

Caracterización histológica e inmunocitoquímica de la grasa infrapatelar de Hoffa

Edward Acero¹⁻², Luis Gustavo Celis², Fernando Lizcano², Jennifer Garay²
Juan Guillermo Ortiz³, German Carrillo⁴.

1. Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana Grupo PROSEIM y Facultad de Medicina Universidad Militar. Grupo Morfología Médica.
2. Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana Grupo CIBUS.
3. Clínica Universitaria de La Sabana.
4. Fundación Santafé.

Correspondencia: luis.celis@unisabana.edu.co

Recibido: 03-11-2011 / **Aceptado:** 30-12-2011

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo la caracterización histológica e inmunocitoquímica de la grasa infrapatelar de Hoffa (GIH) en 12 pacientes intervenidos por artroscopia, meningo-plastia o remplazo de rodilla. Las fibras elásticas estuvieron presentes en la grasa infrapatelar con distribución unidireccional fascicular, se plantea una relación funcional en la biomecánicas del movimiento articular de la rodilla. Por otra parte las pruebas de inmunocitoquímica arrojaron marcaje positivo para vimentina, marcador de células del tejido conectivo; células mesenquimales y negativo para el resto de los anticuerpos estudiados.

Palabras clave: grasa infrapatelar, biomecánicas, vimentina, inmunocitoquímica, fibras elásticas.

Abstract

Histological and immunohistochemical characterization of infrapatellar Hoffa's fat

This study aimed to histological and immunohistochemical characterization of infrapatellar fat Hoffa (GIH) in 12 patients undergoing arthroscopic, meningo-plastia or knee replacement. Elastic fibers were present in the infrapatellar fat with unidirectional fascicular distribution, we propose a functional relationship in the biomechanics of the knee joint movement. Moreover Immunocytochemistry tests yielded positive staining for vimentin, a marker for connective tissue cells, mesenchymal cells and negative for other studied antibodies.

Key words: infrapatellar fat, biomechanics, vimentin, immunohistochemical, elastic fibers.

Introducción

La grasa infrapatelar es un tejido adiposo unilocular intracapsular pero extrasinovial en la articulación de la rodilla (1), anatómicamente se encuentra entre

el borde del polo inferior de la rotula y el borde anterosuperior de la tibia, limitando anteriormente con la cara posterior del ligamento infrarotuliano y posteriormente con la membrana sinovial articular anterior de la rodilla, esta estructura se encuentra

irrigada por las ramas de las arterias geniculadas superior e inferior (2). Una aproximación a su morfología microscópica que involucra la textura y su distribución se hace mediante imagenología estandarizada en el diagnóstico anatomopatológico del condroma infrapatelar, la enfermedad de Hoffa postraumática y la fibrosis infrapatelar post artroscopía (3-6). Sobre la organización histológica de la grasa infrapatelar hay reportes en el diagnóstico histopatológico de fibroma, hemangioma, condroma, lipoma e incluso en su detallada inervación en las rodillas artrósicas (7-11) pero no hay descripciones de la distribución y/o tamaño de fibras elásticas y menos en su caracterización inmunohistoquímica. Otro aspecto importante es que existen evidencias que sugieren que las células estromales multipotentes están presentes en tejido adiposo del humano adulto (12 y 13).

El propósito del estudio fue el realizar una caracterización histológica e inmunocitoquímica de la grasa infrapatelar de Hoffa.

Materiales y métodos

Consentimiento informado y toma de muestras

El consentimiento informado fue dado a conocer con antelación y aprobado por los pacientes que fueron intervenidos en la Clínica Universitaria de La Sabana y la Fundación Santafé.

A los pacientes se les extrajeron 1,5cm * 2,3cm cúbicos de grasa infrapatelar. Durante procedimientos de artroscopias, meningoelastias y reemplazos de rodilla.

Características de los pacientes y procesamiento de muestras

Las muestras extraídas se sumergieron en buffer de fosfato (PBS), se digirieron con colagenasa 0,5 % en PBS, a 37°C con agitación a 165 rpm por 30 minutos. Luego se fijaron en formol al 10%, se sometieron a histotécnica en parafina, cortes de 3 micras fueron coloreados con hematoxilina – eosina. Se observaron al microscopio óptico marca AXIOTAR 34-F para análisis de la distribución y grosor de las fibras, se midieron 120 fibras con micrómetro de cámara digital marca MOTIC al recorrer 5 campos en 100 X.

Una fracción de la muestra digerida fue centrifugada a 250g por 10 minutos, posteriormente se le realizaron dos lavados con PBS separándose las células meseinqueimales de los adipocitos maduros.

Fenotipificación inmunohistoquímica

Se realizó mediante un frotis directo en lámina porta objetos por cuadruplicado y se colorearon con azul de metileno para verificar su morfología, las 3 láminas restantes se realizaron con anticuerpos contra los filamentos intermedios de desmina, vimentina y citoqueratina y coloreados con diaminobencidina (Sigma, St. Luis) para su observación en el microscopio (Zeiss Imager A1, Alemania).

En la inmunofluorescencia se utilizó una lámina cubreobjetos con pozos delimitados por acrílico se dispusieron alícuotas de 20 microlitros de células de cultivo en medio F12. Se fijó la lámina luego con paraformaldehído al 4%, durante 10 minutos, lavando después con PBS dos veces durante 5 minutos. Luego se adicionó una solución al 0,1% de tritón X-100 y Solución Tampón Tris – TBS- a pH=7,6 durante 5 minutos y se lavó dos veces con la solución de TBS.

Se procedió después a incubar lámina durante 15 minutos con una solución de bloqueo al 5% de Suero Fetal Bovino y 0,001% de tritón X-100 en TBS. Luego de la incubación se añadió el anticuerpo monoclonal primario anti-vimentina (Dako, Glostrup, Denmark) diluido 1:100 en una solución de TBS al 0,001% de tritón X-100 y 5% de Suero Fetal Bovino, incubando toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se realizaron dos lavados con TBS, incubando a continuación con el anticuerpo secundario Alexa fluor 594 chicken anti-mouse IgG durante 45 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Una vez terminada la incubación se realizaron dos lavados con TBS y se procedió al montaje de los cubreobjetos en portaobjetos con medio acuoso Mowiol conteniendo colorante de Fluresceína marca Hoescht. Las láminas fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Japón) con luz fluorescente, correspondiendo el marcaje de color verde intracelular como positivo a la presencia de vimentina.

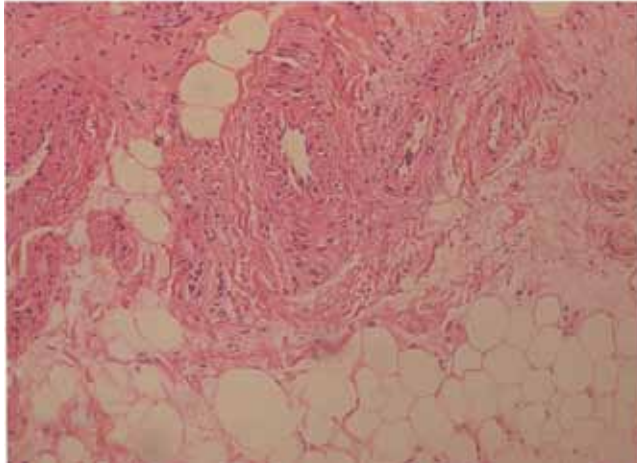
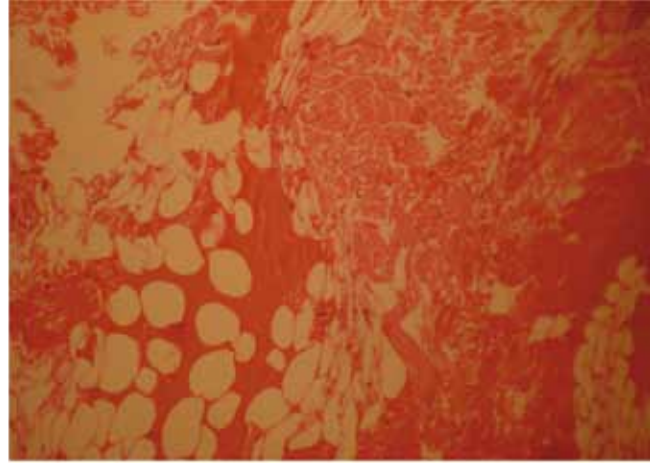
**Figura 1A****Figura 1B**

Figura 1. Histología de la Grasa Infrapatelar con coloración de H&E a 10 X. En 1A mostrando un estroma de tejido conectivo en medio de tejido adiposo unilocular y vasculatura arteriovenosa con 10x. En 1B mostrando la eosinofilia producto de la digestión enzimática con collagenasa en 10 X.

Resultados

La grasa infrapatelar en coloración de hematoxilina y eosina predigestión enzimática revela lóbulos de tejido adiposo unilocular entre los cuales se aprecia un estroma de tejido conectivo aerolar periadiposo celular y de tejido conectivo denso irregular entre lóbulos de tejido adiposo, este último continua con la túnica adventicia de vasculatura arterial, arteriolar y venular Figura 1A. Con digestión enzimática por collagenasa se aprecia fuerte eosinofilia relacionada con el producto de la digestión enzimática respetando la morfología de adipocitaria y vascular, Figura 1B.

Postdigestión enzimática son reconocibles las fibras elásticas por su homogénea eosinofilia y forma ondulada o “senoide” en distribución de “unidireccionalidad” formando agregaciones de fibras elásticas de aspecto “fascicular” cuya ubicación sobresale entre el tejido conectivo denso irregular descrito predigestión Figura 2A, en el extremo y bordes de la distribución “fascicular” elástica descrita, las fibras elásticas ramifican continuando con la matriz extracelular del tejido conectivo aerolar laxo periadiposo Figura 2B.

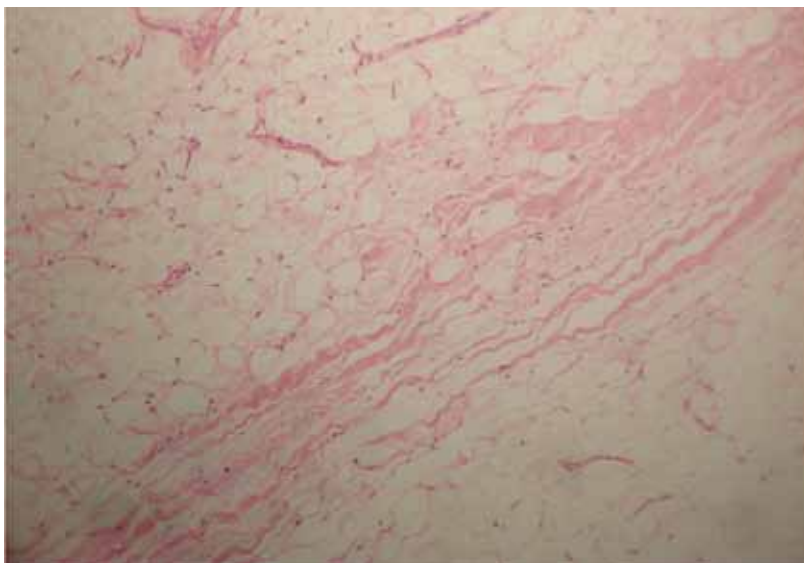
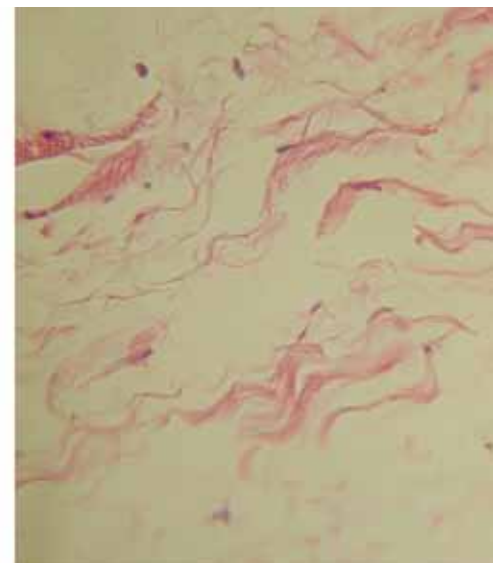
**Figura 2A****Figura 2B**

Figura 2. Histología de la grasa infrapatelar en coloración de H&E postdigestión con collagenasa En 2A mostrando fascículos de fibras elásticas eosinófilas onduladas en 5X. En 2B a 10 X en el extremo fascicular mostrando ramificaciones de fibras elasticas esparcidas en distribución difusa.

Diámetro fibras elásticas

Tabla 1. Diámetro expresado en micras de las fibras elásticas intrafasciculares y perifasciculares de la grasa infrapatelar

	N=120 Fibras Intrafasciculares	N=120 Fibras Perifasciculares
Promedio en micras	5,56	3,15
Desv. Est.	1,42	1,77

Por otra parte las pruebas de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia arrojaron marcaje positivo para vimentina que es un marcador de tejido células del tejido conectivo como las células mesenquimales y adipocitos, y negativo para el resto de los anticuerpos estudiados, lo cual se corrobora con la morfología fibroblástica característica de estas células. En estos marcajes se pudo observar el grado de diferenciación de estas células, Figuras 3, 4 y 5.

Discusión

En la literatura es reconocida la presencia de tejido adiposo unilocular infrapatelarmente cuando se han hecho diagnósticos de fibroma infrapatelar (7), hemangioma infrapatelar (8), condroma infrapatelar (9) y lipoma infrapatelar (10) y en detalle se ha descrito la distribución de filetes nerviosos cuando se ha extraído de rodillas artrósicas (11). Sin embargo, no hay reportes en la literatura que demuestren histológicamente fibras elásticas y su distribución. Un cuidadoso estudio imagenológico funcional de Hamarneh *et al* con tomografía computarizada –CT- describe en la grasa infrapatelar cambios en los campos vectoriales al movimiento articular de extensión y flexión de la rodilla, adjudicando este hallazgo a un componente “elástico” de la grasa (14). Así mismo, Stevenson *et al* determina por imagenología CT y Resonancia Magnética –MR- cambios graduales de la morfología de la grasa infrapatelar a diferentes ángulos de extensión y flexión de la rodilla, planteando la acomodación de la grasa infrapatelar a un componente “amortiguador elástico” (15).

En este estudio la particularidad de revelar fibras elásticas y por digestión con colagenasa demostrando además una distribución de unidireccional tipo “fascicular” permite adjudicar los cambios de forma de la grasa infrapatelar a los trabajos planteados

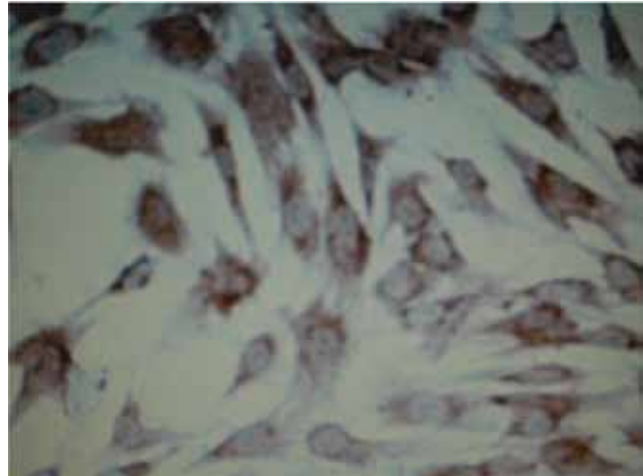


Figura 3. Células Mesenquimales derivadas de la Grasa Infrapatelar de Hoffa marcadas con anticuerpos contra vimentina y coloreadas con Diaminobencidina (DAB). Aumento 100X).

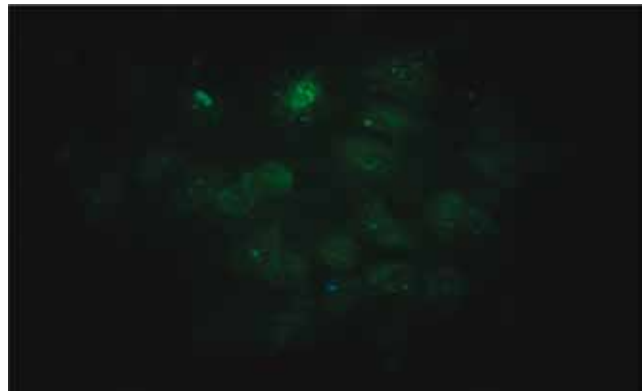


Figura 4. Células Mesenquimales derivadas de la Grasa Infrapatelar de Hoffa marcadas con anticuerpos con fluoresceína contra vimentina. (Aumento 100X).

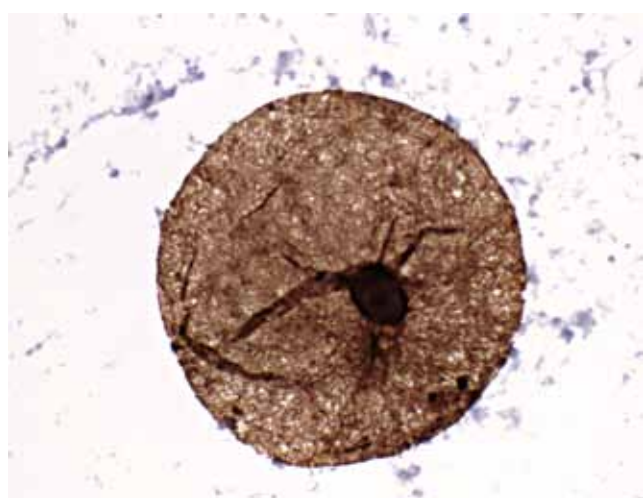


Figura 5. Adipocitos de la Grasa Infrapatelar de Hoffa marcados con anticuerpos contra vimentina y coloreadas con Diaminobencidina (DAB). (Aumento 1000X).

por Hamarneh, et al (14) y Stevenson, *et al* (15) pues esta demostrado que los “fascículos” fibrosos elásticos juegan un rol funcional en la recuperación de la forma sin consumo energía luego de la deformación mecánica (16,17). En cuanto al grosor y distribución de las fibras se reporta en la literatura agrupamiento y engrosamiento con en relación a la exigencia de su actividad (18,19), en los conteos de fibras gruesas interfasciculares con promedio 5,56 micras y perifasciculares con grosores de 3,17 micras, Tabla 1. Llama la atención como las fibras perifasciculares mas delgadas se organizan en un patrón de distribución difuso esparciéndose entre la matriz extracelular adiposa, similar al característico patrón de distribución de fibras elasticas entre la matriz ósea que se halla en las entesis ligamentosas en los epicondilos del humero,(19) aspecto que podría correlacionar una distribución de fibras elasticas en la grasa infrapatelar con fines disipadores de tensión y acomodación de la superficie capsular sinovial al movimiento, similar al arreglo histológico de fibras colágenas y elasticas en la entesis del tendón de Aquiles del modelo murino, (20).

Finalmente la fenotipificación demostró la presencia de células mesenquimales en el tejido adiposo graso de Hoffa, por lo que debemos resaltar la importancia de este tejido como fuente de células mesenquimales para ensayos de terapia celular en patologías de origen articular.

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad de La Sabana proyecto Med-96-2008.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Srta. Tania López (técnico de la Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona – España) su valiosa asistencia.

Referencias

1. The infrapatellar fat pad: anatomy and clinical correlations. J. Gallagher
2. P. Tierney, P. Murray, M. O'Brien. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2005; 13: 268–272
3. MR Imaging of the Infrapatellar Fat Pad of Hoffa. Jon A. Jacobson,
4. Leon Lenchik, Michael K Ruhoy, Mark E. Schweitzer, Donald Resnick. *RadioGraphics* 1997; 17:675-691
5. Krebs VE, Parker RD. Arthroscopic resection of an extrasynovial ossifying chondroma of the infrapatellar fat pad: end-stage Hoffa's disease? *Arthroscopy* 1994;10:301–304.
6. Which is your diagnosis? R. B. Lourenço, M. B. Rodrigues. *Radiol Bras* 2007; 40(3):IX–X
7. MRI of Hoffa's fat pad. D. Saddik, E. G. McNally, M. Richardson. *Skeletal Radiol* 2004; 33:433–444
8. Fibrous Scar in the Infrapatellar Fat Pad after Arthroscopy: MR Imaging.
9. Guangyu Tang, Mamoru Niitsu, Kotaro Ikeda, Hideho Endo, Yuji Itai *Radiation Medicine: Vol. 18 No. 1, 1–5 p.p., 2000*
10. Fibroma of tendon sheath of the infrapatellar fat pad. John Hur, Timothy A. Damron, Andrei I. Vermont. Sharad C. Mathur *Skeletal Radiol.* 1999 28:407–410
11. Synovial hemangioma in Hoffa's fat pad (case report). Osman Aynaci, Ali Ahmetoglu, Abdulkadir Reis, Ahmet Ugur Turhan. *Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc.* 2001; 9 :355–357
12. Extraskelatal ossifying chondroma in Hoffa's fat pad: an unusual cause of anterior knee pain. Case Report. Singh V K, Shah G, Singh P K, Saran D. *Singapore Med J* 2009; 50(5)
13. An unusual cause for anterior knee pain: strangulated intra-articular lipoma. Selcuk Keser, Ahmet Bayar, Gamze Numanoglu. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005; 13: 585–588
14. Valoración anatomopatológica de los elementos neurales en la almohadilla grasa de Hoffa en rodillas artrósicas. M^a. J. Sangüesa Nebot, F. Cabanes Soriano, P. Alemany Monrabal, R. Fernández Gabarda, C Valverde Mordt.. *Revista Española De Cirugía Osteoarticular* 2004; 39 (217): 23-26.
15. Khan WS, Adesida AB, Tew SR, Andrew, Hardingham, TE. The epitope
16. Characterisation and the osteogenic differentiation potential of human fat pad derived stem cells is maintained with ageing in the later life Injury, *Int J Care Injured* 2009; 40:150 -157.
17. Wickham MQ, Ericsson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak, F. Multipotent Stromal Cells derived from the infrapatellar Fat Pad of the Knee, *Clin Orthop* 2003; 1 (412):196-212.
18. Deformation analysis of Hoffa's fat pad from CT images of knee flexion and extensión. Ghassan Hamarneh, Vincent Chu, Marcelo Bordalo-Rodrigues and Mark Schweitzer. *Proc. SPIE* pages 5746- 527. 2005
19. Multi-angle deformation analysis of Hoffa's fat pad Kevin Stevenson, Mark Schweitzer, and Ghassan Hamarneh. . In *SPIE Medical Imaging*, volume 6143-29, pages 1-9, 2006.
20. A histological study of the deep fascia of the upper limb. Carla Stecco1,2 , Andrea Porzionato1 , Veronica Macchi1 . Cesare Tiengo1., Anna Parenti3., Roberto Aldegheri2 , Vincent Delmas4 . and Raffaele De Caro1. *It. J. Anat. Embryol.* Vol. 111, (2):1-6- 2006
21. Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. Uitto J. *J. Inv Derm.* 1979 (72)1-10
22. A comparative study of aging of the elastic fiber system of the diaphragm and the rectus abdominis muscles in rats. C.J. Rodrigues,
23. Rodrigues Junior A.J. *Braz J Med Biol Res* 33(12) 1449-1454 2000
24. Molecular composition and pathology of enteses on the medial and lateral epicondyles of the humerus: a structural basis for epicondylitis. Milz S, Tisher T, Buettner A, Schieker M, Mair M, Redman S, Emery P, McGonagle D, Benjamin M. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 1015-1021
25. Adipose tissue at entheses: the innervation and cell composition of the retromalleolar fat associated with the rat Achilles tendon. Shaw HM, Santer RM, Watson ADH Benjamin M. *J Anat.* 211(4) 436-443