

# Integración donante-receptor del ligamento cruzado anterior en aloinjertos osteoarticulares

## Estudio histológico y molecular

SEBASTIÁN CÓNCARO\*, LUIS A. APONTE TINAO\*, ESTEBAN MOCETTI\*\*, RODOLFO TARELLI\*\*,  
HERNÁN GARCÍA RIVELLO\*\*, MIGUEL AYERZA\*, ANA MORANDI\*\* y D. LUIS MÚSCOLO\*

\**Instituto de Ortopedia y Traumatología "Carlos E. Ottolenghi"*  
y \*\**Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Italiano de Buenos Aires*

### RESUMEN

**Introducción:** Los objetivos del trabajo fueron determinar en un modelo porcino los aspectos biológicos y estructurales de la integración del ligamento cruzado anterior en aloinjertos de fémur distal, y evaluar la incorporación del ADN de los fibroblastos del receptor sobre el tejido donante.

**Materiales y métodos:** La muestra estuvo formada por 10 cerdos donantes en los que se realizó la ablación de fémures y 10 cerdos receptores. Los fémures donantes fueron trasplantados al grupo receptor realizando la sutura de las estructuras ligamentarias. Se estudiaron los LCA a las 3 y 6 semanas de realizado el trasplante. Las muestras fueron evaluadas mediante técnicas de identificación tisular utilizando tres marcadores microsatelitarios polimórficos e histología convencional.

**Resultados:** A las 6 semanas el patrón de bandas de ADN correspondió sólo al tipo receptor revelando la infiltración celular temprana del receptor sobre el ligamento donante. A nivel de la unión donante-receptor se observó la regeneración de las fibras colágenas y la restauración de su continuidad a través de la sutura.

**Conclusiones:** Concluimos que el ligamento donante es repoblado en forma total por células del receptor a las 6 semanas, y que la unión entre donante y receptor es restaurada a partir de un tejido rico en fibras colágenas.

**PALABRAS CLAVE:** Ligamento cruzado anterior. Biología molecular. Aloinjertos óseos. Rodilla.

### ACL DONOR-RECEPTOR INTEGRATION IN OSTEOARTICULAR ALLOGRAFTS

#### ABSTRACT

**Background:** The objectives of the present work were to determine the biological and structural aspects of the anterior cruciate ligament reconstruction in distal femoral allografts in a pig model and to evaluate the DNA turnover of the donor and host cells.

**Methods:** Twenty skeletally mature pigs were used in this study. The right distal femur of the donor group was stored at -80 degrees Celsius until transplantation. The ten donor osteoarticular allografts were transplanted to the donor recipient group. End to end sutures were performed to all capsule-ligamentary structures. The anterior cruciate ligaments of the recipient groups were evaluated at three and six weeks after transplantation. The samples were studied using polymorphic microsatellites DNA pattern and histology.

**Results:** At six weeks the DNA band pattern was only of receptor origin. This finding shows the early incorporation of the donor ligament and absence of donor cells.

**Conclusions:** The donor ligament is repopulated by donor cells at six weeks and the donor and host union is restored.

**KEY WORDS:** Anterior cruciate ligament. Molecular biology. Bone allograft. Knee.

Recibido el 17-12-2002. Aceptado luego de la evaluación el 1-4-2003.

Correspondencia:

Dr. SEBASTIÁN CÓNCARO

Instituto de Ortopedia y Traumatología "Carlos E. Ottolenghi"

Hospital Italiano de Buenos Aires

Potosí 4215 - C1199ACK, Buenos Aires

Telefax: 4959-0200 ext. 8409/8419

E-mail: sebastian.concaro@hospitalitaliano.org.ar

El principal objetivo en el tratamiento de algunos tumores benignos agresivos y de los tumores malignos del

sistema osteoarticular es la resección con márgenes amplios.<sup>1,3,6,17,18,23,26,27,30</sup> Existen diversas opciones para reconstruir los defectos osteoarticulares generados luego de la resección de un tumor. Los aloinjertos, las endoprótesis de reconstrucción y las aloprótesis representan algunos de los procedimientos utilizados en la actualidad.<sup>1,3,9,10,15,17,18,23,25,27,30-32,34-36</sup> Las ventajas en la utilización de aloinjertos osteoarticulares son la posibilidad de resistir cargas mecánicas, la incorporación progresiva y la capacidad de reinsertar ligamentos y tendones.<sup>19-22</sup> La falla a largo plazo de los injertos osteoarticulares se atribuye principalmente al deterioro articular. La incorporación de los tejidos blandos del donante restituiría la estabilidad articular y la distribución de las cargas mecánicas sobre la superficie articular, influyendo de esta manera sobre la supervivencia a largo plazo de la articulación de la rodilla.<sup>14,17,22,24,37</sup> Estudios realizados sobre aloinjertos humanos sugieren que la inestabilidad capsular y ligamentaria, así como las diferencias de tamaño entre la superficie articular del donante y la del receptor afectarían la tasa de desgaste del cartilago articular.<sup>7</sup>

El ligamento cruzado anterior (LCA) no se regenera en forma espontánea luego de una ruptura traumática.<sup>21</sup> Los procedimientos de reparación primaria para restaurar el LCA se asocian con malos resultados;<sup>4</sup> sin embargo, los fibroblastos derivados de especímenes de LCA intactos o lesionados retienen la capacidad de migrar sobre matrices de colágeno in vitro.<sup>19,20</sup> Una de las hipótesis propuestas para explicar la falla de reparación de ligamentos intraarticulares es la falta de formación del coágulo de fibrina durante el proceso de reparación, impidiendo de esta manera la migración inicial de los fibroblastos.<sup>2,21</sup>

La reconstrucción de los ligamentos intraarticulares en los injertos osteoarticulares se realiza en nuestro centro suturando los extremos del donante y del receptor. Este modelo de reparación es diferente del de reparación primaria del LCA lesionado, ya que la estructura de los segmentos donante y receptor se encuentra conservada. Los ligamentos y tendones congelados que forman parte de los aloinjertos osteoarticulares contribuirían principalmente con matriz extracelular remedando una matriz de colágeno sobre la cual los fibroblastos o células provenientes de otras localizaciones podrían migrar. El objetivo de este trabajo fue analizar la progresión de la repoblación celular del ligamento cruzado anterior donante mediante técnicas de análisis de ácido desoxirribonucleico (ADN) para identificación tisular e histología convencional en ligamentos cruzados anteriores de trasplantes óseos alogéneos de fémur distal en cerdos.

## Materiales y métodos

### *Animales y procedimiento quirúrgico*

Todos los procedimientos realizados utilizando animales de laboratorio fueron aprobados por el comité de ética de nuestro

centro. Se utilizaron 20 cerdos adultos de raza Durok Jersey. Los animales fueron divididos en dos grupos de 10 animales no relacionados. La sujeción de cada animal fue llevada a cabo previa inyección intramuscular en la tabla del cuello con una mezcla de 200 mg de ketamina, 1 ml de atropina al 1% y 10 mg de diazepam. A los 15 minutos se colocó una máscara de oxígeno con halotano al 5% hasta llevarlo al plano quirúrgico. Se procedió luego a la intubación con tubos pediátricos n° 7 y se mantuvo el plano con halotano al 2% más oxígeno a un volumen de 4 litros por minuto administrado mecánicamente por un respirador Bird Mark II<sup>®</sup> adaptado para volumen.

En el grupo denominado *donante* (n = 10) se realizó la cirugía de ablación de 10 fémures distales derechos conservando todas las inserciones de las partes blandas. Los fémures fueron preservados a -80° C sin ningún tratamiento de crioprotección previo. En el grupo denominado *receptor* (n = 10), se efectuó una osteotomía de la tuberosidad anterior de la tibia, retrayendo el aparato extensor para exponer el fémur distal. El fémur distal derecho del cerdo receptor fue osteotomizado a 10 cm de la superficie articular para ser extraído dejando insertadas las estructuras capsuloligamentarias en su lado tibial. Los fémures congelados del grupo donante fueron fijados utilizando una placa de 3,5 LC-DCP de acero inoxidable (Synthes, Argentina). La cápsula posterior del fémur donante fue suturada a la del receptor. Los ligamentos cruzados anteriores, posteriores y laterales fueron suturados utilizando una sutura de Vycril 4,0. La tuberosidad anterior de la tibia fue sintetizada con un tornillo de cortical de 3,5 mm.

Los cerdos del grupo receptor fueron sacrificados a las 3 y 8 semanas posteriores al trasplante en grupos de cinco animales mediante la inyección intravenosa de 5 ml (15 meq) de cloruro de potasio, la cual provocó fibrilación ventricular. Se reseccó la articulación femorotibial extirpando por completo el LCA identificando los extremos donante y receptor, así como la unión de ambos ligamentos.

### *Muestras de sangre*

Se efectuó una extracción de 3 ml de sangre venosa anticoagulada con EDTA de los 20 animales (10 cerdos del grupo donante y 10 cerdos del grupo receptor) durante las cirugías de ablación para el grupo donante y las de trasplante para el grupo receptor, con posterior extracción del ADN genómico de cada muestra de sangre mediante Qiamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se homologaron las concentraciones de todas las muestras de ADN a 200 nanogramos por microlitro, mediante medición espectrofotométrica y posterior dilución.

### *Muestras de ligamentos cruzados anteriores*

Los animales del grupo receptor fueron subdivididos en dos grupos. Un subgrupo de 5 cerdos fue sacrificado a las 3 semanas y los otros 5 cerdos se sacrificaron a las 6 semanas postrasplante, con la finalidad de evaluar la progresión en el tiempo de la integración del LCA donante trasplantado con el LCA del receptor. En el momento del sacrificio del animal receptor (3 o 6 semanas postrasplante) se realizó la resección quirúrgica a cielo abierto del LCA de la articulación trasplantada. Los extremos donante (D), receptor (R) y la unión donante-receptor (U) fueron adecuadamente marcados para identificarlos en el procesamiento macroscópico.

Se utilizaron como controles de histología normal de LCA, dos resecciones completas de LCA de cerdo normal del mismo peso y raza; y como controles del daño por congelación del LCA donante, otras dos resecciones completas, las cuales se criopreservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante un mes y luego se descongelaron para procesarlas con el resto de los tejidos.

Se tomaron muestras longitudinales del extremo donante del LCA de cada cerdo trasplantado, del extremo receptor y de la zona de unión donante-receptor, las cuales se fijaron en formaldehído buffer al 10% y se procesaron por métodos histológicos de rutina en casetes mediante un procesador automático Citadel 2000 Wax Bath (Shandon®, EE.UU.), con inclusión en parafina. Al mismo tiempo se tomaron muestras contiguas de las mismas áreas que las destinadas a histología y se colocaron en criotubos estériles separados con buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, SDS 0,5%, pH 7,8) y proteinasa K con una concentración final de 100 microgramos por mililitro (Boehringer Mannheim, Alemania), incubándose en baño húmedo durante 24 horas a  $56^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizó extracción del ADN genómico de cada muestra ligamentaria mediante Qiamp DNA Tissue Mini Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se homologaron las concentraciones de todas las muestras de ADN a 200 nanogramos por microlitro, mediante medición espectrofotométrica y posterior dilución.

### Estudio histológico de los LCA trasplantados

Se realizaron cortes histológicos seriados de 5 micrones de espesor de las muestras longitudinales de LCA de los cerdos del grupo receptor (D, U y R) y de los LCA control. A continuación se coloreó el material con técnica de hematoxilina - eosina (Biopur®) y tricrómico de Masson (Biopur®). El material fue evaluado por dos patólogos independientes con microscopio óptico de luz. Se identificó el hilo de sutura como referente de la zona de unión entre los ligamentos donante y receptor.

Se compararon las muestras de LCA trasplantado de 3 y 6 semanas de evolución, evaluando los siguientes parámetros histológicos:

- Arquitectura general del ligamento a nivel del extremo (D), zona (U) y extremo (R), categorizándola según su similitud a un ligamento cruzado anterior normal o a un tejido de reparación fibroso, categorizándola en: tejido ligamentario normal, tejido fibroso cicatrizal, tejido de reparación inmaduro y LCA donante remanente con daño poscongelamiento. Cada una de estas cuatro categorías se cuantificó como un porcentaje del total del ligamento en el área estudiada.
- Celularidad en el extremo (D), en la zona (U) y en el extremo (R): tipo de células (fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos / plasmocitos, macrófagos y polimorfonucleares), semicuantificación en tres grados: 0: menor que en el ligamento normal, 1: similar que en el ligamento normal, 2: mayor que en el ligamento normal.
- Estructura, características y disposición de las fibras colágenas en las tres zonas (D, U y R) categorizadas en tres grados: 0: fibras paralelas gruesas (normal), 1: fibras gruesas no paralelas y remodelación cicatrizal; y 2: fibras delgadas, irregulares y escasas.
- Cantidad de sustancia fundamental de la matriz extracelular en las tres zonas (D, U y R): 0: no visible (normal), 1: escasa y aislada, 2: abundante (presencia de áreas mixoides / mucoides).

- Cuantificación de la revascularización (angiogénesis) en la zona (U) en tres grados: 0: ausente; 1: escasa (menor o igual a 3 neovasos x campo de 10 X), 2: frecuente (mayor o igual a 4 neovasos x campo de 10 X).
- Presencia de necrosis en el extremo (D), en la zona (U) y en el extremo (R); en tres grados: 0: ausente, 1: localizada, 2: extensa.
- Presencia de inflamación y tipo inflamatorio (infiltrado agudo o crónico) en las tres zonas antes descritas.
- Identificación de los puntos de sutura en la zona de unión y determinación de la presencia de reacción de tipo cuerpo extraño.
- Otros elementos: hemorragia, metaplasia condroide, sinovitis, etc.

### Estudios de biología molecular.

#### Análisis del origen del ADN tisular de los LCA trasplantados mediante amplificación de microsátélites polimórficos

A través de una de las técnicas de identificación de tejidos más utilizadas, amplificación de microsátélites polimórficos con herencia mendeliana, se realizó la evaluación del proceso de integración de los LCA trasplantados con 3 y 6 semanas de evolución. Para ello se utilizó el ADN genómico extraído de las tres regiones del LCA trasplantado en estudio (R, U y D) a fin de determinar si el ADN de las células de cada zona pertenece al cerdo donante, al cerdo receptor o a ambos.

La identificación del tejido ligamentario del LCA a nivel del extremo (D), de la zona (U) y del extremo (R) se realizó comparando los patrones de migración electroforética de productos de PCR de los diferentes alelos de tres microsátélites polimórficos de cerdo: S0141, S0142 y S0143 (ArkDB-pig Roslin Bioinformatics Group, Reino Unido),<sup>14</sup> con los observados en el ADN genómico de la sangre de cada cerdo del grupo donante y de su respectivo receptor. El patrón de microsátélites del ADN genómico de la sangre de cada cerdo del grupo donante y de su respectivo receptor se utilizó para generar el patrón de referencia para identificar el tejido correspondiente a cada animal.

Los tres microsátélites de cerdo analizados son polimórficos e informativos, con múltiples alelos de diferentes longitudes de repetición, los cuales se heredan en forma mendeliana y son útiles en diferentes razas de cerdos.<sup>14</sup> La amplificación por PCR y análisis en geles de poliacrilamida (PAGE) desnaturalizante al 9% de tres microsátélites en las zonas D, U y R del LCA trasplantado permite un análisis cualitativo y semi-cuantitativo de la procedencia del ADN de las células del tejido analizado. Las secuencias de los primeros empleados fueron publicados con anterioridad por Hermann Geldermann y coautores.<sup>14</sup> Los primeros sentido (A) y antisentido (B) para cada microsátélite se sintetizaron con sintetizador de ADN / ARN ABI 392 - Applied Biosystems, EE.UU. de acuerdo con protocolos estándar del fabricante.

La mezcla de PCR para amplificar los microsátélites S0141, S0142 y S0143 se realizó sobre un volumen final de 50 microlitros incluyendo:

- Taq DNA polimerasa (PROMEGA, EE.UU.): 2 U / 50 microlitros de volumen final
- Mg<sup>2+</sup>Cl<sup>-</sup> (PROMEGA): 2 milimolar
- dNTPs mix (PROMEGA): 200 micromolar

- Buffer PCR 10X (PROMEGA) 10X: 5 microlitros
- H<sub>2</sub>O destilada estéril DNAsa y RNAsa free (PROMEGA): csp. 50 microlitros
- Primers: A + B 140 picomolar (1 microgramo)
- Muestra de ADN a estudiar: 200 nanogramos
- Mineral oil (PROMEGA): 1 gota

La amplificación por PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer TC-480 de acuerdo con el siguiente protocolo: *desnaturalización inicial* de 95°C durante 5 minutos; *35 ciclos*, desnaturalización: 45 segundos a 95°C, annealing: 30 segundos a 50°C, extensión: 45 segundos a 72°C; y *extensión final*: 72°C durante 5 minutos. Se amplificaron simultáneamente las muestras de ADN de sangre de cerdos donantes, sangre de cerdos receptores y tejidos LCA D, U y R, para los tres microsátélites mencionados en tubos independientes. Se utilizaron como controles negativos de amplificación ADN humano y ausencia de ADN (agua estéril).

Los productos de PCR obtenidos se corrieron en geles de agarosa al 3% para controlar la presencia de bandas específicas de los alelos microsatelitarios. Las técnicas de amplificación se ajustaron para evitar la presencia de bandas inespecíficas. Los tamaños esperados para los productos de PCR de cada uno de los alelos de los tres microsátélites son:

S0141: Con 11 alelos entre 210 y 232 bases de largo.

S0142: Con 9 alelos entre 142 y 170 bases de largo.

S0143: Con 4 alelos entre 157 y 165 bases de largo.

Posteriormente los productos de PCR se resolvieron mediante PAGE desnaturante (Urea 7 M) al 9% con C = 5% (Índice acrilamida / bisacrilamida 19:1). Los productos de PCR se mezclaron con buffer de carga (99,5% formamida, 20 mM EDTA, 0,005% xylene cyanol y 0,005% azul de bromofenol) en relación 18:2. La mezcla se calentó 5 minutos a 95°C y se enfrió inmediatamente en hielo. El gel se recorrió 30 minutos a 70 V constante (2 W) y luego de sembrar las muestras se corrieron 22 horas a 140 V constante (4 W).

Los geles se tiñeron con el método de impregnación argéntica (Promega, EE.UU.) y se realizó fotodocumentación mediante un sistema digital de escáner.

Comparando los patrones electroforéticos de los productos de PCR de cada microsátélite, para cada muestra de LCA trasplantado (zonas D, U, y R), con los patrones correspondientes a la sangre de los cerdos donantes y receptores en cada caso se logró identificar la procedencia del ADN del componente celular del área del LCA en estudio.

## Resultados

### Estudio histológico

#### LCA explantado a las tres semanas postrasplante

El estudio histológico demostró una arquitectura general conservada en todos los animales trasplantados, sin necrosis ni inflamación aguda (Tabla 1; animales 6 al 10). Se observó tejido conectivo de reparación inmaduro cubriendo desde el 60 al 95% de la superficie total del extremo D y focos remanentes de LCA implantado del donante, que abarcaban desde el 5 al 35% de la superficie,

con fibras colágenas gruesas, ordenadas y escasos fibroblastos de núcleos picnóticos y citoplasma vacuolado con daño morfológico poscongelamiento. Estos focos remanentes se hallaron rodeados de escasos eosinófilos, abundantes linfocitos y macrófagos.

A nivel del tejido de reparación inmaduro se identificaron abundantes fibroblastos activos, miofibroblastos, algunos linfocitos, fibras colágenas delgadas, irregulares y desordenadas, sustancia fundamental evidente y abundantes vasos de neoformación que rodean e invaden las fibras colágenas acelulares del donante.

En la zona U se observó tejido conectivo de reparación inmaduro cubriendo desde el 30 al 80% de la superficie total de la zona de unión con intensa neovascularización y fibrosis cicatrizal que abarcaba desde el 20 al 70% de la superficie, con fibras colágenas gruesas, desordenadas y moderada a abundante cantidad de fibroblastos y miofibroblastos (Fig. 1). En ningún caso se observó LCA remanente del donante con daño poscongelamiento a nivel de la zona U. En la totalidad de los casos se observó inflamación crónica y material quirúrgico (hilo de sutura) rodeado de células gigantes de cuerpo extraño e histiocitos.

Tanto en el extremo D como en la zona U se observó celularidad mayor que en el ligamento normal en su mayoría constituida por abundantes fibroblastos activos; vasos de neoformación (algunos dilatados) y fibras colágenas delgadas y con cierto ordenamiento en fascículos. El grosor de las fibras y su ordenamiento aumenta hacia el extremo receptor, así como disminuye la celularidad.

En el extremo R se evidenció como estructura dominante tejido ligamentario normal con algunos vasos de neoformación (mayor cantidad que en el ligamento normal) y áreas de fibrosis cicatrizal que no superaron en ningún caso el 30% de la superficie de dicho extremo.

No se observaron signos de rechazo en ninguno de los LCA trasplantados.

#### LCA explantado a las seis semanas postrasplante

El estudio histológico demostró una arquitectura general conservada en todos los animales trasplantados, con comienzo de remodelación de las fibras colágenas a nivel de la unión donante-receptor, restitución de la arquitectura ligamentaria normal a nivel del extremo receptor, aparición de fibroblastos inactivos (fibrocitos) y disminución de la celularidad en todos los segmentos, siendo esto más evidente cuanto más cerca del extremo receptor se analice en cualquiera de las zonas del LCA trasplantado (R, D o U) (Tabla 1; animales 1 al 5) (Fig. 1).

En los cerdos trasplantados sacrificados a las 6 semanas, en el extremo D se observó tejido de tipo cicatrizal que abarcaba entre el 70 al 90% de la superficie de esta región ligamentaria, con zonas de remodelación de fibras colágenas gruesas, algunas paralelas y modeladas, menor celularidad absoluta que a las 3 semanas, con aumento re-

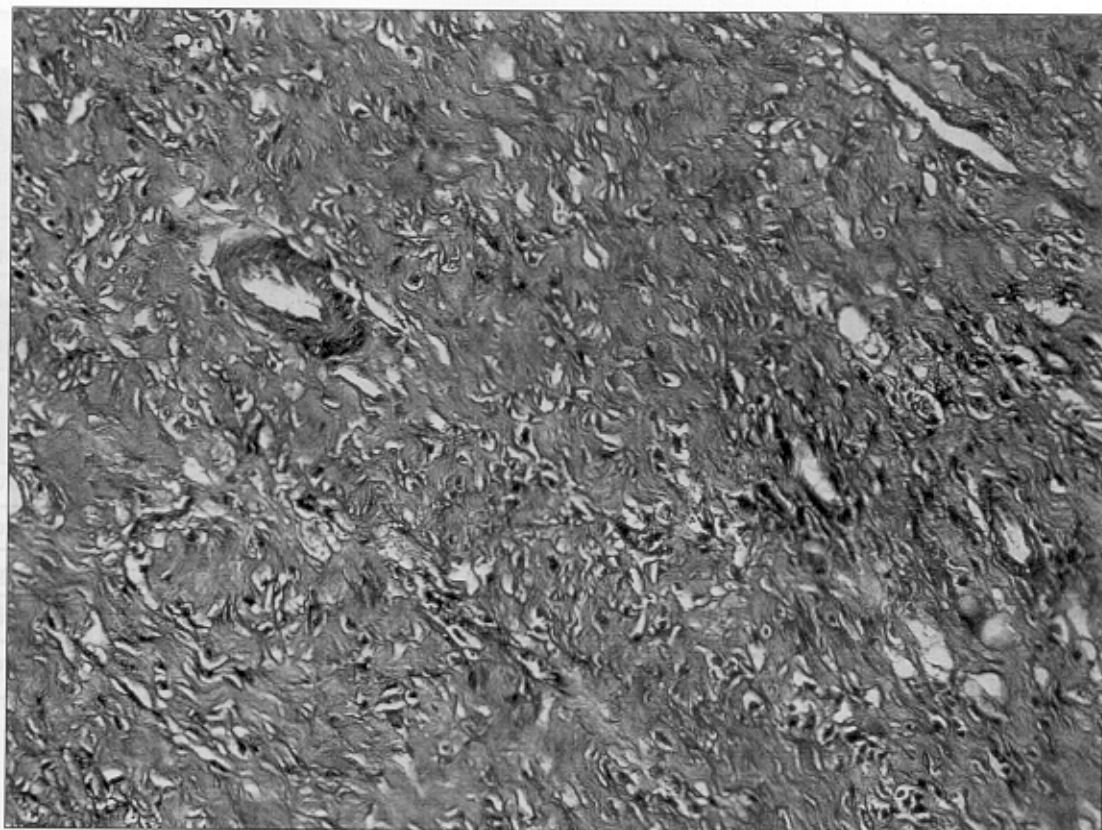
**Tabla 1.** Estudio histológico de LCA en el grupo receptor, a las 3 y 6 semanas, postrasplante

LCA del grupo receptor	Tiempo de evolución	Arquitectura general	Celularidad y tipo dominante	Fibras colágenas	Sustancia fundamental	Angiogénesis	Necrosis	Inflamación	Granuloma a cuerpo extraño	Otros elementos
Cerdo 1	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		60% ligamentaria y 40% fibrosis cicatrizal	2 / fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos aislados y macrófagos	1	0	1	No	Crónica	Sí	No
Cerdo 1 Unión (U)		30% tejido de reparación inmaduro y 70% fibrosis cicatrizal	2 / fibroblastos, miofibroblastos y linfocitos	1	1	1	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 2		30% ligamentaria y 70% fibrosis cicatrizal	2 / fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos y macrófagos	1	0	2	No	Crónica	Sí	No
Ext. receptor (R)		50% tejido de reparación inmaduro y 50% fibrosis cicatrizal	2 / fibroblastos, miofibroblastos y linfocitos	2	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 3		40% ligamentaria y 60% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		10% tejido de reparación inmaduro y 90% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	0
Cerdo 4		50% ligamentaria y 50% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	0	No	No	No	0
Ext. receptor (R)		30% tejido de reparación inmaduro y 70% fibrosis cicatrizal	2 / fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	Sí	Sinovitis
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No
Ext. donante (D)	6 semanas	Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	0	No	No	No	No
Cerdo 5		45% ligamentaria y 55% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	1	0	1	No	No	No	No
Ext. receptor (R)		20% tejido de reparación inmaduro y 80% fibrosis cicatrizal	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	1	1	2	No	Crónica	No	No

(Continúa)

**Tabla 1.** Estudio histológico de LCA en el grupo receptor, a las 3 y 6 semanas postrasplante (Cont.)

LCA del grupo receptor	Tiempo de evolución	Arquitectura general	Celularidad y tipo dominante	Fibras colágenas	Sustancia fundamental	Angiogénesis	Necrosis	Inflamación	Granuloma a cuerpo extraño	Otros elementos
Cerdo 6 Ext. receptor (R)		Ligamento normal	1 / fibroblastos	0	0	1	No	No	No	No
Cerdo 6 Unión (U)	3 semanas	70% fibrosis cicatrizal y 30% tejido de reparación inmaduro	2 / fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos y macrófagos	1	1	2	No	Crónica	Sí	No
Cerdo 6 Ext. donante (D)		90% tejido de reparación inmaduro y 10% LCA donante remanente	2 / miofibroblastos, macrófagos y abundantes linfocitos	2	2	2	No	Crónica	No	No
Cerdo 7 Ext. receptor (R)		80% ligamento normal y 20% fibrosis cicatrizal	2 / fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos aislados	0	0	2	No	Crónica	No	No
Cerdo 7 Unión (U)	3 semanas	40% fibrosis cicatrizal y 60% tejido de reparación inmaduro	2 / fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos y macrófagos	2	1	2	No	Crónica	Sí	No
Cerdo 7 Ext. donante (D)		70% tejido de reparación inmaduro y 30% LCA donante remanente	2 / miofibroblastos, macrófagos y linfocitos	2 y 1 (LCA donante)	2	2	No	Crónica	Sí	No
Cerdo 8 Ext. receptor (R)		90% ligamento normal y 10% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos	0	0	1	No	No	No	No
Cerdo 8 Unión (U)	3 semanas	30% fibrosis cicatrizal y 70% tejido de reparación inmaduro	2 / fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos y macrófagos	1	2	2	No	Crónica	Sí	Metaplasia condroide
Cerdo 8 Ext. donante (D)		95% tejido de reparación inmaduro y 5% LCA donante remanente	2 / miofibroblastos, macrófagos, aislados eosinófilos y abundantes linfocitos	2	2	2	No	Crónica	Sí	Hemorragia
Cerdo 9 Ext. receptor (R)		80% ligamento normal y 20% fibrosis cicatrizal	2 / fibroblastos, miofibroblastos y macrófagos	0	0	2	No	Crónica	Sí	No
Cerdo 9 Unión (U)	3 semanas	20% fibrosis cicatrizal y 80% tejido de reparación inmaduro	2 / fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos y macrófagos	1	2	2	No	Crónica	Sí	No
Cerdo 9 Ext. donante (D)		65% tejido de reparación inmaduro y 35% LCA donante remanente	2 / miofibroblastos, macrófagos, y abundantes linfocitos	2 y 1 (LCA donante)	2	2	No	Crónica	Sí	No
Cerdo 10 Ext. receptor (R)		70% ligamento normal y 30% fibrosis cicatrizal	1 / fibroblastos, miofibroblastos	0	0	1	No	No	No	No
Cerdo 10 Unión (U)	3 semanas	20% fibrosis cicatrizal y 80% tejido de reparación inmaduro	2 / fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos y macrófagos	1	1	2	No	Crónica	Sí	No
Cerdo 10 Ext. donante (D)		60% tejido de reparación inmaduro y 40% LCA donante remanente	2 / miofibroblastos, macrófagos y abundantes linfocitos	2 y 1 (LCA donante)	2	2	No	Crónica	Sí	No



**Figura 1.** Fotografía de un corte a nivel de la unión del ligamento cruzado anterior a las 6 semanas posoperatorias. Tricrómico de Masson x40. Obsérvese la abundante cantidad de fibras colágenas gruesas desordenadas, celularidad variable, vasos de neoformación y la continuidad de las fibras a este nivel.

lativo de fibroblastos y vasos de neoformación, y disminución de células inflamatorias (linfocitos). Se observó además tejido de reparación inmaduro en dicho extremo que no superó el 30% de la superficie del mismo y ausencia de remanentes de LCA del donante con daño de criopreservación.

En la zona U y el extremo R se observó restitución de la arquitectura hacia una conformación muy similar al ligamento normal con fibras colágenas gruesas y paralelas, franca disminución de la celularidad, presencia de fibrocitos hacia el extremo receptor, ausencia de inflamación y disminución del número de vasos capilares. En algunos sectores de la zona U aún se observan pequeños granulomas tipo cuerpo extraño rodeando material de sutura y focos de fibrosis cicatrizal no remodelados.

No se hallaron signos de rechazo en los casos estudiados.

#### *Estudios de biología molecular.*

#### *Análisis del origen del ADN tisular del LCA mediante amplificación de microsatélites polimórficos*

Los productos de PCR de cada microsatélite (S0141, S0142 y S0143) se corrieron en gels de poliacrilamida

independientes. En cada caso de LCA trasplantado se corrió en calles consecutivas del gel, el resultado del análisis del ADN del LCA extremo D, de la zona U, del extremo R, el resultado de la sangre del animal donante y de la sangre del animal receptor correspondiente.

Se compararon los patrones de migración (pesos moleculares) de los diferentes alelos microsatelitarios en cada calle (diferentes zonas del LCA) con los de la sangre de referencia, determinándose si el patrón de bandas correspondió al receptor (alelos del receptor), al donante (alelos del donante) o ambos combinados (alelos del donante y del receptor) (Tabla 2).

Cuando se dio la combinación de alelos del donante y del receptor los resultados sólo se evaluaron en forma cualitativa (presencia o ausencia de bandas) y no en forma cuantitativa (nivel de intensidad de las bandas del donante y de las del receptor), debido a los diferentes niveles de amplificación de los distintos alelos basados en la distinta longitud de su secuencia.

Si los alelos de un microsatélite específico presentaban el mismo patrón de bandas en el análisis de la sangre de referencia del donante y del receptor, el estudio de ese microsatélite se consideró no informativo y se descarta-



**Tabla 2.** Resultados de la comparación de los patrones de bandas de diferentes alelos de microsatélites (PAGE) observados en las zonas R, U y D del LCA del grupo receptor, a las 3 y 6 semanas postrasplante

LCA del grupo receptor	Tiempo evolución	Ext. donante (d)	Zona unión (u)	Extremo receptor (r)	Repoblación por células del donante
1	6 semanas	AR	AR	AR	Total
2	6 semanas	AR	AR	AR	Total
3	6 semanas	AR	AR	AR	Total
4	6 semanas	AR	AR	AR	Total
5	6 semanas	AR	AR	AR	Total
6	3 semanas	AD / AR	AR	AR	Parcial
7	3 semanas	AD / AR	AD / AR	AR	Parcial
8	3 semanas	AD / AR	AR	AR	Parcial
9	3 semanas	AD / AR	AD / AR	AR	Parcial
10	3 semanas	AD / AR	AD / AR	AR	Parcial

**AR:** Patrón de bandas correspondiente a alelos microsatelitarios del animal receptor.  
**AD:** Patrón de bandas correspondiente a alelos microsatelitarios del animal donante.  
**AD / AR:** Patrón de bandas de alelos combinados del donante y del receptor.

ron dichos resultados. Se requirió que al menos dos microsatélites distintos presentaran diferente patrón de bandas en el análisis del ADN de la sangre de referencia, entre el donante y el receptor, para incluir el caso como informativo.

En cuanto al nivel de integración tisular del extremo del LCA del donante con el del receptor, se consideró "total" cuando sólo fueron hallados alelos de un único animal en todas las zonas del LCA (D, R y U), lo cual indicaría que sólo existe ADN presente de uno de los animales debido a la repoblación celular por células de ese animal.

En todos los casos de 6 semanas de evolución postrasplante la integración fue total y mostró solamente alelos del receptor en las tres zonas estudiadas del LCA, lo cual indicaría repoblación de la matriz extracelular ligamentaria de la zona LCA donante por células del receptor y desaparición del ADN del donante por degradación de las células del mismo debido el sistema inflamatorio del receptor (linfocitos y macrófagos) (Fig. 2 A y B).

En todos los casos de 3 semanas de evolución postrasplante la integración fue parcial y mostró solamente alelos del receptor en el extremo R del LCA, alelos combinados del donante y receptor en la zona U en tres de los casos y solo alelos del receptor en dos de los casos, y alelos combinados del donante y receptor en la zona D en todos los casos. Esto indicaría una repoblación parcial de la

matriz extracelular ligamentaria de la zona LCA donante por células del receptor, con ADN remanente del donante en el extremo D y comienzo de la desaparición de éste en la zona U.

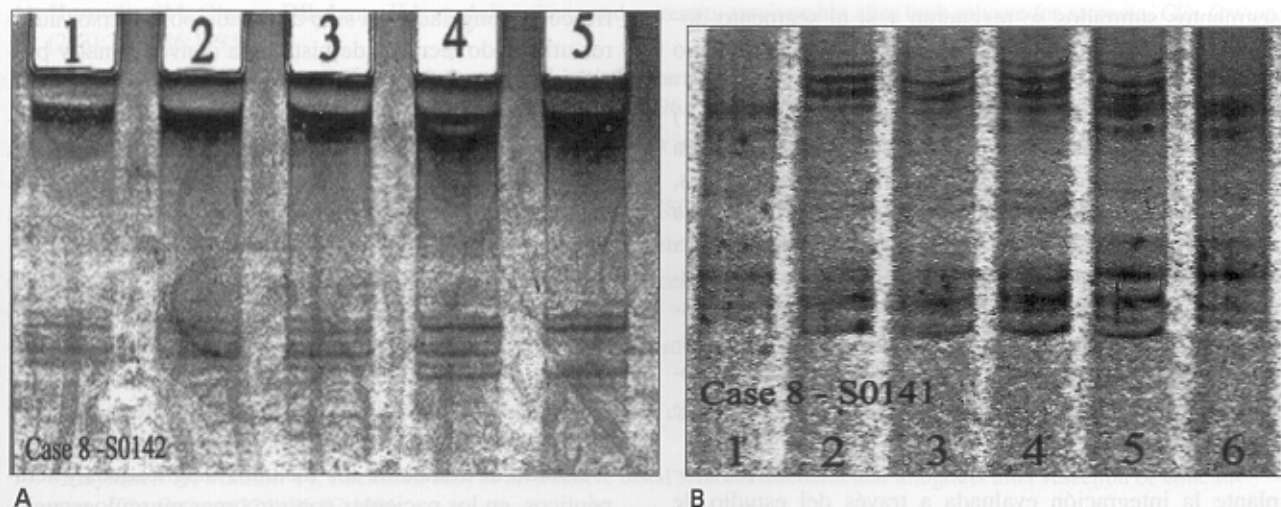
## Discusión

Los aloinjertos masivos han sido utilizados extensamente como alternativa de reconstrucción en defectos óseos severos.<sup>1,16-18,26,28</sup> La rodilla, un sitio común de localización tumoral, es una articulación de difícil reconstrucción debido a los requerimientos mecánicos a la cual es sometida durante la marcha. Como resultado del procedimiento reconstructivo es de gran importancia obtener estabilidad para evitar el inicio y progresión de procesos degenerativos del cartílago articular y de ambos meniscos.<sup>26,29,34</sup> El deterioro articular de aloinjertos de rodilla está potencialmente relacionado con la alineación articular, la congruencia anatómica y la estabilidad articular.<sup>8,23</sup>

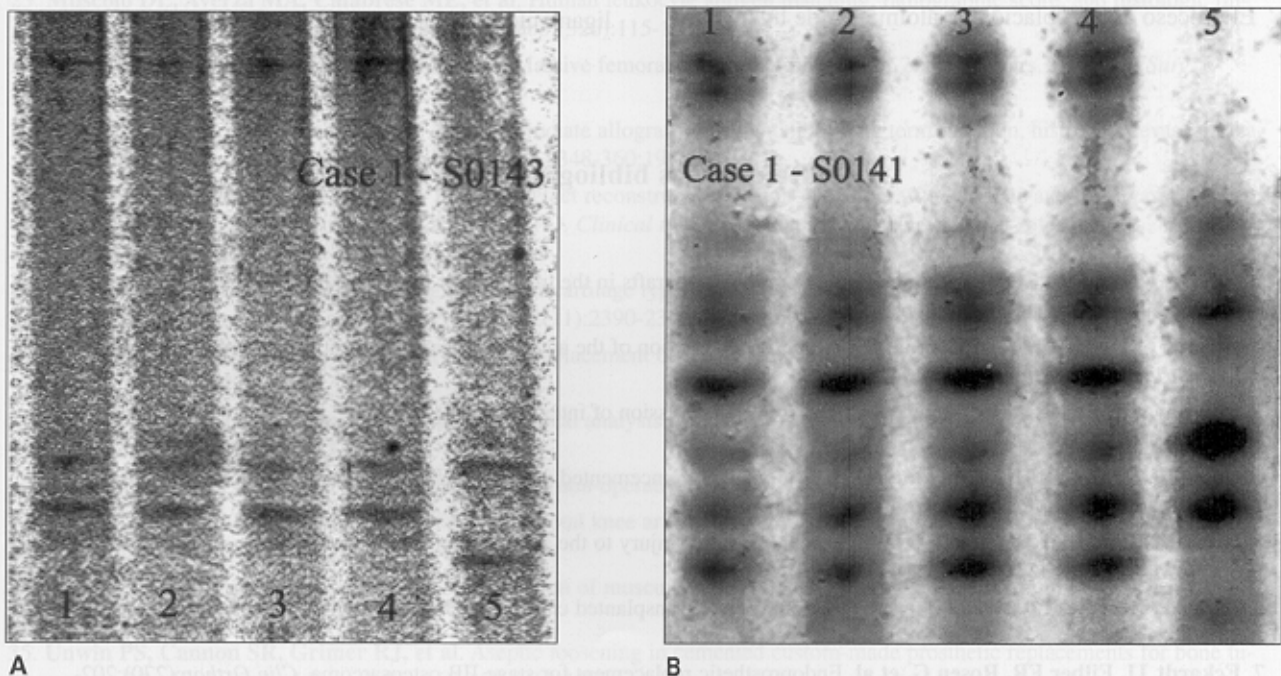
Existen controversias sobre la reconstrucción primaria de los ligamentos cruzados basadas en los informes que evidencian que el LCA no se regenera luego de la lesión primaria<sup>22</sup> y a que los resultados obtenidos con la reconstrucción primaria no han sido satisfactorios.<sup>5</sup>

La sutura de los ligamentos intraarticulares cuando se realiza un trasplante osteoarticular de rodilla forma parte del protocolo habitual de reconstrucción en nuestro cen-





**Figura 2. A.** Integración parcial. Caso 8 S0142: 1. AR en sangre periférica del receptor. 2. AR en R (extremo receptor). 3. AR en U (zona de unión). 4. AD y AR en D (extremo donante). 5. AD en sangre periférica del donante. **B.** Integración parcial. Caso 8 S0141: 1. AD en sangre periférica del donante. 2. AR en sangre periférica del receptor. 3. AR en R (extremo receptor). 4. AR en U (zona de unión). 5. AD y AR en D (extremo donante). 6. AD en sangre periférica del donante.



**Figura 3. A.** Integración total. Caso 1 S0143: 1. AR en sangre periférica del receptor. 2. AR en D (extremo donante). 3. AR en U (zona de unión). 4. AR en R (extremo receptor). 5. AD en sangre periférica del donante. **B.** Integración total. Caso 1 S0141: 1. AR en sangre periférica del receptor. 2. AR en D (extremo donante). 3. AR en U (zona de unión). 4. AR en R (extremo receptor). 5. AD en sangre periférica del donante.

segmentos suturados se regeneran y si el segmento donante es repoblado por células del receptor en un modelo porcino.

En el presente modelo el estudio histológico (Tabla 1) a las 6 semanas postrasplante demostró una arquitectura general conservada en todos los animales trasplantados, con comienzo de remodelación de las fibras colágenas a nivel de la unión donante-receptor, restitución de la arquitectura ligamentaria normal a nivel del extremo receptor, aparición de fibroblastos inactivos (fibrocitos) y disminución de la celularidad en todos los segmentos, siendo esto más evidente cuanto más cerca del extremo receptor se analice en cualquiera de las zonas del LCA trasplantado (R, D o U) (Fig. 1).

En todos los casos de 6 semanas de evolución postrasplante la integración evaluada a través del estudio de ADN fue total y mostró solamente alelos del receptor en las tres zonas estudiadas del LCA, lo cual indicaría repoblación de la matriz extracelular ligamentaria de la zona LCA donante por células del receptor y desaparición del ADN del donante por degradación de las células debido el sistema inflamatorio del receptor (linfocitos y macrófagos) (Figs. 2 A, B y 3 A, B).

La cicatrización de la unión donante-receptor de los ligamentos contribuiría significativamente a la estabilidad de la rodilla restituyendo la distribución uniforme de las cargas mecánicas sobre la superficie articular.

El proceso de repoblación de aloinjertos de ligamentos

frescos y congelados ha sido estudiado por diversos autores utilizando técnicas de histología convencional y biología molecular.<sup>6,9,11-13,28</sup> Jackson<sup>12,13</sup> observa que en injertos frescos de tendones patelares y ligamentos cruzados anteriores de cabra a las 4 semanas no existen rastros del ADN del animal donante. Goertzen<sup>9</sup> obtiene resultados similares evaluando la integración de ADN en ligamentos cruzados anteriores alogeneicos congelados.

El modelo evaluado en este trabajo es diferente del de los autores mencionados, ya que los ligamentos en nuestro experimento son suturados a nivel intraarticular mientras que en el de los autores se utilizan injertos de ligamento o tendón completo y se fijan al receptor a través de un segmento óseo.

Debido al avance de los métodos diagnósticos y terapéuticos, en los pacientes con sarcomas musculoesqueléticos se han incrementado las tasas de sobrevida, han disminuido las complicaciones y los efectos colaterales, y ha aumentado la calidad de vida. Este aumento en la tasa de sobrevida, especialmente en pacientes jóvenes y activos, genera una mayor demanda funcional al aloinjerto. Los resultados de este estudio demuestran en este modelo animal que la sutura intraarticular del ligamento cruzado anterior en trasplantes osteoarticulares permite obtener una adecuada arquitectura histológica a las 6 semanas con evidencia de repoblación celular por parte del receptor. Estos datos sustentan la técnica de reconstrucción de los ligamentos a nivel intraarticular.

## Referencias bibliográficas

1. Alho A, Karaharju EO, Korkala O, et al. Hemijoint allografts in the treatment of low grade malignant and aggressive bone tumours about the knee. *Int Orthop*;11:35-41;1987.
2. Allen C, Livesay C, Wong E, et al. Injury and reconstruction of the anterior cruciate ligament and knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*;7:110-121;1999.
3. Bhargava M, Beavis A, Edberg J, et al. Differential expression of integrin subunits in canine knee ligament fibroblasts. *J Orthop Res*;17:748-754;1999.
4. Capanna R, Morris HG, Campanacci D, et al. Modular uncemented prosthetic reconstruction after resection of tumours of the distal femur. *J Bone Jt Surg (Br)*;76:178-186;1994.
5. Cross MJ, Wootton JR, Bokor DJ, et al. Acute repair of injury to the anterior cruciate ligament: a long term follow-up. *Am J Sports Med*;21:128-131;1993.
6. Deber P, Decorte R, Delvaux S, et al. DNA analysis of transplanted cryopreserved meniscal allograft. *Arthroscopy*;16(1):71-75;2000.
7. Eckardt JJ, Eilber FR, Rosen G, et al. Endoprosthetic replacement for stage IIB osteosarcoma. *Clin Orthop*;(270):202-213;1991.
8. Enneking W, Campanacci D. Retrieved human allografts. *J Bone Jt Surg (Am)*;83:971-985;2001.
9. Goertzen M, Buitkamp J, Clahsen H, et al. Cell survival following bone-anterior cruciate ligament- bone allografts transplantation: DNA fingerprint segregation, and collagen morphological analysis of multiple markers in the canine model. *Arch Orthop Trauma Surg*;117:208-214;1998.
10. Henshaw R, Jones V, Malawer M. Endoprosthetic reconstruction with the modular replacement system. Survival analysis of the first 100 implants with a minimum 2 year follow-up. 4<sup>th</sup> Combined Meeting of the American and European Musculoskeletal Societies. Paper N° 90, Washington, DC;1998.

11. **Horowitz SM, Glasser DB, Lane JM, et al.** Prosthetic and extremity survivorship after limb salvage for sarcoma. *Clin Orthop*; (293):280-286;1993.
12. **Jackson D, Simon T, Kurzweil P, et al.** Survival of cell after intrarticular transplantation of fresh allografts of the patellar and anterior cruciate ligaments. *J Bone Jt Surg (Am)*;74:112-118;1996.
13. **Jackson D, Simon T.** Donor cell survival and repopulation after intrarticular transplantation of tendon an ligament allografts. *Microsc Res Tech*;58:25-33;2002.
14. **Jung M, Chen Y, Gelderman H.** Nine porcine microsatellites (S0141-S0149). *Anim Genet*;25(5):378;1994.
15. **Kaplan EL, Meier P.** Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Statist Assn*;53:457-481;1958.
16. **Kawai A, Muschler GF, Lane JM, et al.** Prosthetic knee replacement after resection of a malignant tumor of the distal part of the femur. *J Bone Jt Surg (Am)*;80:636-647;1998.
17. **Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, et al.** Long term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop*; (324):86-97;1996.
18. **Mankin HJ, Gebhardt MC, Tomford WW.** The use of frozen cadaveric allografts in the management of bone tumors. *Orthop Clin North Am*;18:275-289;1987.
19. **Mnaymneh W, Malinin TI, Lackman RD, et al.** Massive distal femoral osteoarticular allografts after resection of bone tumors. *Clin Orthop*; (324):86-97;1996.
20. **Murray M, Martin S, Spector M.** Migration of cells human anterior cruciate ligament explants into collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Orthop Res*;18:557-564;2000.
21. **Murray M, Spector M.** The migration of cells of the ruptured human anterior cruciate ligament into collagen-glycosaminoglycan regeneration templates in vitro. *Biomater*;22:2393-2402;2001.
22. **Murray MM, Martin SD, Martin TL, et al.** Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. *J Bone Jt Surg (Am)*;82:1387-1397;2000.
23. **Músculo DL, Ayerza MA, Aponte Tinao L.** Survivorship and radiographic anaysis of knee osteoarticular allografts. *Clin Orthop*; (373):73-79;2000.
24. **Músculo DL, Ayerza MA, Calabrese ME, et al.** The use of a bone allograft for reconstruction after resection of giant-cell tumor close to the knee. *J Bone Jt Surg (Am)*;75:1656-1662;1993.
25. **Músculo DL, Ayerza MA, Calabrese ME, et al.** Human leukocyte antigen matching, radiographic score, and histologic findings in massive frozen bone allografts. *Clin Orthop*; (326):115-126;1996.
26. **Músculo DL, Petracchi LJ, Ayerza MA, et al.** Massive femoral allografts followed for 22 to 36 years. *J Bone Jt Surg (Br)*;74:887-892;1992.
27. **Nikolau P, Seaver A, Glisson R, et al.** Anterior cruciate allograft transplantation: long term function, histology, revascularization, and operative technique. *Am J Sport Med*;14(5):348-360;1986.
28. **Ottolenghi CE, Músculo DL, Maenza R.** Bone defect reconstruction by massive allograft: technique and results of 51 cases followed for 5 to 32 years. En: Straub LR, Wilson PD. *Clinical trends in orthopaedics*. Nueva York: Thieme-Stratton;1982.pp.171-183.
29. **Price J, Till S, Bickerstaff D, et al.** Degradation of cartilage type II collagen precedes the onset of osteoarthritis following anterior cruciate ligament rupture. *Arthritis Rheum*;42(11):2390-2398;1999.
30. **Roberts P, Chan D, Grimer RJ, et al.** Prosthetic replacement of the distal femur for primary bone tumours. *J Bone Jt Surg (Br)*;73:762-769;1991.
31. **Rodeo S, Seneviratne A, Suzuki K, et al.** Histological analysis of human meniscal allografts: a preliminary report. *J Bone Jt Surg (Am)*; 82:1071-1082;2000.
32. **Segawa H, Omori G, Koga Y.** Long term results of non-operative treatment of acl injury. *Knee*;8:5-11;2001.
33. **Shih LY, Sim FH, Pritchard DJ, et al.** Segmental total knee arthroplasty after distal femoral resection for tumor. *Clin Orthop*; (292):269-281;1993.
34. **Sim FH, Beauchamp CP, Chao EYS.** Reconstruction of musculoskeletal defects about the knee for tumor. *Clin Orthop*; (221):188-201;1987.
35. **Unwin PS, Cannon SR, Grimer RJ, et al.** Aseptic loosening in cemented custom-made prosthetic replacements for bone tumours of the lower limb. *J Bone Jt Surg (Br)*;78:5-13;1996.
36. **Yasko AW, Lin PP, Weber KL.** Survivorship of segmental prosthetic arthroplasty for limb salvage following bone sarcoma resections. Musculoskeletal Tumor Society Annual Meeting. Paper N° 29, Baltimore, MD;2001.
37. **Zatsepin ST, Burdygin VN.** Replacement of the distal femur and proximal tibia with frozen allografts. *Clin Orthop*; (303):95-102;1994.