea del LCA no se produce debido a la ausencia inicial de hematoma entre los dos extremos del LCA roto por el efecto de lavado que genera el

líquido sinovial en el que se halla inmerso el ligamento y al consiguiente déficit de factores de crecimiento que se encuentran en el coágulo (70). Empleando como modelo el cerdo, realizan un estudio comparando la respuesta a los 6 meses y al año en cerdos en los que se opta por tratamiento mediante sutura directa, reconstrucción quirúrgica mediante aloinjerto HTH, reconstrucción quirúrgica mediante aloinjerto HTH más matriz de colágeno con PRP (“bioenhanced ACL reconstruction”) y reparación quirúrgica mediante sutura del LCA implementada con matriz de colágeno con PRP (“bioenhanced ACL repair”). Al año de seguimiento las articulaciones tratadas mediante reparación bioestimulada presentaban menos lesiones cartilaginosas que el resto de grupos de la comparación. Al parecer, esta nueva técnica permite desarrollar un nuevo método de tratamiento menos invasivo que la re- construcción quirúrgica del LCA que conduce al desarrollo de un ligamento adecuado biomecánicamente, así como reducir el daño en el cartílago que aparece tras la lesión del LCA (71).

2.10.5. Kevlar®

El Kevlar o poliparafenileno tereftalamida es una poliamida sintetizada por primera vez en 1965 por la química Stephanie Kwolek. El Kevlar® es tan fuerte como los cables de acero, pero tiene solo cerca del 20% de su peso, es muy flexible y más resistente que el Nylon (72). En el área de la ortopedia, el Kevlar® ha sido utilizado en forma de placas óseas, puentes dentales y cemento óseo (73). Nasiri *et al* (2018) investigaron las propiedades mecánicas de un compuesto tubular hecho a base de carbono/Kevlar® recubierto con poli-metilmetacrilato/nanoplacas de grafeno tal como se usa en la fijación interna de los huesos. Los resultados mostraron que las propiedades físicas de la trenza

de carbono/Kevlar®, la distribución y el diámetro dieron como resultado la uniformidad de la matriz, lo que mejoró la resistencia debido a una mejor capacidad para distribuir el esfuerzo sobre el compuesto. Finalmente, dado que las nanoplacas de grafeno demostraron propiedades potenciales para mejorar la cicatrización de heridas destinadas a la sustitución ósea, reforzar la matriz de poli-metilmetacrilato con nanoplacas de grafeno y Kevlar®, mejoró la calidad del compuesto para su uso como implante (74).

CAPÍTULO III

JUSTIFICACION

Actualmente no existe un biomaterial definitivo de reemplazo para el Ligamento Cruzado Anterior que presente características biocompatibles y biomecánicas adecuadas.

CAPÍTULO IV

HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis de trabajo

La prótesis de reemplazo del LCA a base de matriz sintética de Kevlar® recubierta de fibroblastos autólogos cumple con los requerimientos de biocompatibilidad y de biomecánica.

4.2. Hipótesis nula

La prótesis de reemplazo del LCA a base matriz sintética de Kevlar® recubierta de fibroblastos autólogos no cumple con los requerimientos de biocompatibilidad y de biomecánica.

CAPÍTULO V

OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la biocompatibilidad y el efecto de los fibroblastos adheridos a la matriz sintética de Kevlar® en la reconstrucción del ligamento cruzado anterior en modelos experimentales.

5.2. Objetivos particulares

1. Evaluar *in vitro* la interacción de los fibroblastos con el Kevlar®
(**biocompatibilidad**)
2. Evaluar *in vivo* la **funcionalidad** de la rodilla posterior a la reconstrucción del LCA
3. Evaluar *in vivo* la **integración** de la prótesis de reemplazo del LCA

CAPÍTULO VI

MATERIAL Y METODOS

6.1. Diseño del estudio

El presente trabajo es un estudio experimental en modelo animal, transversal, comparativo y prospectivo. Con aprobación del Comité de Ética y Comité de investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León con registro **OR14-008**.

6.2. Modelo experimental

El modelo animal elegido fue el conejo, con un peso promedio de 4.5 kg y edad de 4 meses aproximadamente.

6.3. Grupos de estudio

Se utilizaron 27 conejos de características similares en sexo, peso, talla, edad y estado clínico. Se dividieron en tres grupos de 9 conejos cada uno (Figura 3). En cada espécimen se evaluaron ambas extremidades posteriores, de las cuales: la rodilla izquierda se utilizó como control y la rodilla derecha fue utilizada como estudio. Ambas extremidades se evaluaron con pruebas clínicas, biomecánicas y patológicas. De tal forma que cada grupo se subdividió en tres grupos, según la prueba a realizar.

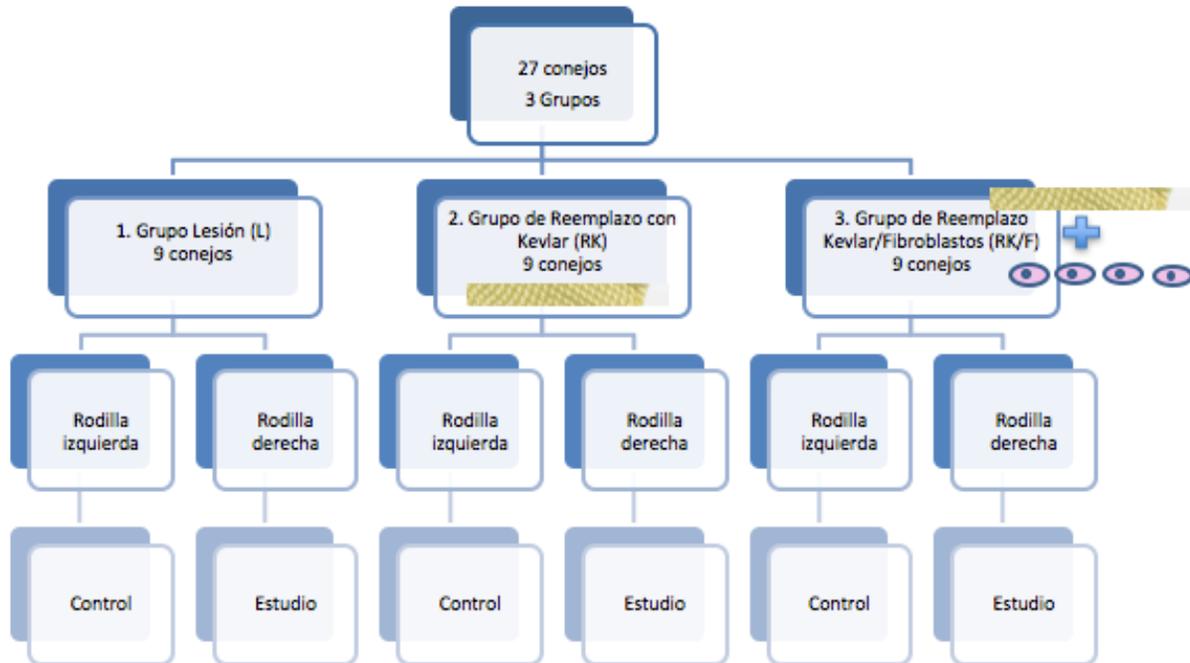


Figura 3. Distribución de los grupos de estudio.

El primer grupo se le llamó grupo Lesión (L) ya que se le retiró quirúrgicamente el ligamento cruzado anterior de la rodilla derecha, sin realizar técnica alguna de reparación ligamentaria. En ambas rodillas se le realizaron pruebas de evaluación clínica (I), biomecánica (II) y patológica (III), de tal forma que:

1. Grupo Lesión (L)

a. Control (C) Rodilla izquierda:

- i. Evaluación Clínica (I) L-C-I
- ii. Evaluación Biomecánica (II) L-C-II
- iii. Evaluación Patológica (III) L-C-III

b. Estudio (E) Rodilla derecha:

- i. Evaluación Clínica (I) L-E-I
- ii. Evaluación Biomecánica (II) L-E-II
- iii. Evaluación Patológica (III) L-E-III

Al segundo grupo o grupo de reemplazo con prótesis de Kevlar® (RK), se le retiró quirúrgicamente el ligamento cruzado anterior de la rodilla derecha y en el mismo procedimiento quirúrgico se llevó a cabo la reconstrucción del ligamento con material sintético a base de Kevlar®. En ambas rodillas se le realizamos pruebas de evaluación clínica (I), biomecánica (II) y patológica (III), de tal forma que:

2. Grupo Reemplazo Kevlar® (RK)

- a. Control (C) Rodilla izquierda:
 - i. Evaluación Clínica (I) RK-C-I
 - ii. Evaluación Biomecánica (II) RK-C-II
 - iii. Evaluación Patológica (III) RK-C-III
- b. Estudio (E) Rodilla derecha:
 - i. Evaluación Clínica (I) RK-E-I
 - ii. Evaluación Biomecánica (II) RK-E-II
 - iii. Evaluación Patológica (III) RK-E-III

Al tercer grupo, o grupo de reemplazo con prótesis de Kevlar® recubierto con fibroblastos, se le retiró quirúrgicamente el ligamento cruzado anterior de la rodilla derecha y en el mismo procedimiento quirúrgico se llevó a cabo la reconstrucción del ligamento con material sintético a base de Kevlar® recubierto con fibroblastos. En ambas rodillas se realizaron pruebas de evaluación clínica (I), biomecánica (II) y patológica (III), de tal forma que:

3. Reemplazo Kevlar®/Fibroblastos (RK/F)

- a. Control (C) Rodilla izquierda:
 - i. Evaluación Clínica (I) RK/F-C-I
 - ii. Evaluación Biomecánica (II) RK/F -C-II
 - iii. Evaluación Patológica (III) RK/F -C-III
- b. Estudio (E) Rodilla derecha:
 - i. Evaluación Clínica (I) RK/F -E-I
 - ii. Evaluación Biomecánica (II) RK/F -E-II
 - iii. Evaluación Patológica (III) RK/F -E-III

6.4. Lugar del estudio

Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León un mes antes de ser operados.

6.5. Recursos materiales

El recurso económico fue aportado por el Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario "Dr. José E. González" y se contó con el apoyo del área de Bioensayos del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.6. Toma de biopsia

Se tomaron biopsias de piel y se procedió a la extracción de los fibroblastos mediante una incubación con tripsina/EDTA por 30 minutos. (tripsina degrada o corta los enlaces de tejido conectivo y el EDTA secuestra magnesio, calcio, que favorece la adhesión celular). Posteriormente se cultivaron los fibroblastos por dos semanas hasta que se obtuvieron 1×10^6 células. Una vez que se tuvo el número deseado de células, se incluyeron en un adhesivo comercial de fibrina (TISEEL, Baxter Inc. Austria.) para aplicarlas directamente sobre el Kevlar. El Tisseel, simula la cascada de coagulación, se mezclan Fibrinógeno y Trombina entre otros factores para formar un coagulo estable de fibrina.

6.7. Ensayo de viabilidad

El adhesivo con las células en su interior, se colocó en toda la extensión del Kevlar y se dejó fraguar por 3 minutos aproximadamente. Posteriormente, se adicionó medio de cultivo (HAM/F12 + suero + antibiótico) y se incubaron a 37°C y 5%CO₂. Para realizar el ensayo se tomaron muestras de Kevlar/Fibroblastos por triplicado y se contaron las células a las 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs. Para medir la viabilidad de las células en el implante se utilizó Azul Alamar (abD Serotec®). A los implantes de Células/Fibrina/Kevlar se les añadió el medio correspondiente, preparado con 10% de azul alamar, se dejó incubando por 3 h a 37°C y 5% de CO₂. Pasado el tiempo se colocó el medio en placas de 96 pozos para su lectura. La placa de 96 pozos que contenía el medio se leyeron en un espectrofluorómetro con el filtro verde de 525 nm a las 24, 48 y 72 horas. Los datos se normalizaron con la lectura del medio correspondiente (sin células) que contenía 10% de azul alamar por el mismo periodo de tiempo.

6.8. Cuidado pre-quirúrgico

Los conejos permanecieron en ayuno completo durante 8 horas previas al procedimiento quirúrgico. Fueron anestesiados con Ketamina al 10% (45-60 mg/kg) intravenoso, con vías de acceso permeable en la vena marginal de ambas orejas con catéter 24, de acuerdo a la dosis ponderal.

6.9. Técnica quirúrgica

La misma técnica fue realizada en todos los modelos experimentales. Al grupo Lesión (L), se les realizó la escisión de ligamento cruzado anterior. Al grupo de reemplazo con

prótesis de Kevlar® (RK), se les realizó la escisión de ligamento cruzado anterior y reconstrucción del mismo con prótesis de Kevlar®. Al grupo de Reemplazo con Prótesis de Kevlar® recubierto con Fibroblastos (RK/F), se le retiró quirúrgicamente el ligamento cruzado anterior de la rodilla derecha y en el mismo procedimiento quirúrgico se llevó a cabo la reconstrucción del ligamento con material sintético a base de Kevlar® recubierto con fibroblastos autólogos.

Una vez bajo el efecto anestésico se realizó tricotomía de la rodilla derecha. Posteriormente se realizó asepsia del área quirúrgica, realizando un lavado exhaustivo con Isodine espuma. Bajo técnica estéril, se colocaron campos estériles para aislar la rodilla derecha. Una vez realizado esto, se realizó una artrotomía anterior de la rodilla derecha, iniciando con una incisión anterior sobre la rodilla derecha de 4 cm aproximadamente de longitud. Se realizó disección por planos hasta la cápsula articular, incidida en forma medial 2cm proximales a la inserción del tendón del cuádriceps en la rótula, siendo prolongada hasta la zona de inserción del tendón rotuliano en la tuberosidad anterior de la tibia. Se realizó sinovectomía parcial abierta y se resecó en forma parcial la grasa de Hoffa. Por consiguiente, se realizó una luxación lateral de la rótula para permitir una mayor visibilidad de la escotadura intercondílea. Una vez identificado el ligamento cruzado anterior, tomando como referencia su inserción en la cara medial del cóndilo lateral del fémur en su porción proximal y su inserción en la espina tibial anterior en el centro del platillo tibial, se resecó en su totalidad. En forma transquirúrgica, se comprobó la inestabilidad anterior de la rodilla, realizando transoperatoriamente la prueba de Lachman. Se realizó un lavado articular, y se continuó con el cierre primario de la herida quirúrgica suturando la cápsula articular con material

absorbible, así como el tejido celular subcutáneo y la piel para dar por terminado el procedimiento.

A los conejos pertenecientes a los grupos de reemplazo Kevlar® (RK) y reemplazo Kevlar®/fibroblastos (RK/F), se realizó la misma técnica. Sin embargo, ésta se continuó una vez comprobada la inestabilidad de la rodilla, debido a que se realizaron túneles óseos para la colocación del ligamento protésico. Manteniendo la rodilla en flexión de 100°, se identificó la zona de inserción del ligamento cruzado anterior en la cara medial del cóndilo lateral de la rodilla y a través de la escotadura intercondílea se practicó un túnel femoral con una broca de 2mm de diámetro con dirección de medial a lateral y de distal a lateral, hasta perforar la cortical lateral del fémur. Posteriormente se procedió a realizar el túnel tibial, tomando como referencia la espina tibial anterior, desde donde se practicó un túnel tibial con broca de 2mm, con dirección de centro a cortical medial y de proximal a distal, hasta perforar la cortical medial de la tibia. Una vez realizados los túneles óseos, se pasó a través de ellos la prótesis del ligamento cruzado anterior a base de Kevlar®, iniciando por el túnel tibial, para salir hacia la escotadura intercondílea. Se continuó por el túnel femoral hacia la cortical lateral del fémur. Se procedió a fijar la prótesis con tornillos de cortical de 3.5mm en forma unicortical a manera de tornillo interferenciales. Se comprobó en el transoperatorio la estabilidad de la rodilla brindada por el ligamento protésico y se procedió a realizar el cierre primario de la herida quirúrgica, descrita con anterioridad. Los modelos experimentales fueron manejados con antibiótico y analgésico durante un periodo de 3 días. Se utilizó tetraciclina 50 mg/kg IM cada 12 horas y tramadol 5-10 mg/kg cada 12 horas. Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados por el mismo cirujano en el quirófano de cirugía

experimental en el Bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UANL.

6.10. Anestesia

Se utilizó pentobarbital sódico al 6.3 % en solución acuosa, a una dosis de 28 mg/kg, al momento de la inducción y posteriormente se administró a dosis respuesta para evitar salir de plano quirúrgico.

6.11. Cuidado post-quirúrgico inmediato

Los animales se mantuvieron con doble esquema de analgesia, usando tramadol y meloxicam, para la antibioticoterapia se administró cefalexina a una dosis de 250mg cada 12 horas durante 10 días, por vía oral. Se realizó limpieza y curación diaria de la herida, con solución antiséptica de Microdacyn®60 hasta su cicatrización.

6.12. Cuidado post-quirúrgico tardío

No se restringió el apoyo de la extremidad intervenida y los animales contaron con comida y agua *ad libitum*, desde el primer día posterior a la intervención.

6.13. Funcionalidad

La evaluación clínica consistió en tres pruebas: movilidad, estabilidad y características de la marcha. Se determinaron los grados de movilidad de las rodillas de los conejos midiendo la amplitud de movimientos pasivos y activos con un goniómetro. Las pruebas de estabilidad de las rodillas se estudiaron a través de la prueba de Lachman. Esta

prueba consiste en desplazar la tibia hacia anterior con respecto de los cóndilos femorales al mismo tiempo en que se fija el fémur. Se consideró una prueba positiva cuando hay desplazamiento de la tibia hacia anterior respecto al fémur y negativa cuando el desplazamiento es igual a cero. Las características de la marcha se determinaron como marcha normal o marcha anormal observando la marcha de los animales de experimentación. Las evaluaciones se realizaron a las 6 y 12 semanas.

6.14. Eutanasia

Se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. En sus puntos 9.4.2.1.1. La administración intravenosa de fármacos que causan la muerte es el método más rápido y confiable de llevar a cabo la eutanasia. El personal debe poseer la habilidad para realizarlo y el animal debe estar inmobilizado. En el punto 9.4.2.1.2. Es el método más recomendable siempre y cuando no cause miedo o estrés al animal. Los animales asustados, deben sedarse antes de administrar el agente eutanásico. Siguiendo esta Norma, se utilizó pentobarbital sódico a dosis de 120 mg/Kg vía intravenosa y xilacina a dosis de 2 mg/kg.

6.15. Tinciones histológicas

En las técnicas para histoquímicas se utilizaron los siguientes colorantes y ácidos: ácido pícrico (J.T. Baker), formaldehído (J.T. Baker), sulfato ferroso (CTR Scientific), rojo escarlata (Analytika), fuscina ácida (Analytika), ácido fosfomolibdico (CTR Scientific), ácido fosfotúngstico (CTR Scientific), azul de anilina (J.T. Baker), ácido acético (Jalmek),

azul de toluidina (SIGMA), xilol (CTR Scientific), alcohol absoluto (CTR Scientific), alcohol de 96° (CTR Scientific). Para el procesamiento de muestras los tejidos se dejaron en fijador por 4 días y posteriormente se colocaron por 5 días en EDTA al 15%, 10 volúmenes más que el tamaño del tejido para iniciar el proceso de descalcificación del hueso. Posteriormente se colocaron en ácido fórmico al 10% por 5 días y finalmente en ácido clorhídrico al 2.5% por 2 días más. Durante este proceso se monitoreó la dureza al tacto del tejido. Pasado este proceso, el tejido fue deshidratado con acetonas graduales y xilol y embebido en parafina para hacer cortes con microtomo. A cada una de las muestras se le realizaron cortes para observar los cambios morfológicos. Se realizaron las técnicas de Tricrómico de Masson para observar morfología celular, matriz amorfa, colágenas.

6.16. Análisis molecular

Una vez obtenidas las biopsias, se tomarán muestras de la zona a evaluar (Kevlar®/Fibroblastos), con el objetivo de realizar un análisis de la expresión de los fibroblastos. Para aislar el RNA se utilizará TRIzol® Reagent (Invitrogen), citrato de sodio (sigma), cloruro de sodio (sigma), isopropanol, etanol al 100 y 70%, cloroformo, agua tratada con DEPC (invitrogen). Para sintetizar del cDNA se utilizará el kit SuperScript® III First-Strand (Invitrogen), tubos para PCR de 0.2 mL. Para el ensayo de expresión génica se utilizará el reactivo LightCycler® 480 SYBR Green I Master (ROCHE). Se utilizarán los marcadores para detección de colágeno tipo 1A2 (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias de los primers usados para la amplificación molecular de colágeno I

Gen	Secuencia	Producto (pb)	Referencia (75)
COL1A2	5' -CCTGGCACCCCAGGTCCTCA-3' 5' -TCGCTCCCAGGGTTGCCATC-3'	227	Cooper <i>et al</i> (2008)

6.17. Análisis histológico

La evaluación histopatológica se llevó a cabo por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la UANL. El estudio consistió en realizar cortes a las 9 rodillas de los conejos a las 12 semanas para describir la interacción entre los fibroblastos y el Kevlar. Estas pruebas se llevaron a cabo haciendo cortes sagitales, coronales y axiales en ambas rodillas de los conejos a nivel de los túneles óseos. Los especímenes se enviaron en fresco al Servicio de Anatomía Patológica en donde se prepararán de tal forma que se retiraron los tejidos blandos alrededor de la rodilla dejando intacta la cápsula de la articulación, el fémur y la tibia. Las rodillas se fijaron en formaldehído al 10% durante 24 horas. Posteriormente se descalcificaron en solución de ácido tricloroacético al 20% durante 72 horas. Las laminillas fueron montadas y teñidas con técnica de hematoxilina y eosina, así como en tricrómico de Masson. Así mismo se realizó una evaluación macroscópica de los especímenes enviados, evaluando las características físicas de los tejidos involucrados, el estado de los sitios de inserción del ligamento, el grado de invasión de tejido autólogo a la prótesis, el estado de la prótesis en cuanto a sus características morfológicas originales.

6.18. Estadística

Se realizó un análisis descriptivo de variables numéricas continuas mediante la prueba T y un análisis de frecuencia de variables categóricas mediante la prueba Chi².

Pruebas clínicas:

La estabilidad de la rodilla se analizará mediante la prueba Chi².

Las características de la marcha se analizarán mediante la prueba de Chi².

La amplitud de la movilidad se analizará mediante la prueba de T.

El análisis de las pruebas biomecánicas se llevará a cabo mediante la prueba de T.

El análisis de los estudios histopatológicos se realizará mediante la prueba de Chi².

El análisis estadístico se realizó con IBM SPSS versión 20 (SPSS, Inc, Armon, NY).

CAPÍTULO VII

RESULTADOS

7.1. Ensayo de viabilidad

Como primer paso, se tomaron biopsias de piel y se procedió a la extracción de los fibroblastos mediante una incubación con tripsina/EDTA por 30 minutos (Figura 4). El objetivo de usar la tripsina es debido a que esta enzima tiene la capacidad de degradar o romper los enlaces de tejido conectivo que rodean a los fibroblastos, mientras que el EDTA secuestra magnesio y calcio los cuales favorece la adhesión celular.



Figura 4. Toma de biopsia, extracción, cultivo de los fibroblastos.

Posteriormente se cultivaron los fibroblastos por dos semanas hasta que se obtuvieron 1×10^6 células que se incluyeron en un adhesivo comercial de fibrina (TISEEL, Baxter Inc. Austria) para aplicarlas directamente sobre el Kevlar (Figura 5). El Tisseel, simula la cascada de coagulación, ya que se mezclan fibrinógeno y trombina entre otros factores para formar un coagulo estable de fibrina. El adhesivo con las células en su interior, se colocó en toda la extensión del Kevlar y se dejó fraguar por 3 minutos aproximadamente. Finalmente, se adicionó medio de cultivo (HAM/F12 + Suero + antibiótico) y se incubaron a 37°C y $5\%\text{CO}_2$ para realizar el ensayo de viabilidad celular.

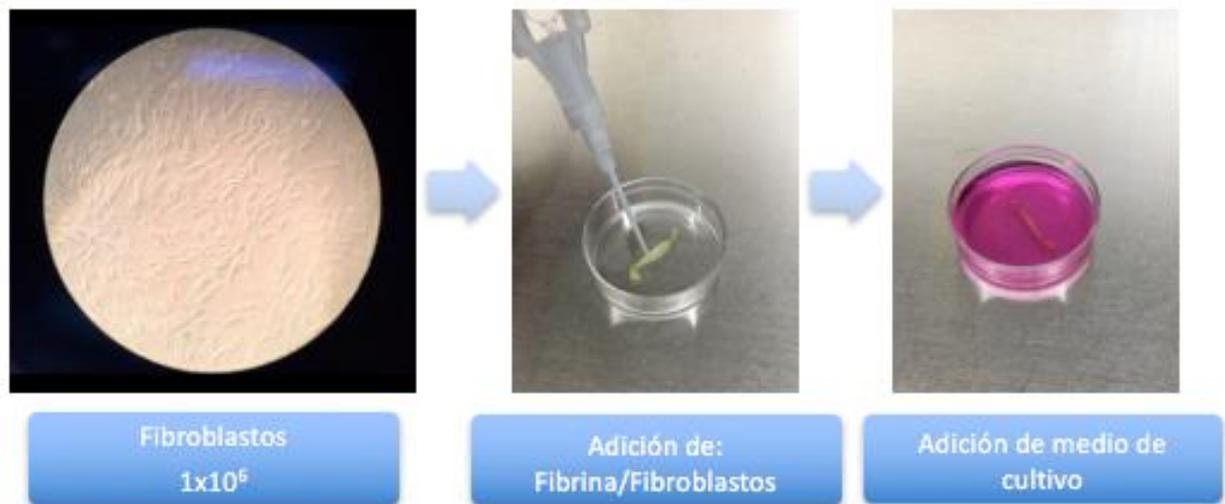


Figura 5. Inclusión de los fibroblastos en fibrina y cultivo en el Kevlar®.

Durante el período de cultivo In vitro de la construcción fibroblastos/Kevlar®, se observó en un invertoscopio la distribución de las células y pudieron identificarse en todos los niveles del bioimplante (Figura 6). Para el ensayo de viabilidad celular, se tomaron muestras por triplicado y se contaron las células a las 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs.

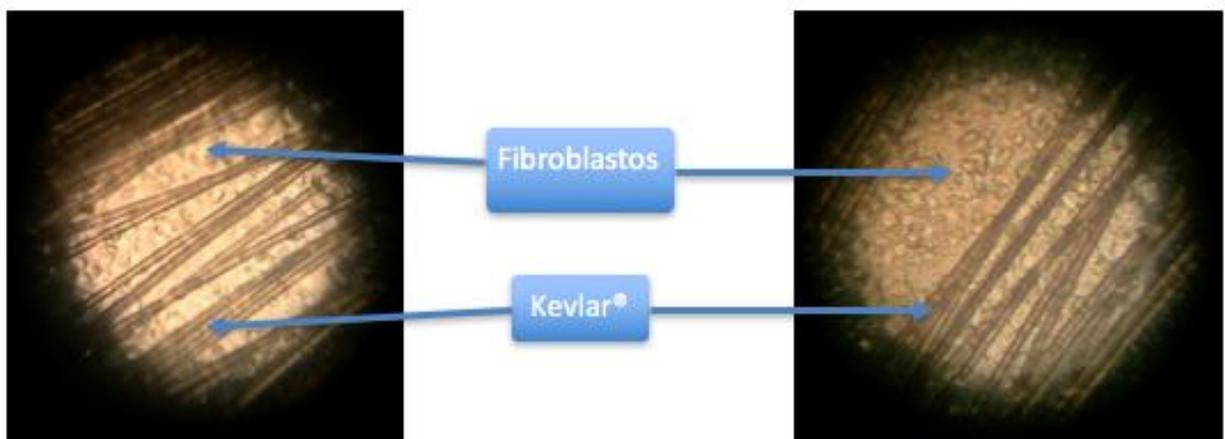


Figura 6. Fibroblastos incluidos en fibrina. Se observó la proliferación de las células entre las fibras del Kevlar®

Para medir la viabilidad de las células en el implante se utilizó Azul Alamar (abD Serotec®) y se les añadió el medio correspondiente, preparado con 10% de azul alamar, se dejó incubando por 3 h a 37°C y 5% de CO₂, pasado el tiempo se colocó el medio en placas de 96 pozos para su lectura (Figura 7). Se utilizó un espectrofluorómetro Biorad (Biorad Inc. USA) utilizando un filtro verde de 525 nm a las 24, 48 y 72 Hrs. Los datos se normalizaron con la lectura del medio correspondiente (sin células) que contenía 10% de azul alamar por el mismo periodo de tiempo.

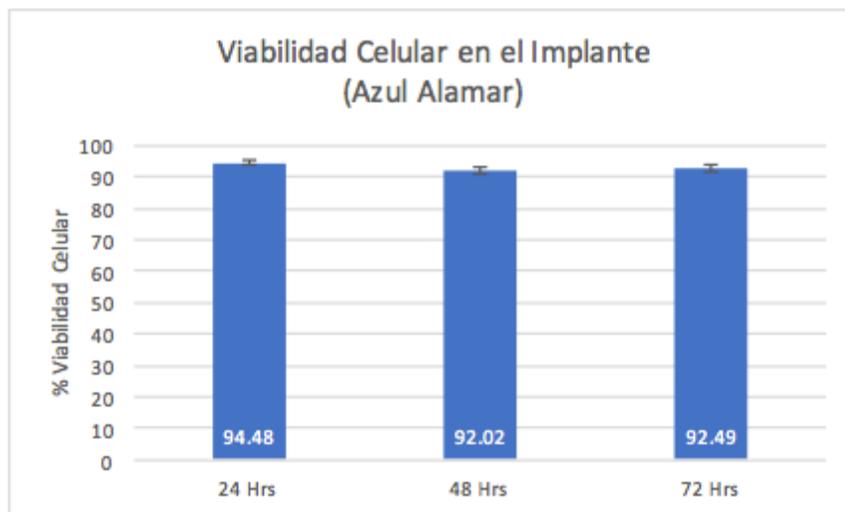


Figura 7. Viabilidad de los fibroblastos incluidos en la fibrina y en contacto en el Kevlar®.

Se pudo observar que la viabilidad de los fibroblastos se mantuvo estable durante el cultivo *In vitro* y que el Kevlar® no afectó su sobrevivencia, mientras que la fibrina permitió la difusión de los nutrientes aportados por el medio de cultivo además de proporcionarles un soporte que mantuvo su fenotipo.

7.2. Funcionalidad

Para llevar a cabo las pruebas de funcionalidad, primero se realizaron las cirugías para

generar la lesión mediante la escisión del ligamento cruzado anterior de las rodillas izquierdas (Figura 8), así como para la colocación del Kevlar® con y sin fibroblastos.

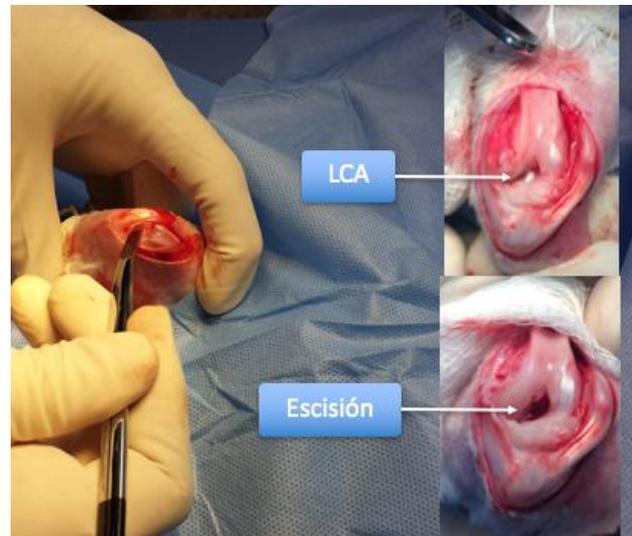


Figura 8. Localización y escisión del ligamento cruzado anterior.

Para este último grupo, se localizaron los puntos isométricos y se procedió a realizar la tunelización que permitió posicionar al Kevlar® en sustitución del ligamento cruzado anterior (Figura 9). Para el grupo con fibroblastos, se realizó el mismo procedimiento, pero con la diferencia que una vez que se colocó Kevlar®, se procedió a verter sobre este material protésico la fibrina que contenía 1×10^6 células (Figura 10). Se dejó fraguar durante 3 minutos y se recolocó la patela, realizando la maniobra de Lachman para determinar si había inestabilidad o no en la rodilla. Finalmente, la cápsula articular y la fascia articular superficial fueron suturadas en un solo plano con material de sutura no absorbible, así como la fascia lata y el tejido subcutáneo, utilizando por último material de sutura no absorbible para la piel.

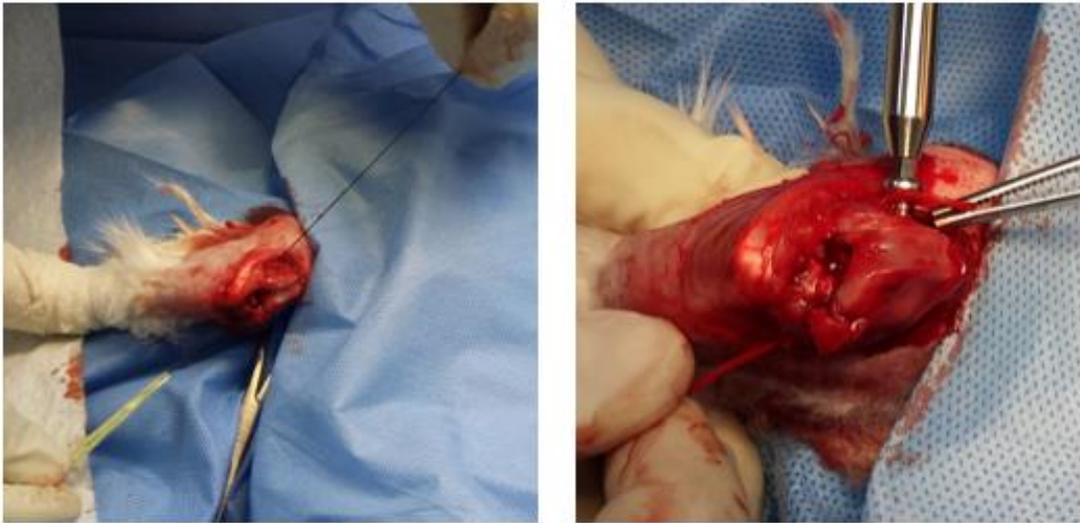


Figura 9. Paso del Kevlar® a través de los túneles ubicados en los puntos isométricos.

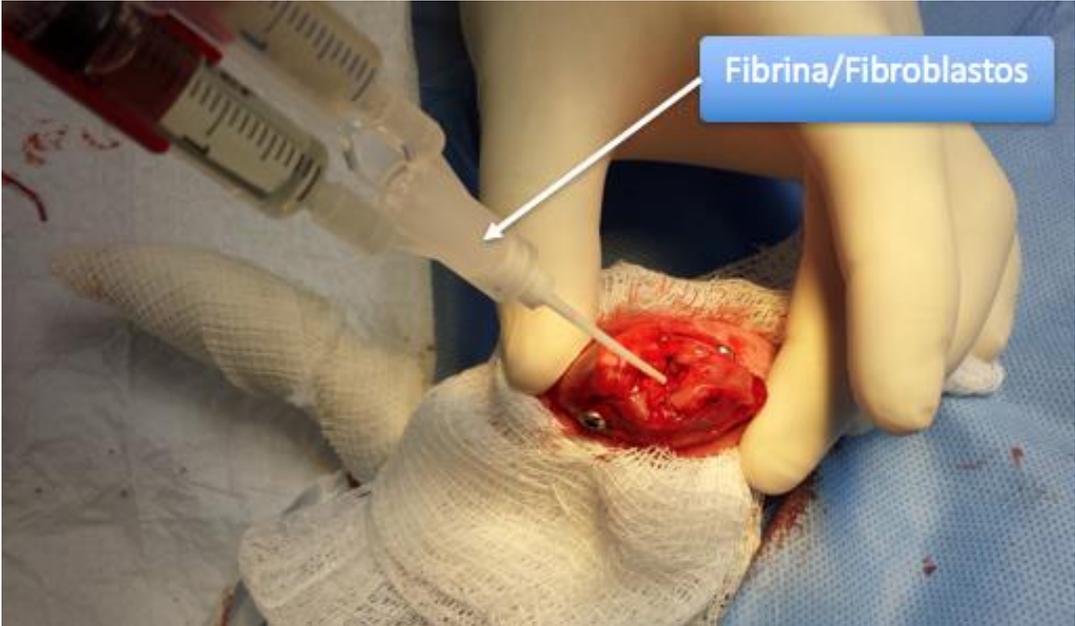


Figura 10. Adición de la fibrina con 1×10^6 fibroblastos sobre el Kevlar®.

Funcionalidad de la rodilla	
• 1. Rango de movilidad (En grados)	
• Normal: Flexión 150°, Extensión -30°	
• Anormal: Flexión <140°, Extensión >-30°	
• 2. Estabilidad (Prueba de Lachman)	
• Negativas: 10 puntos (Estables)	
• Positivas: 5 puntos (Inestables)	
• 3. Marcha	
• Normal: 10 puntos	
• Anormal: 5 puntos	

Figura 11. Parámetros normales y anormales para evaluar la funcionalidad de la rodilla de los conejos.

Para estimar la funcionalidad de las rodillas sujetas de estudio, se consideró el rango de movilidad, la estabilidad y la marcha de los conejos (Figura 11). La movilidad de la articulación se determinó en grados de flexión y extensión, considerando como normal una flexión de 150° y una extensión de -30°. La prueba de Lachman negativa recibió una puntuación de 10 y se consideró como articulaciones estables debido a que no hay desplazamiento anterior con respecto al fémur durante la maniobra, por el contrario, se le asignó un valor de 5 puntos a las rodillas inestables, es decir, con la prueba de Lachman positiva cuando hay desplazamiento anterior con respecto al fémur durante la maniobra. La marcha se valoró con 5 puntos si era anormal, es decir, cuando los conejos presentaban dificultad para desplazarse y un valor de 10 puntos cuando los conejos eran capaces de desplazarse sin complicaciones, lo que se consideró como normal.

La evaluación clínica para el rango de movilidad a las 6 semanas (Figura 12),

demonstraron que, la flexión en las rodillas de reemplazo, es decir, aquellas rodillas en donde se sustituyó el ligamento cruzado anterior por la prótesis de Kevlar®, fueron de 90° en promedio, esto es menor que en el grupo escisión del LCA, esto probablemente pudo deberse a que se realizaron túneles en los puntos isométricos para pasar la prótesis del material sujeto de estudio. En las rodillas izquierdas en donde se conservó el LCA, el rango de movilidad fue de menor a 150° en promedio a las 6 semanas postquirúrgicas.

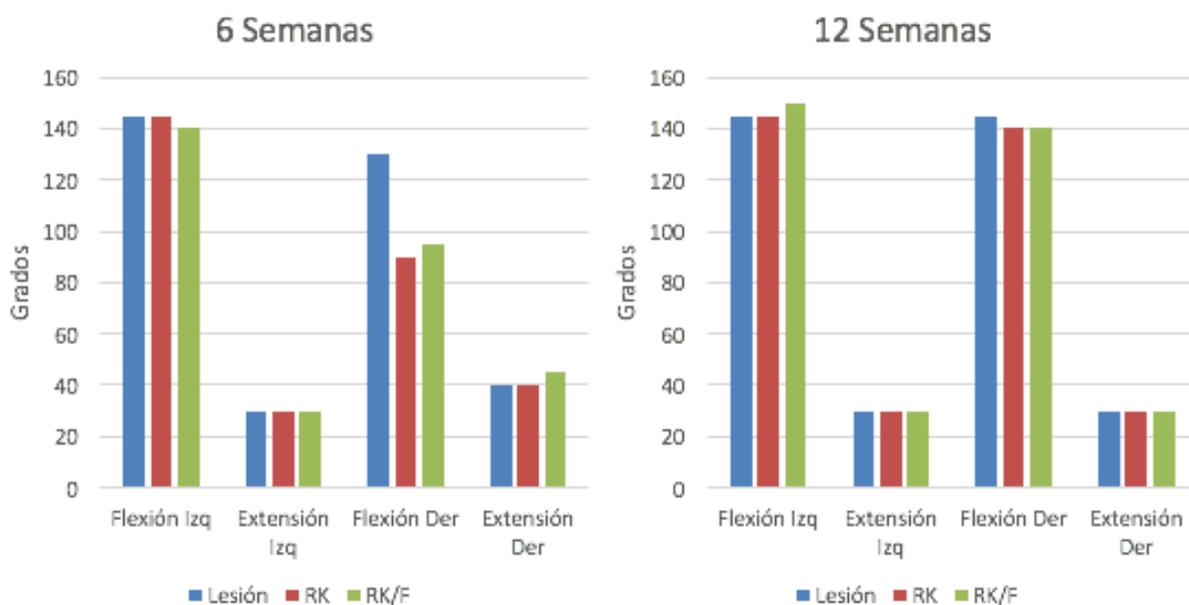


Figura 12. Rangos de movilidad en grados a las 6 y 12 semanas postquirúrgicas en las rodillas derechas e izquierdas de los conejos sujetos de estudio.

A las 12 semanas postquirúrgicas, la flexión para los grupos de reemplazo mejoró considerablemente (140°) en comparación con la evaluación hecha a las 6 semanas (90°). En cuanto a la extensión, los grupos de reemplazo de la rodilla derecha, se normalizaron a las 12 semanas (30°) en comparación a los 40° y 45° que demostraron a las 6 semanas postquirúrgicas (Figura 12).

A las 6 semanas, la prueba de Lachman fue negativa entre todas las rodillas sujetas de estudio, salvo en el grupo de escisión en donde el desplazamiento anterior con respecto al fémur durante la maniobra fue positivo (Figura 13).

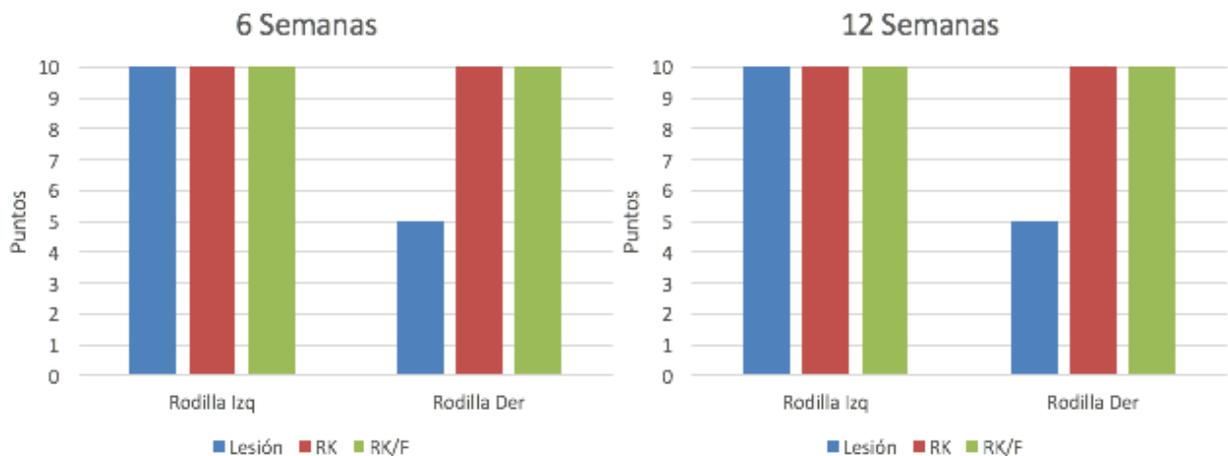


Figura 13. Prueba de Lachman realizada a los conejos sujetos de estudio.

La marcha fue anormal para los tres grupos a las 6 semanas postquirúrgicas y las rodillas derechas representaron una limitante en el desplazamiento de los conejos (Figura14).

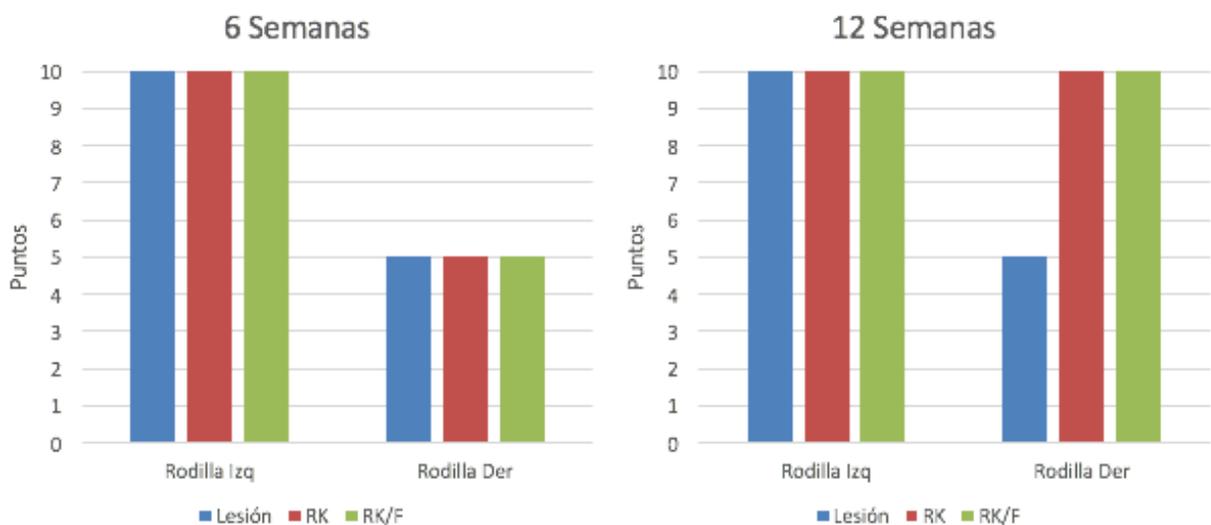


Figura 14. Análisis de la marcha en los conejos sujetos de estudio.

Sin embargo, a las 12 semanas postquirúrgicas, la marcha para las rodillas derechas de los grupos de reemplazo se consideró como normal, caso contrario al grupo de escisión del LCA, en donde no se observó mejoría en la marcha a las 12 semanas.

7.3. Análisis histológico

En todos los conejos a los cuales se les realizó una cirugía de reconstrucción del LCA con Kevlar®, se pudo observar el mismo patrón histológico (Figura 15), en general se evidenció un proceso inflamatorio alrededor del material sintético a las 12 semanas postquirúrgicas. Sin embargo, también se observó un proceso de integración mediante la invasión de tejido óseo compacto alrededor de las fibras del Kevlar®.

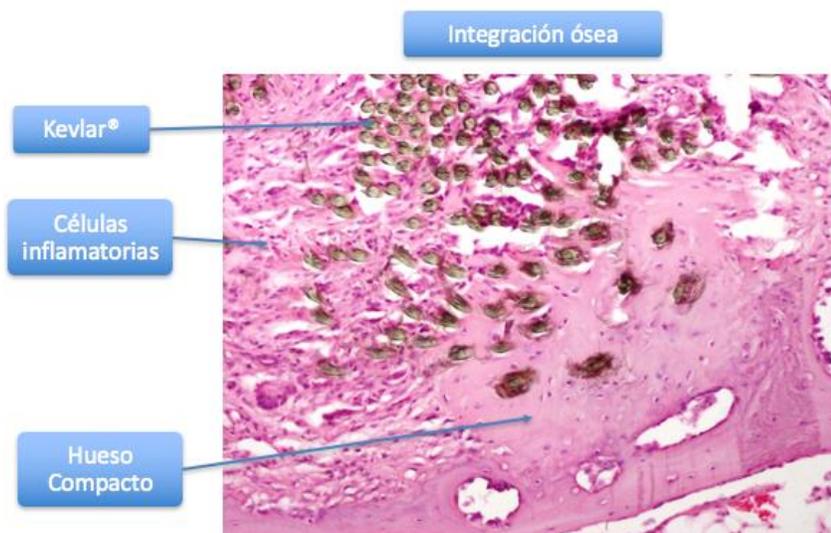


Figura 15. Corte histológico con H&E. Se observa un proceso inflamatorio, así como una osificación circundante al Kevlar®. 10X.

En cuanto al material sintético utilizado como reemplazo del LCA (Kevlar®), se pudo observar un tejido conectivo celular dispuesto paralelamente entre las fibras del Kevlar®, las cuales actúan como guía o soporte del tejido neoformado (Figura 16), es importante señalar que no se identificaron datos de células inflamatorias, lo que nos hace suponer que el Kevlar® no tuvo una reacción adversa *In vivo*.

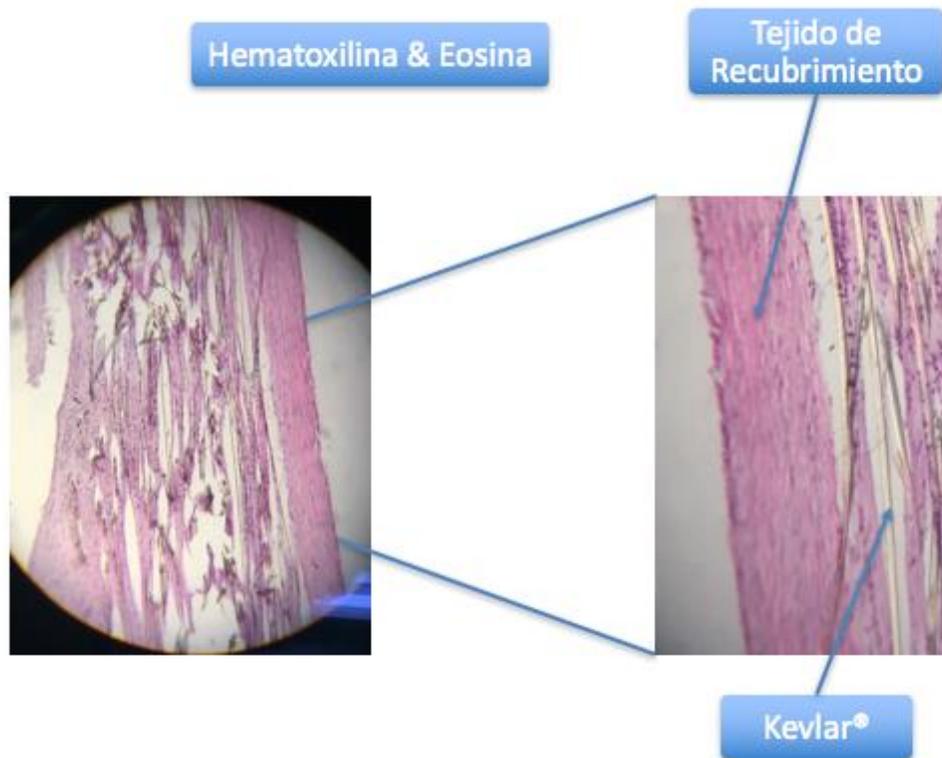


Figura 16. Tinción con H&E que demuestra el material de tejido conectivo celular que cubrió al Kevlar® sin datos aparentes de inflamación. 10X y 40X.

Para poder determinar si el material circundante al Kevlar® fueron fibras de colágeno, se realizaron tinciones mediante la técnica del Tricrómico de Masson (Figura 17).

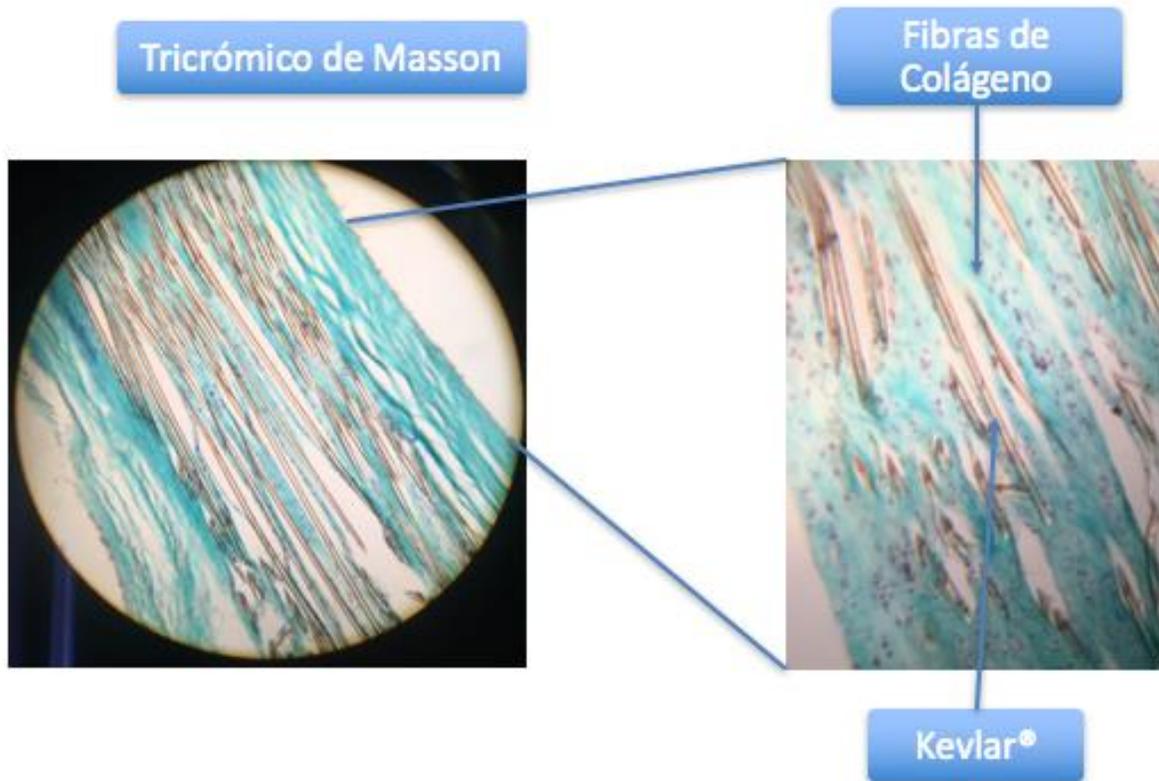


Figura 17. Tinción con Tricrómico de Masson. Se determinó que el material circundante al Kevlar® fueron fibras de colágeno. 20X y 40X.

Al analizar los implantes protésicos al microscopio, se encontró que la matriz que rodea al material sintético, está compuesta por fibras de colágeno, la cual se integra al Kevlar® y se dispone de manera paralela a este material. De la misma manera, no se pudo distinguir algún proceso inflamatorio.

7.4. Análisis molecular

Una vez que se determinó mediante Tricrómico de Masson que el tejido conectivo que cubría al Kevlar® fueron fibras de colágeno, se procedió a identificar si las fibras correspondían al colágeno tipo I, debido a que normalmente los fibroblastos sintetizan a esta proteína. Por este motivo, se realizó la extracción del RNA a partir de 3 muestras

del grupo reemplazo/Kevlar®, y posteriormente se hizo una retro-transcripción para obtener una cadena de DNA complementario. Finalmente, se llevó a cabo una PCR para la amplificación del colágeno tipo I (COL1A2) y se obtuvo un producto amplificado de 227 pares de bases (Figura 18).

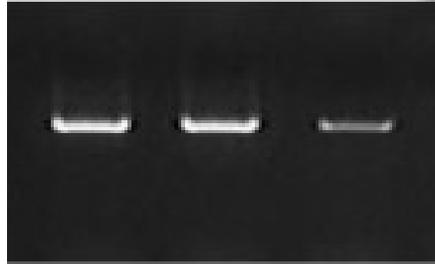


Figura 18. Productos amplificados que corresponden a un amplicón para COL1A2 de 227 pares de bases.

Este procedimiento, nos confirmó que las fibras de colágeno de tipo I, pueden integrarse y cubrir en su totalidad a las fibras de Kevlar®. En datos no mostrados, se pudo observar de manera macroscópica que las articulaciones no presentaban signos de algún proceso inflamatorio, lo que nos hace suponer que la fibrina con fibroblastos, fue capaz de mantener la sobrevivencia de estas células, pero, sobre todo, permitió que sintetizaran matriz extracelular y que probablemente, esto favoreciera a un ambiente articular libre de algún proceso inflamatorio.

CAPÍTULO VIII

DISCUSIÓN

Las lesiones del ligamento cruzado anterior (LCA) constituyen una causa frecuente de lesiones en población activa. Al tratarse de una estructura intraarticular, el ligamento cruzado lesionado no cicatriza de forma similar al de otros ligamentos extraarticulares, de forma que entre los cabos de ruptura no se interpone el coágulo de fibrina que aparece en las fases iniciales de la cicatrización. La ruptura del LCA conlleva la aparición de inestabilidad de rodilla, daño meniscal y aparición de artrosis precoz. El tratamiento quirúrgico mediante reconstrucción anatómica con injertos es una técnica eficaz, aunque no ha demostrado que prevenga la aparición de artrosis precoz. Los enfoques de la ingeniería tisular, incluyen el cultivo *In vitro* de neoligamentos usando andamios biodegradables enriquecidos con células y factores de crecimiento. Los neoligamentos son utilizados como material de injerto para LCA. Los materiales más comúnmente usados de andamios, son colágeno (76), seda (77), ácido hialurónico (78), quitosano (79) y alginato (80). Chung *et al* (2017), desarrollaron un andamio con estructura jerárquica, utilizando trenzado y torsión de fibras (81). Los filamentos poliméricos se trenzaron para producir fibras, que se entrelazaron más para formar injertos, mediante la aplicación de diferentes técnicas de tejido de fibras a diferentes niveles de aumento, la jerarquía se logró de manera similar al LCA nativo. Las combinaciones de ángulo de torsión, ángulo de trenzado y diámetro de filamento, regulan la porosidad de estos injertos. Otra variante de diseño incluye la fijación ósea a los extremos del andamio para la integración de hueso a LCA. Laurencin *et al* (2005) y Chung *et al* (2017), reportaron andamios con tres zonas:

dos extremos óseos y una región intraarticular con diferente porosidad (81, 82). Chen *et al* (2018), inyectaron un adhesivo de fibrina/hrBMP2/CMDTA en túneles óseos de reconstrucciones de LCA en conejos con el objetivo de mejorar la osteointegración del tejido tendinoso (83). Encontraron hueso de nueva formación entre el hueso del huésped y el injerto a las 8 semanas después de la cirugía. En nuestro estudio, no se aplicaron células madre, ni proteínas osteoinductoras para encontrar una osteointegración del ligamento protésico a base de Kevlar®/Fibroblastos desde los 3 meses post-quirúrgicos. En los últimos tiempos, la reparación de LCA por puente concebida y desarrollada por Murray y su equipo está ganando popularidad (84-86). El equipo utiliza una sutura de polipropileno como guía y un hidrogel de plasma rico en plaquetas y colágeno (PRP) hidrogel como puente. Las plaquetas en el plasma se identificaron como una fuente para ser un andamio provisional e iniciar la producción de proteína ECM por los fibroblastos. Ellos concluyeron que la falta de andamiaje provisional en las lesiones del LCA es la razón principal de la ausencia de autocuración (84). En nuestro estudio, pudimos demostrar que el andamiaje proporcionado por la fibrina comercial, permitió que los fibroblastos sintetizaran una matriz extracelular compuesta por fibras de colágeno de tipo I, esto es importante debido a que, de manera adicional, no se encontraron datos de inflamación, lo que nos hace suponer que la matriz de nueva formación, actúa como un protector del material sintético. En los estudios de Murray *et al* (2017), se comparó la reconstrucción de LCA mejorada con las cirugías de reemplazo de LCA en porcino. Los animales operados con reparación de LCA con puentes mejorados no presentaron osteoartritis en el seguimiento de un año en comparación con los aloinjertos de PT congelados frescos (85). Se encontró que las propiedades biomecánicas, la carga de

rendimiento y la rigidez del LCA reparado por el hidrogel de colágeno-PRP son similares a los de la LCA humana (86). En el presente estudio, tampoco se encontraron datos de artrosis o de sinovitis en un período de 12 semanas posteriores a la reconstrucción del LCA, además que los parámetros de funcionalidad clínica, demostraron que la marcha fue recuperada en los grupos de reemplazo del LCA. Sin embargo, consideramos que se requiere un mayor tiempo de seguimiento para poder establecer criterios de funcionalidad y de lesión en el cartílago articular o rechazo del implante. Nuestros resultados, indican que es posible mantener un tejido vivo rodeando a un material sintético en la reparación del LCA.

CAPÍTULO IX

CONCLUSIONES

Los fibroblastos incluidos en el adhesivo de fibrina, son capaces de sustituir la matriz de fibrina por colágena de tipo I para recubrir las fibras del Kevlar®. Esto probablemente haya sido la causa de la ausencia de un proceso inflamatorio articular debido a la presencia de un cuerpo extraño, lo que nos hace suponer que el material de tejido conectivo celular presente, pudiera aislar al material sintético al interior de la articulación. Estos resultados sugieren que el Kevlar® es biocompatible con los fibroblastos, así como con el tejido óseo. Es importante señalar que el ligamento protésico a base de Kevlar®/Fibroblastos, fue capaz de estabilizar la rodilla en los conejos sujetos de estudio. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que utiliza Kevlar® recubierto de un material biológico como Fibrina/Fibroblastos a manera de injerto para la reconstrucción de LCA en un modelo animal.

Se requiere mayor tiempo de seguimiento a las rodillas tratadas con el reemplazo de Kevlar®/Fibroblastos para poder determinar la completa integración ósea del material sintético, así como el comportamiento del tejido conectivo circundante al Kevlar®.

CAPÍTULO X

BIBLIOGRAFÍA

1. Moore KL, Dalley AF. Anatomía con orientación clínica: Ed. Médica Panamericana; 2009.
2. Bouchet A, Cuilleret J. Anatomía descriptiva, topográfica y funcional. 1979.
3. García LHG, García CMR, Fuentes IG, Victoria NP. Articulación de la rodilla y su mecánica articular. Medisan. 2003;7(2):100-9.
4. Shunke M. Prometheus. Texto y atlas de anatomía 2da edición. Madrid: Panamericana; 2010.
5. Gray J. Anatomía de Gray: textos esenciales: Grupo Planeta (GBS); 2011.
6. Flandry F, Hommel G. Normal anatomy and biomechanics of the knee. Sports medicine and arthroscopy review. 2011;19(2):82-92.
7. Hunter SC, Marascalco R, Hughston JC. Disruption of the vastus medialis obliquus with medial knee ligament injuries. The American journal of sports medicine. 1983;11(6):427-31.
8. Vergara Amador E, Román Chalarca MA. Anatomical description of the vastus medialis: Is there really the vastus medialis oblique? Revista Salud Uninorte. 2011;27(1):73-84.
9. Insall J, Salvati E. Patella position in the normal knee joint. Radiology. 1971;101(1):101-4.
10. Hardaker W, Whipple TL, Bassett 3rd F. Diagnosis and treatment of the plica syndrome of the knee. JBJS. 1980;62(2):221-5.

11. Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *The American journal of sports medicine*. 1982;10(2):90-5.
12. Shoemaker S, Markolf K. The role of the meniscus in the anterior-posterior stability of the loaded anterior cruciate-deficient knee. Effects of partial versus total excision. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1986;68(1):71-9.
13. Petersen W, Zantop T. Anatomy of the anterior cruciate ligament with regard to its two bundles. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 2007;454:35-47.
14. Stocchi R, De Pasquale V, Gubellini P, Facchini A, Marcacci M, Buda R, et al. The human anterior cruciate ligament: histological and ultrastructural observations. *Journal of anatomy*. 1992;180(Pt 3):515.
15. Danylchuk KD, Finlay JB, Krcek J. Microstructural organization of human and bovine cruciate ligaments. *Clinical orthopaedics and related research*. 1978(131):294-8.
16. Dienst M, Burks RT, Greis PE. Anatomy and biomechanics of the anterior cruciate ligament. *The Orthopedic clinics of North America*. 2002;33(4):605-20.
17. Arnoczky SP. Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Clinical orthopaedics and related research*. 1983(172):19-25.
18. Petersen W, Tillmann B. Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anatomy and embryology*. 1999;200(3):325-34.
19. Brown Jr CH, Carson EW. Revision anterior cruciate ligament surgery. *Clinics in sports medicine*. 1999;18(1):109-71.

20. Morgan CD, Kalman VR, Grawl DM. Definitive landmarks for reproducible tibial tunnel placement in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*. 1995;11(3):275-88.
21. Norwood LA, Cross MJ. Anterior cruciate ligament: functional anatomy of its bundles in rotatory instabilities. *The American journal of sports medicine*. 1979;7(1):23-6.
22. Amis A, Dawkins G. Functional anatomy of the anterior cruciate ligament. Fibre bundle actions related to ligament replacements and injuries. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1991;73(2):260-7.
23. Sapega AA, Moyer R, Schneck C, Komalahiranya N. Testing for isometry during reconstruction of the anterior cruciate ligament. Anatomical and biomechanical considerations. *JBJS*. 1990;72(2):259-67.
24. Weber W, Weber E. *Mechanik der menschlichen Gehwerkzeuge*. in der Dietrichschen Buchhandlung. Gottingen; 1836.
25. Lembo R, Girgis F, Marshall J, Bartel D, editors. *Anteromedial Band (Amb) of Anterior Cruciate Ligament (Acl)-Linear and Mathematical-Analysis*. ANATOMICAL RECORD; 1975: WILEY-LISS DIV JOHN WILEY & SONS INC, 605 THIRD AVE, NEW YORK, NY 10158-0012.
26. Arnoczky S. *Anatomy of the cruciate ligaments*. The cruciate ligaments. 1988.
27. Lam S. Reconstruction of the anterior cruciate ligament using the Jones procedure and its Guy's Hospital modification. *JBJS*. 1968;50(6):1213-24.

28. Kennedy JC, Weinberg HW, Wilson AS. The anatomy and function of the anterior cruciate ligament: as determined by clinical and morphological studies. *JBJS*. 1974;56(2):223-35.
29. Trent PS, Walker PS, Wolf B. Ligament length patterns, strength, and rotational axes of the knee joint. *Clinical orthopaedics and related research*. 1976(117):263-70.
30. Friederich N, O'Brien W. Zur funktionellen anatomie der Kreuzbänder. *Kniegelenk und Kreuzbänder*: Springer; 1990. p. 80-95.
31. Harner CD, Baek GH, Vogrin TM, Carlin GJ, Kashiwaguchi S, Woo SL. Quantitative analysis of human cruciate ligament insertions. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1999;15(7):741-9.
32. Forriol F, Maestro A, Vaquero J. El ligamento cruzado anterior: morfología y función. *Trauma Fund MAPFRE*. 2008;19(1):7-18.
33. Anderson AF, Dome DC, Gautam S, Awh MH, Rennirt GW. Correlation of anthropometric measurements, strength, anterior cruciate ligament size, and intercondylar notch characteristics to sex differences in anterior cruciate ligament tear rates. *The American journal of sports medicine*. 2001;29(1):58-66.
34. Hutchinson MR, Ash SA. Resident's ridge: assessing the cortical thickness of the lateral wall and roof of the intercondylar notch. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2003;19(9):931-5.

35. Girgis FG, Marshall JL, Monajem A. The cruciate ligaments of the knee joint. Anatomical, functional and experimental analysis. *Clinical orthopaedics and related research*. 1975(106):216-31.
36. . !!! INVALID CITATION !!! {}.
37. Heming JF, Rand J, Steiner ME. Anatomical limitations of transtibial drilling in anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*. 2007;35(10):1708-15.
38. Steckel H, Starman JS, Baums MH, Klinger HM, Schultz W, Fu FH. Anatomy of the anterior cruciate ligament double bundle structure: a macroscopic evaluation. *Scand J Med Sci Sports*. 2007;17(4):387-92.
39. Siebold R, Ellert T, Metz S, Metz J. Tibial insertions of the anteromedial and posterolateral bundles of the anterior cruciate ligament: morphometry, arthroscopic landmarks, and orientation model for bone tunnel placement. *Arthroscopy*. 2008;24(2):154-61.
40. Takahashi M, Matsubara T, Doi M, Suzuki D, Nagano A. Anatomical study of the femoral and tibial insertions of the anterolateral and posteromedial bundles of human posterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2006;14(11):1055-9.
41. Zantop T, Wellmann M, Fu FH, Petersen W. Tunnel positioning of anteromedial and posterolateral bundles in anatomic anterior cruciate ligament reconstruction: anatomic and radiographic findings. *Am J Sports Med*. 2008;36(1):65-72.

42. Luites JW, Wymenga AB, Blankevoort L, Kooloos JG. Description of the attachment geometry of the anteromedial and posterolateral bundles of the ACL from arthroscopic perspective for anatomical tunnel placement. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007;15(12):1422-31.
43. Doi M, Takahashi M, Abe M, Suzuki D, Nagano A. Lateral radiographic study of the tibial sagittal insertions of the anteromedial and posterolateral bundles of human anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009;17(4):347-51.
44. Ellison AE, Berg EE. Embryology, anatomy, and function of the anterior cruciate ligament. *Orthop Clin North Am.* 1985;16(1):3-14.
45. Scapinelli R. Studies on the vasculature of the human knee joint. *Acta Anat (Basel).* 1968;70(3):305-31.
46. Vladimirov B. Arterial sources of blood supply of the knee-joint in man. *Nauchni Tr Vissh Med Inst Sofiia.* 1968;47(4):1-10.
47. Hogervorst T, Brand RA. Mechanoreceptors in joint function. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80(9):1365-78.
48. Sakane M, Fox RJ, Woo SL, Livesay GA, Li G, Fu FH. In situ forces in the anterior cruciate ligament and its bundles in response to anterior tibial loads. *J Orthop Res.* 1997;15(2):285-93.
49. Fu FH, Bennett CH, Ma CB, Menetrey J, Lattermann C. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. Part II. Operative procedures and clinical correlations. *Am J Sports Med.* 2000;28(1):124-30.

50. Beauchamp P, Laurin CA, Bailon JP. [A study of the tensile strength of cruciate ligaments with regard to the possibilities of prosthetic replacement (author's transl)]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1979;65(4):197-207.
51. Bach JM, Hull ML. Strain inhomogeneity in the anterior cruciate ligament under application of external and muscular loads. *J Biomech Eng.* 1998;120(4):497-503.
52. van Eck CF, Kopf S, van Dijk CN, Fu FH, Tashman S. Comparison of 3-dimensional notch volume between subjects with and subjects without anterior cruciate ligament rupture. *Arthroscopy.* 2011;27(9):1235-41.
53. Furia JP, Lintner DM, Saiz P, Kohl HW, Noble P. Isometry measurements in the knee with the anterior cruciate ligament intact, sectioned, and reconstructed. *Am J Sports Med.* 1997;25(3):346-52.
54. Takai S, Woo SL, Livesay GA, Adams DJ, Fu FH. Determination of the in situ loads on the human anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* 1993;11(5):686-95.
55. Sapega AA, Moyer RA, Schneck C, Komalahiranya N. Testing for isometry during reconstruction of the anterior cruciate ligament. Anatomical and biomechanical considerations. *J Bone Joint Surg Am.* 1990;72(2):259-67.
56. Sidles JA, Larson RV, Garbini JL, Downey DJ, Matsen FA, 3rd. Ligament length relationships in the moving knee. *J Orthop Res.* 1988;6(4):593-610.
57. Cazenave A, Laboureau JP. [Reconstruction of the anterior cruciate ligament. Determination of the pre- and peroperative femoral isometric point]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1990;76(4):288-92.

58. Bylski-Austrow DI, Grood ES, Hefzy MS, Holden JP, Butler DL. Anterior cruciate ligament replacements: a mechanical study of femoral attachment location, flexion angle at tensioning, and initial tension. *J Orthop Res.* 1990;8(4):522-31.
59. Melhorn JM, Henning CE. The relationship of the femoral attachment site to the isometric tracking of the anterior cruciate ligament graft. *Am J Sports Med.* 1987;15(6):539-42.
60. von Porat A, Roos E, Roos H. High prevalence of osteoarthritis 14 years after an anterior cruciate ligament tear in male soccer players: a study of radiographic and patient relevant outcomes. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2004;63(3):269-73.
61. Siegel L, Vandenakker-Albanese C, Siegel D. Anterior cruciate ligament injuries: anatomy, physiology, biomechanics, and management. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine.* 2012;22(4):349-55.
62. Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, Roos H. High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis and rheumatism.* 2004;50(10):3145-52.
63. Ai C, Sheng D, Chen J, Cai J, Wang S, Jiang J, et al. Surface modification of vascular endothelial growth factor-loaded silk fibroin to improve biological performance of ultra-high-molecular-weight polyethylene via promoting angiogenesis. *International journal of nanomedicine.* 2017;12:7737-50.

64. Andriolo L, Di Matteo B, Kon E, Filardo G, Venieri G, Marcacci M. PRP Augmentation for ACL Reconstruction. *BioMed research international*. 2015;2015:371746.
65. Chen X, Jones IA, Park C, Vangsness CT, Jr. The Efficacy of Platelet-Rich Plasma on Tendon and Ligament Healing: A Systematic Review and Meta-analysis With Bias Assessment. *Am J Sports Med*. 2018;46(8):2020-32.
66. Lee KI, Lee JS, Kang KT, Shim YB, Kim YS, Jang JW, et al. In Vitro and In Vivo Performance of Tissue-Engineered Tendons for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Am J Sports Med*. 2018;46(7):1641-9.
67. Lee AJ, Chung WH, Kim DH, Lee KP, Chung DJ, Do SH, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model using canine small intestinal submucosa and autologous platelet-rich plasma. *The Journal of surgical research*. 2012;178(1):206-15.
68. Mutsuzaki H, Fujie H, Nakajima H, Fukagawa M, Nomura S, Sakane M. Comparison of postoperative biomechanical function between anatomic double-bundle and single-bundle ACL reconstructions using calcium phosphate-hybridized tendon grafts in goats. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*. 2017;103(2):239-43.
69. Yoshida R, Cheng M, Murray MM. Increasing platelet concentration in platelet-rich plasma inhibits anterior cruciate ligament cell function in three-dimensional culture. *J Orthop Res*. 2014;32(2):291-5.

70. Nguyen DT, Dellbrugge S, Tak PP, Woo SL, Blankevoort L, van Dijk NC. Histological characteristics of ligament healing after bio-enhanced repair of the transected goat ACL. *Journal of experimental orthopaedics*. 2015;2(1):4.
71. Fleming BC, Proffen BL, Vavken P, Shalvoy MR, Machan JT, Murray MM. Increased platelet concentration does not improve functional graft healing in bio-enhanced ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(4):1161-70.
72. García JM, García FC, Serna F, de la Peña JF. High-performance aromatic polyacrilamides. *Progress in Polymer Science* 2010 35 (5): pp. 623–686.
73. Bilisik K 2012 Three-dimensional braiding for composites: a reviewText. *Res. J.* 83 1414–36.
74. Nasiri F, Ajeli S, Semnani D, Jahanshahi M, Emadi R. Design, fabrication and structural optimization of tubular carbon/Kevlar®/PMMA/graphene nanoplate composite for bone fixation prosthesis. *Biomed Mater*. 2018 May 2;13(4):045010.
75. Liang R, Woo SLY, Nguyen TD, Cheng PL, Almarza A. Effects of a Bioscaffold on Collagen Fibrillogenesis in Healing Medial Collateral Ligament in Rabbits. *Effects of a Bioscaffold on Collagen Fibrillogenesis in Healing Medial Collateral Ligament in Rabbits*
76. Dunn MG, Liesch JB, Tiku ML, Zawadsky JP. Development of fibroblast-seeded ligament analogs for ACL reconstruction. *Journal of biomedical materials research*. 1995;29(11):1363-71.

77. Chen J, Altman GH, Karageorgiou V, Horan R, Collette A, Volloch V, et al. Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2003;67(2):559-70.
78. Cristino S, Grassi F, Toneguzzi S, Piacentini A, Grigolo B, Santi S, et al. Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11-based prototype ligament scaffold. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2005;73(3):275-83.
79. Majima T, Irie T, Sawaguchi N, Funakoshi T, Iwasaki N, Harada K, et al. Chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibre scaffold for ligament and tendon tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H, Journal of engineering in medicine*. 2007;221(5):537-46.
80. Majima T, Funakoshi T, Iwasaki N, Yamane ST, Harada K, Nonaka S, et al. Alginate and chitosan polyion complex hybrid fibers for scaffolds in ligament and tendon tissue engineering. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 2005;10(3):302-7.
81. Chung EJ, Sugimoto MJ, Koh JL, Ameer GA. A biodegradable tri-component graft for anterior cruciate ligament reconstruction. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2017;11(3):704-12.
82. Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials*. 2005;26(36):7530-6.
83. Chen P, Ouyang J, Xiao J, Han Z, Yu Q, Tian J, Zhang L. Co-injection of human adipose stromal cells and rhBMP-2/fibrin gel enhances tendon graft

- osteointegration in a rabbit anterior cruciate ligament-reconstruction model. *Am J Transl Res* 2018;10(2):535-544
84. Spindler KP, Murray MM, Devin C, Nanney LB, Davidson JM. The central ACL defect as a model for failure of intra-articular healing. *J Orthop Res.* 2006;24(3):401-6.
85. Murray MM, Fleming BC. Use of a bioactive scaffold to stimulate anterior cruciate ligament healing also minimizes posttraumatic osteoarthritis after surgery. *Am J Sports Med.* 2013;41(8):1762-70.
86. Murray MM, Spindler KP, Abreu E, Muller JA, Nedder A, Kelly M, et al. Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* 2007;25(1):81-91.

APÉNDICE A

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

A.1. Preparación de la Muestra.

- 1.- Obtener la muestra.
- 2.- Fijar con formalina al 10 % en PBS pH 7.2-7.4 por 24 hrs.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Deshidratar en alcoholes graduales del 60 al 100 %.
- 5.- Aclarar con xilol.
- 6.- Preincluir en parafina.
- 7.- Incluir en parafina.
- 8.- Obtener los cortes histológicos usando un microtomo.
- 9.- Adherir los cortes en el baño de flotación.
- 10.- Desparafinar e hidratar.
- 11.- Teñir.
- 12.- Deshidratar y aclarar.
- 13.- Montar el cubre objetos añadiendo resina sintética.

A.2 Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E).

- 1.- Desparafinar los cortes con xilol por 5 min.
- 2.- Hidratar con etanol-xilol por 5 min.
- 3.- Hidratar con etanol absoluto y alcohol etílico 96° por 2 min c/u.
- 4.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 5.- Sumergir los cortes en hematoxilina de Gill, 2 min.
- 6.- Enjuagar lentamente en agua de la llave (2 lavados).
- 7.- Sumergir rápidamente en alcohol ácido (1 inmersión).
- 8.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 9.- Sumergir rápidamente en agua amoniaca (2 inmersiones).
- 10.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 11.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 12.- Sumergir los cortes en eosina (6 inmersiones).
- 13.- Deshidratar con alcohol etílico 96° (2 cambios) 2 min c/u.
- 14.- Sumergir en etanol absoluto (2 cambios) 2 min c/u.
- 15.- Sumergir en etanol-xilol 3 min.
- 16.- Sumergir en xilol (2 cambios) 2 min c/u.
- 17.- Montar con resina sintética.

A.3 Técnica de tinción con el método Tricómico de Masson.

Fijar los tejidos con solución de formalina al 4 %
Incluir en parafina

Usar cortes histológicos de 5 μm .

- 1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol 100 % y agua destilada.
- 2.- Usar como "mordente" el fijador de Bouin por 30-60 min a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente.
- 3.- Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
- 4.- Enjuagar los cortes en agua destilada.
- 5.- Pasar los cortes a la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min.
- 6.- Lavar en agua corriente, 5 min o hacer 3 cambios de 15 seg.
- 7.- Enjuagar en agua destilada.
- 8.- Teñir con la solución de fucsina-escarlata por 5 seg (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso o de preparación del colorante).
- 9.- Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
- 10.- Pasar los cortes a la solución de ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
- 11.- Teñir con la solución de azul de anilina durante 15 seg (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso del reactivo).
- 12.- Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante.
- 13.- Pasar al ácido acético por 1-2 min.
- 14.- Deshidratar en alcohol de 96° por unos seg (cuidar que no se decolore).
- 15.- Continuar con el alcohol absoluto hasta acarar en xilol y montar en resina.

APÉNDICE B PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

B.1. Solución de formalina 10 %

* Para preparar 500 mL

Formalina 37 %	136 mL
PBS 1X	364 mL

B.2. PBS 10 X

* Para preparar 100 mL

NaCl	8.0 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Ajustar pH a 7.2
Almacenar a 4 °C.

B.3. PBS 1X

* Para preparar 500 mL

PBS 10X	50 mL
Agua destilada	450 mL

Ajustar pH a 7.2
Almacenar a 4 °C.

B.4. Hematoxilina de Gill.

Agua destilada	730 mL
Etilenglicol	250 mL
Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 g
* Si está en cristales pesar	2.36 g
Yodato de sodio	0.2 g
Sulfato de aluminio	17.6 g
Ácido acético glacial	2.0 mL

* Para preparar se debe seguir el orden, agitar a TA por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.

B.5. Eosina.

Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta	1.0 g
Agua destilada	20 mL
Alcohol del 96º	80 mL

Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregar en tres partes de alcohol de 80 °C. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

B.6. Solución de alcohol-ácido.

Alcohol de 70º	99 mL
Ácido Clorhídrico (HCl)	1 mL

B.7. Solución de agua Amoniacal.

Agua destilada	99 mL
Hidróxido de Amonio	1 mL

B.8. Hematoxilina férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina (anhidra)	1 g
Alcohol de 96º	100 mL

Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29 %	4 mL
Agua destilada	95 mL
Ácido clorhídrico conc.	1 mL

Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y consistencia, precipita con el tiempo).

Solución de Cloruro Férrico 29%

Cloruro férrico	14.5 g
Agua destilada	50 mL

B.9. Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich.

Escarlata de Biebrich al 1 %	90 mL
Fucsina ácida al 1 %	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

*** Solución de escarlata de Biebrich**

Escarlata de Biebrich	1 g
Agua destilada	100 mL

*** Solución de fucsina ácida**

Fucsina ácida	1 g
Agua destilada	100 mL

B.10. Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.

Ácido Fosfomolibdico	5 g
Ácido Fosfotúngstico.	5 g
Agua destilada	200 mL

B.11. Solución de azul de anilina.

Azul de anilina	2.5 g
Agua destilada	100 mL
Ácido acético glacial	2 mL

B.12. Solución acuosa de ácido acético al 1%.

Ácido acético glacial	1 mL
Agua destilada	99 mL

B.13. Solución fijadora de Bouin

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75 mL
Formaldehído (36-38 %)	25 mL
Ácido acético glacial	5 mL

B.14. Solución enjuagadura sulfurosa

Agua	300 mL
Ac. Clorhídrico 1 N	15 mL
Metabisulfito de Sodio 10 %	18 mL

B.15. Solución metabisulfito de sodio 10 %

Metabisulfito de Sodio 10 %	10 g
Agua	