



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ."
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS:

“Reparación del daño articular en rodilla mediante implante de plasma rico en plaquetas y células movilizadas de médula ósea con G-CSF en un modelo canino”

Que para obtener el grado de maestría presenta:

MVZ. MARÍA GUADALUPE GUTIÉRREZ CANCINO

Director de tesis:

DC Sergio Gutiérrez Castellanos.

Co- director:

MC Ignacio Netzahualcóyotl Barajas López.

Morelia, Michoacán julio de 2012.

ÍNDICE

I.	Introducción	1
I.1.	Anatomía de la articulación de la rodilla	1
I.2.	Cartílago articular	3
I.3.	Artrosis	7
I.4.	Incidencia de la artrosis	10
I.5.	Tratamiento de la artrosis	11
I.5.1.	Tratamiento con analgésicos	11
I.5.2.	Tratamientos quirúrgicos convencionales	12
I.5.3.	Injerto de plasma rico en plaquetas en lesiones músculoesqueléticas	13
I.5.4.	Terapia de células mesenquimales	15
I.6.	Pruebas para diagnóstico de osteoartrosis	17
I.6.1.	Manifestaciones clínicas	17
I.6.2.	Rayos X	17
I.6.3.	Ultrasonido	18
II.	Materiales y Métodos	19
II.1.	abordaje quirúrgico de articulación femorotibial	20
II.2.	Grupo 1: plasma rico en plaquetas	20
II.3.	Grupo 2: células mesenquimales y mononucleares	21
II.4.	Grupo 3: grupo control	21
II.5.	Evaluación ultrasonográfica y radiográfica	22
II.6.	Evaluación de la masa muscular	22
II.7.	Evaluación del grado de dolor y grado de claudicación	22
II.8.	Análisis estadístico	22
III.	Resultados y discusión	25
III.1.	Grupo plasma rico en plaquetas	25
III.2.	Grupo células mononucleares y mesenquimales	28
III.3.	Grupo control	33
III.4.	Análisis estadístico	36
III.4.1.	Masa muscular	36
III.4.2.	Espacio articular	39
IV.	Conclusiones	42
V.	Bibliografía	46

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.	Número de plaquetas implantadas intrarticularmente a cada individuo	25
Cuadro 2.	Cantidad de leucocitos presentes en el implante intrarticular	28
Cuadro 3.	Medias para la masa muscular y el espacio articular	36
Cuadro 4.	Medias de interacción tratamiento/días en los tres grupos de perros	37
Cuadro 5.	Ecuaciones de predicción para la masa muscular en cada tratamiento (grupo)	38
Cuadro 6.	Análisis de varianza para la masa muscular y el espacio articular	40
Anexo 2.	Varianzas y covarianzas para la masa muscular entre los diferentes períodos	43
Anexo 3.	Correlación para la masa muscular entre los diferentes períodos	43
Figura 1.	Vista anterior, cara interna y externa de la articulación de la rodilla	2
Figura 2.	Articulación femorotibial derecha del perro	2
Figura 3.	Vista medio-lateral de la articulación femorotibial del perro	2
Figura 4.	Meniscos articulares	2
Figura 5.	Estructura del cartílago articular	4
Figura 6.	Esquema de la estructura de la molécula del colágeno	5
Figura 7.	Cambios de la articulación artrósica	7
Figura 8.	Factores de riesgo de la artrosis de rodilla	8
Figura 9.	Imágenes radiográficas de los 4 grados de artrosis, según escala de Kellgren y Lawrence	10
Figura 10.	Proyecciones radiográficas para la evaluación de articulación femorotibial en el perro	17

Figura 11.	Posiciones ultrasonográficas para la evaluación del cartílago articular	18
Figura 12.	Abordaje quirúrgico parapatelar	20
Figura 13.	Medición de la masa muscular	22
Figura 14.	Fotografía de la articulación patelar del perro 1 (grupo PRP)	27
Figura 15.	Imagen de la articulación patelar del perro 4 (grupo CMM)	31
Figura 16.	Fotografía de la articulación patelar del perro 5 (grupo CMM)	32
Figura 17.	Fotografía de la articulación patelar del perro 6 (grupo CMM)	32
Figura 18.	Fotografía de la articulación patelar del perro 7 (grupo control)	35
Figura 19.	Fotografía de la articulación patelar del perro 8 (grupo control)	36

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Grado de dolor en el grupo de plasma rico en plaquetas	25
Gráfica 2.	Grado de claudicación en el grupo de plasma rico en plaquetas	26
Gráfica 3.	Espacio articular lateral, expresado en milímetros, del grupo de plasma rico en plaquetas	26
Gráfica 4.	Valores de masa muscular, expresados en centímetros, en el grupo de plasma rico en plaquetas	27
Gráfica 5.	Grado de dolor en el grupo de células mononucleares y mesenquimales	29
Gráfica 6.	Grado de claudicación en el grupo células mononucleares y mesenquimales	30

Gráfica 7.	Espacio articular lateral, expresado en milímetros, del grupo de células mononucleares y mesenquimales	30
Gráfica 8.	Valores de masa muscular, expresados en centímetros, en el grupo de células mononucleares y mesenquimales	31
Gráfica 9.	Grado de claudicación en el grupo control	33
Gráfica 10.	Grado de dolor en el grupo control	33
Gráfica 11.	Espacio articular lateral, expresado en milímetros, del grupo control	34
Gráfica 12.	Valores de masa muscular, expresados en centímetros, en el grupo control	34
Gráfica 13.	Ilustración de la interacción tratamiento/días para la masa muscular	39
Gráfica 14.	Media de la interacción tratamiento x días de los 3 grupos de perros del estudio	40

I. INTRODUCCIÓN

El cartílago hialino (articular) es un tejido altamente especializado, avascular y depende de la difusión de nutrientes durante los periodos de carga cíclica. Las lesiones condrales causan una interrupción del suministro directo de sangre, lo que significa que las células progenitoras no pueden llegar a las regiones lesionadas, por lo que tampoco los condrocitos tendrán material para producir matriz y tratar de reparar el defecto en el cartílago articular. Estas lesiones articulares pueden extenderse y causar osteoartritis (Punwar y Khan, 2011). Se ha estimado que el 9% de la población en los EUA, mayores de 30 años padecen osteoartritis (Ahern y cols., 2008), semejante a algunos estudios realizados en México (Zurita y cols., 1998). Las técnicas de generación de tejidos sustitutos mediante el cultivo *in vitro*, para su subsecuente implantación *in vivo*, ofrece una nueva alternativa para la regeneración del daño articular; las células se toman del propio paciente, se cultivan y se reimplantan en el mismo donador (Lee y cols., 2003; Tuli y cols., 2003).

I.1. Anatomía de la articulación de la rodilla

La rodilla es la articulación más compleja del esqueleto humano y canino; en ella se unen tres huesos: el extremo distal del fémur, la porción proximal de la tibia y la rótula (humano) o patela (perro); soporta el peso del organismo en el despegue y la recepción de saltos (González, 2008). Las caras articulares se corresponden con los grandes cóndilos curvos del fémur, los cóndilos aplanados de la tibia y las caras articulares de la rótula. Las caras superiores de los cóndilos tibiales se articulan con los correspondientes cóndilos femorales (figs. 1 y 2) (González, 2008). La adaptación de los cóndilos del fémur a las cavidades glenoideas de la tibia está dada por un fibrocartílago periarticular en forma de semianillo, más grueso en la periferia que en el centro, llamados en conjunto meniscos (Fig. 1) (Sisson y Grossman, 2001; González, 2008).



Figura 1. Vista anterior, cara interna y cara externa de la articulación de la rodilla con extirpación de la rótula. En el interior de la articulación se encuentran los meniscos, los ligamentos cruzados y los cartílagos articulares (www.zonamedica.com.ar).

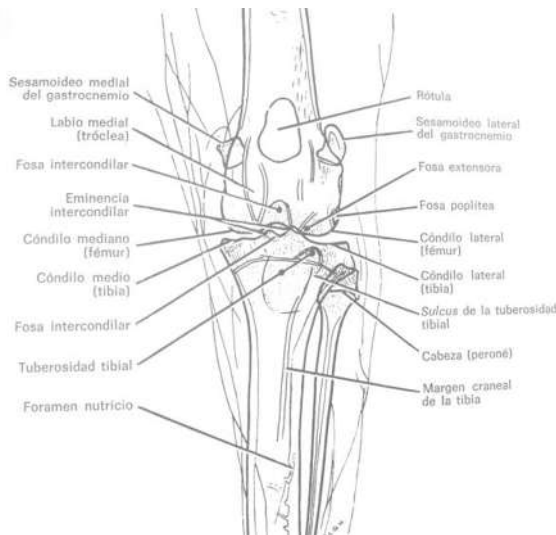


Figura 2. Articulación femorotibial derecha del perro (Sisson y Grossman, 2001).

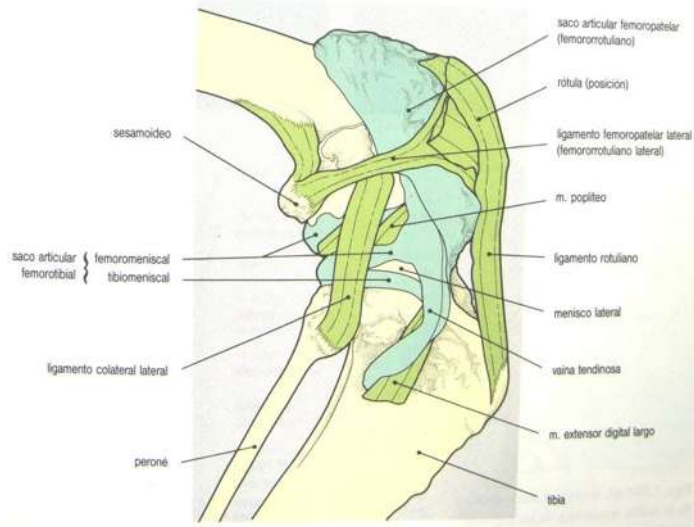


Figura 3. Vista medio-lateral de la articulación femorotibial del perro (Done y cols., 2002).

Los medios de unión de las estructuras de la articulación de la rodilla comprenden una cápsula articular, cuatro ligamentos periféricos (ligamento anterior o rotuliano, ligamento posterior, ligamento lateral externo y ligamento lateral interno) y dos cruzados (ligamento cruzado anterior y ligamento cruzado posterior) (Fig. 3) (González, 2008).

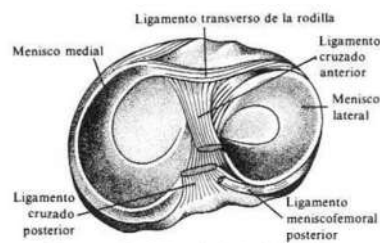


Figura 4. Meniscos articulares (González, 2008).

La cápsula sinovial o articular de la rodilla es la más amplia y complicada de todas, puede ser dividida en tres capas: 1) sinovial, 2) subsinovial y 3) fibrosa; el término cápsula articular se refiere también a la capa fibrosa. La capa más interna es la sinovial, que se encuentra formada por dos tipos de sinoviocitos; los de tipo A, que son macrófagos con función de fagocitosis y procesamiento de antígenos intraarticulares. Los sinoviocitos de tipo B son fibroblastos responsables de la producción de hialuronán y enzimas de degradación. La función de la capa sinovial es producir líquido sinovial, mismo que forma una delgada capa con poca capacidad de fricción, así como pliegues sinoviales (vellosidades), algunos de los cuales contienen nervios, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y adipocitos. La capa subsinovial contiene fibroblastos, está vascularizada y contiene terminaciones nerviosas; esta capa permite el movimiento de la sinovial y la fibrosa. La capa fibrosa es la más externa y contribuye a la estabilidad física de la articulación, está compuesta por tejido fibroso y elástico. Los meniscos son extensiones de la cápsula articular, cuya función es incrementar la estabilidad de la articulación (Santoscoy, 2008).

1.2. Cartílago articular

El cartílago hialino es un tejido hiperhidratado, avascular, aneural y alinfático, que permite el movimiento sin fricción de la articulación (Santoscoy, 2008); posee aspecto traslúcido brillante; tiene condrocitos embebidos en matriz extracelular, que constituye una cápsula, que en conjunto recibe el nombre de condrón (González, 2008; Santoscoy, 2008) (Fig. 6). Su desarrollo se ve afectado por fuerzas de carga mecánicas, que varían en los distintos sitios de la superficie articular (Turnhauit y cols., 2010).

La matriz extracelular está compuesta por colágeno, proteoglicanos y agua. El cartílago se nutre por medio de difusión, en forma primaria, a partir del líquido sinovial y de los vasos de las membranas sinoviales (Santoscoy, 2008).

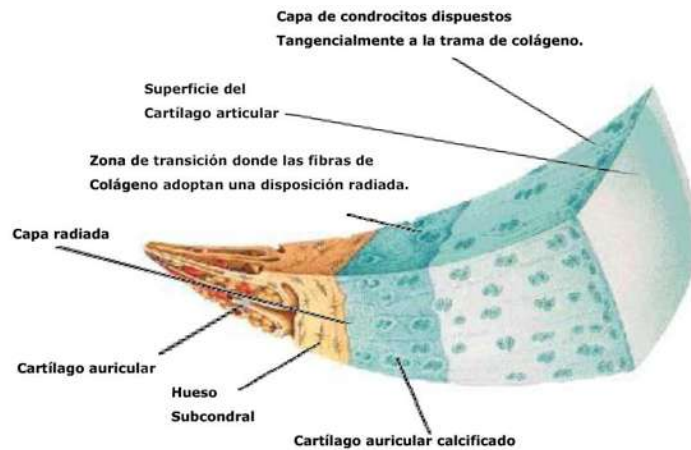


Figura 5. Estructura del cartílago articular (González, 2008)

El colágeno forma la estructura trabecular en la que están embebidos los condrocitos dentro del cartílago articular. Existen 28 tipos diferentes de colágeno, compuestos de al menos 46 cadenas de polipéptidos distintas. Las moléculas de colágeno están compuestas por una triple hélice, con orientación dextrógira, que contiene un centro de poliprolina II (Shoulders y Raines, 2009). Las fibras de colágeno forman parte del soporte estructural de la matriz. Están dispuestas en forma regular formando arcos, en los que su apuntamiento se dirige hacia la superficie del cartílago; las fibras de colágeno de la superficie son tangenciales y en la profundidad estas fibras son verticales; esta disposición le confiere gran resistencia las fuerzas mecánicas que tiene que soportar. El colágeno tipo II es el más abundante en el cartílago articular. También se pueden encontrar pequeñas cantidades de colágeno de tipos IV, IX, X y V/XI (González, 2008; Santoscoy, 2008).

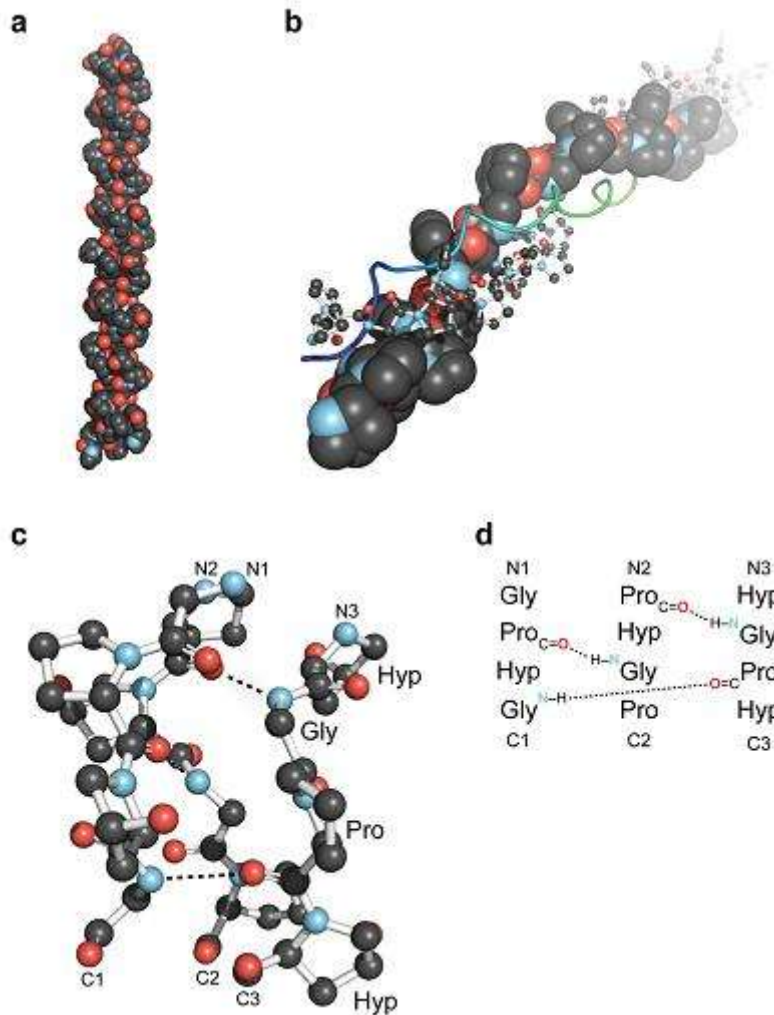


Figura 6. Esquema de la estructura de la molécula de colágeno. (a) Imagen de la ultraestructura de la triple hélice de colágeno formada a partir de (ProHypGly)₄–(ProHypAla)–(ProHypGly). (b) Vista axial de la triple hélice, representado en modelo de cinta, bolas y palillos y relleno espacial. (c) y (d) Esquema de bolas y palillos de un segmento de la triple hélice del colágeno, destacando la escalera formada por los puentes de hidrógeno. (Shoulders y Raines, 2009)

La estructura característica del colágeno articular consiste en una estructura de tres bandas paralelas de polipéptidos con orientación levógira y poliprolina tipo II (PPII) con conformación helicoidal, intercaladas para formar una triple hélice con orientación dextrógira. La estructura apretada de las hélices de PPII dentro de la triple hélice, origina que cada tercer residuo de Gly, resulte en una secuencia repetitiva XaaYaaGly,

donde Xaa y Yaa pueden ser cualquier aminoácido. Los aminoácidos en las posiciones Xaa y Yaa del colágeno son a menudo, (2-S)-prolina y (2S, 4R)-4-hidroxiprolina, respectivamente (Shoulders y Raines, 2009).

Los proteoglicanos comprenden la mayor parte de la matriz extracelular (22-38%), estos consisten en un eje de proteína unido a cadenas de glucosaminoglicanos. De estos últimos, los más abundantes en cartílago articular son el condroitín-6-sulfato, el condroitín-4-sulfato, el sulfato de queratán y el sulfato de dermatán. Por su estructura química los glucosaminoglicanos presentan carga negativa, lo que ocasiona que se repelan y se mantengan separados al estar unidos a un eje de proteínas, dando como resultado que la molécula ocupe más espacio, propiciando la retención de agua, que crea una presión de turgencia, la cual es parte integral de la función del cartílago articular. El grosor del cartílago dependerá de las fuerzas de compresión y la frecuencia de las mismas, aplicadas sobre este tejido. Cuando el cartílago sufre una descarga compresiva, el agua se mueve lento dentro de la matriz cartilaginosa, el líquido es desplazado fuera del cartílago hasta alcanzar un equilibrio entre la fuerza osmótica generada por los proteoglicanos y la fuerza compresiva, este movimiento de agua resulta en un escurrimiento de fluido hacia el espacio articular, lo que permite una lubricación hidrostática de la articulación. Las fuerzas de compresión estimulan, además, la liberación de factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I), proteína de médula ósea tipo 2 (BMP-2), proteína de médula ósea tipo 7 (BMP-7) y factor de crecimiento de fibroblastos tipo 18 (FGF-18), que incrementan la síntesis de colágeno y proteoglicanos (Jenniskens y cols., 2006).

Las células reconocen a las matrices de colágeno a través de unas proteínas transmembranales, conocidas como integrinas, específicamente los receptores de integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 1\beta 1$. Las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ se han asociado con rutas de unión de colágeno por los fibroblastos (Leah y cols., 2007). En el cartílago saludable, la matriz extracelular es continuamente renovada, consistiendo en un balance entre la degradación enzimática de los componentes de la matriz y la síntesis *de novo* por parte de los condrocitos (Jenniskens y cols., 2006). Las enzimas de la familia de las

metaloproteasas (MMPs), degradan la matriz, ya que son capaces de degradar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular incluyendo al colágeno (Jenniskens y cols., 2006). Este grupo de enzimas incluyen a la MMP-1, MMP-13 y MMP-14 (MTI-MMP). Estas enzimas se unen a las regiones de Ile-Gly y Leu-Gly de la región helicoidal de la molécula de colágena tipo I, originando fragmentos de $\frac{3}{4}$ y $\frac{1}{4}$ de molécula. La estructura helicoidal de la molécula de colágena hace difícil el acceso a la cadena; las enzimas en la matriz gelatinosa y la escisión de la molécula en fragmentos de $\frac{3}{4}$ y $\frac{1}{4}$ de la misma, hace que las MMP “recorran” efectivamente a la molécula de colágena, haciendo más fácil su degradación. En la remodelación del tejido adulto, la degradación del colágeno ocurre principalmente por una larga ruta intracelular poco conocida, donde los fragmentos de colágeno son rodeados por los fibroblastos, mediante interacciones con receptores. Los fragmentos de colágeno son encerrados en vesículas que contienen colagenasas, bajo condiciones ácidas provocadas por las catepsinas B,L,N y K (Lee y cols., 2006).

I.3. Artrosis

Moragues (2006), define a la artrosis como una artropatía degenerativa, inflamatoria, crónica, que involucra a todas las estructuras de la articulación (cartílago hialino, membrana sinovial, hueso subcondral y cápsula articular), debido a un trastorno en la regulación de la degradación y síntesis de la matriz extracelular del cartílago articular, donde el hueso subcondral y la membrana sinovial están también implicados en un proceso inflamatorio mediado por citocinas y factores de crecimiento que participan en el proceso de remodelación ósea y destrucción articular. Se caracteriza por una disminución del número de condrocitos por apoptosis, esto se debe a la activación de determinadas citocinas y a la acción del óxido nítrico (Fig. 7) (Miralles, 2007).

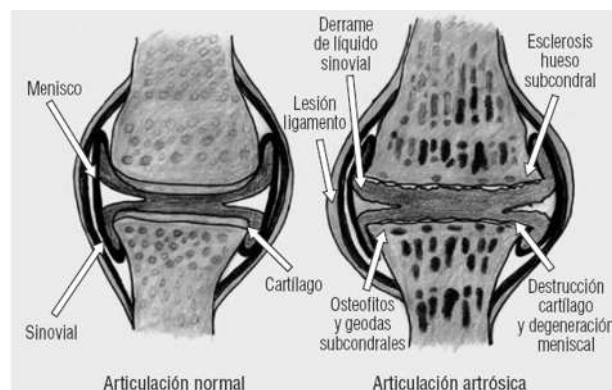


Figura 7. Cambios en la articulación artrósica (Moragues, 2006).

La etiopatogenia de la artrosis es multifactorial, en la que sobre una base bioquímica actúan factores biomecánicos. Se inicia siempre con una digestión enzimática de la matriz del cartílago hialino, por una alteración de la regulación enzimática entre una citosina destructora (IL-1) y otra reparadora (TGF- β) (Miralles, 2007). El comienzo de esta enfermedad se produce con una alteración en la composición bioquímica del cartílago articular. El colágeno puede permanecer estable en estas fases iniciales, pero la estructura comienza a desorganizarse y debilitarse. Se produce un incremento en el contenido hídrico de la matriz del cartílago, asociado, sin embargo, a una reducción de los proteoglicanos hidrofílicos que lo componen. La incidencia de la artrosis aumenta con la edad; el 10% de la población mayor de 60 años sufre una incapacidad funcional severa con marcada repercusión sobre su calidad de vida (figura 8) (Schwinghammer, 2000).

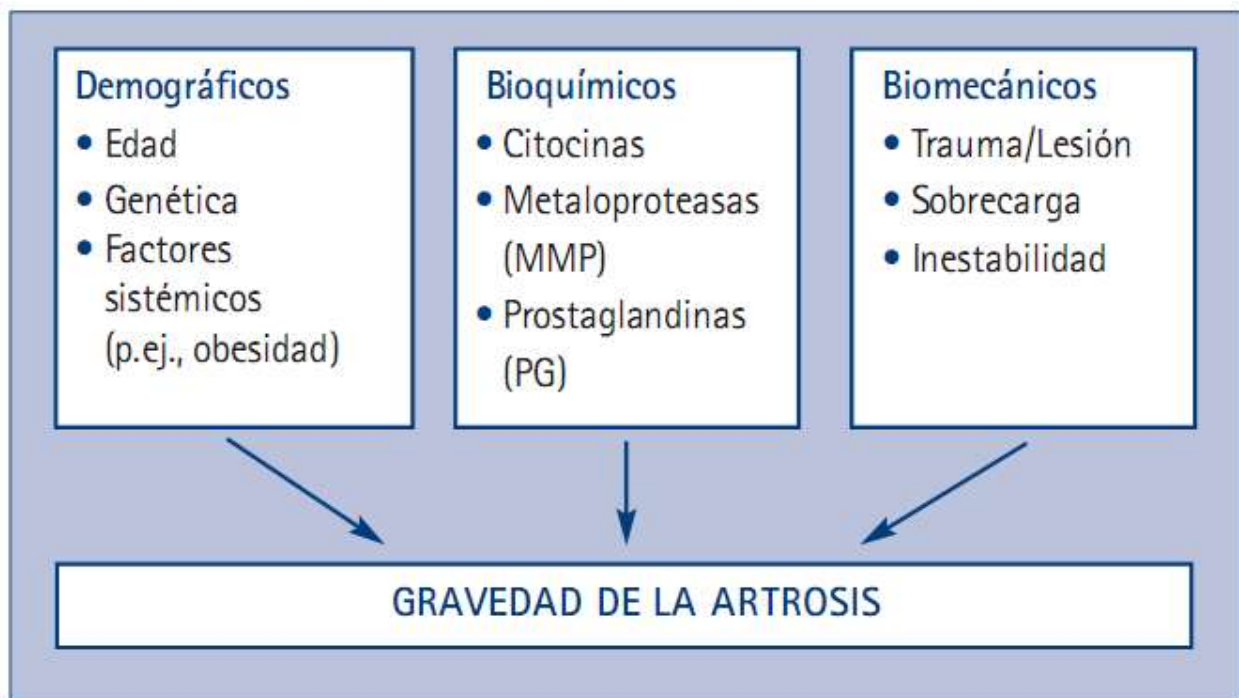


Figura 8. Factores de riesgo de la artrosis de rodilla (Altman, 2008).

Cuando la estructura del cartílago comienza a fragilizarse, los pequeños traumatismos o sobrecarga de la vida diaria actúan con más amplitud y laminan su capa superficial (velvetización) de fibras horizontales que permitan el deslizamiento, haciendo que los factores mecánicos provoquen desprendimiento de cartílago, dejando zonas desprovistas del sistema amortiguador y de deslizamiento (úlceras), que llegan hasta el hueso subcondral, causando la eburnización (Miralles, 2007).

Para contrarrestar esto el hueso subcondral prolifera, se vuelve más esclerótico y más susceptible a las microfracturas. El hueso pierde elasticidad y la capacidad para absorber los choques, acompañado de un aumento de la vascularidad y la presión venosa intraósea. La continua destrucción del cartílago produce una exposición del hueso subcondral, el cual choca contra el hueso de la superficie de la articulación adyacente y se produce una erosión (Durán y cols, s/f).

La proliferación del hueso subcondral está acompañada de una hipertrofia de todos los tejidos blandos (ligamentos, tendones, músculos) en la articulación en un intento fisiológico de reparar el daño producido. Sin embargo, el resultado es una articulación deformada, limitaciones en la movilidad y dolor.

Existe una clasificación para el grado de artrosis, creada en 1956 por J.H. Kellgren y J.S. Lawrence. La escala se basa en los hallazgos radiográficos encontrados en estos pacientes, se incluye:

- La formación de osteofitos en los márgenes articulares
- Aspecto de huesecillos periarticulares
- Disminución del cartílago articular, asociado a esclerosis del hueso subcondral
- Presencia de pseudoquistes con paredes escleróticas, formados en hueso subcondral
- Alteraciones en la morfológicas en los bordes epifisarios

Tomando en cuenta los hallazgos anteriores, Kellgren y Lawrence (1956), clasificaron la artrosis en cinco grados (figura 9):

0. Sin signos radiográficos sugerentes de artrosis
1. Dudoso: aparente estrechamiento del espacio articular
2. Mínimo: osteofitos definidos, estrechamiento claro del espacio articular
3. Moderado: osteofitos múltiples, disminución definitiva del espacio articular, presencia de esclerosis y deformación de los bordes epifisarios
4. Severo: gran cantidad de osteofitos, disminución definitiva del espacio articular, esclerosis severa, graves deformaciones de los bordes epifisarios.

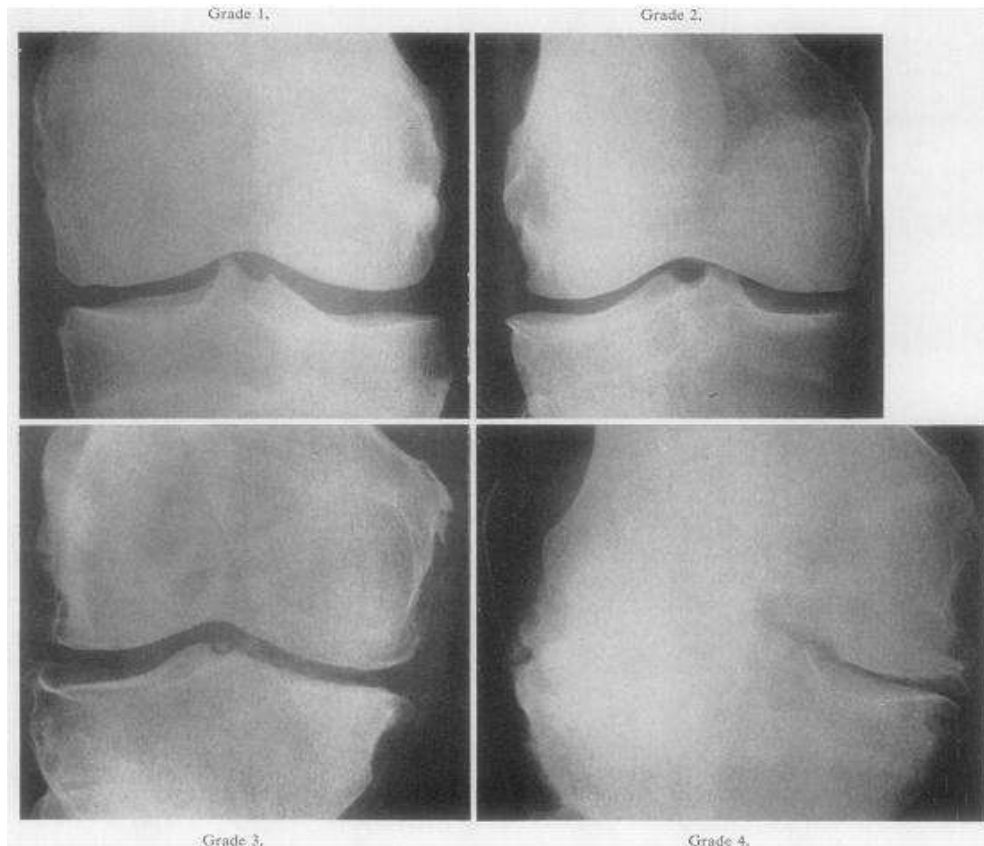


Figura 9. Imágenes radiográficas de los 4 grados de artrosis según la escala de Kellgren y Lawrence (1956)

I.4. Incidencia de la artrosis

En un estudio realizado por De Pavia y cols. (2005), en el Consultorio de Ortopedia de la Clínica Hospital del ISSSTE de Irapuato, México, se observó que el 14.8% de todas las consultas del servicio de ortopedia fueron por osteoartrosis, habiendo mayor

prevalencia en pacientes del sexo femenino (73% del total); la articulación afectada con mayor frecuencia (57.6%) fue la rodilla. Se observó, además, que antes de los 50 años de edad los hombres tienen una alta prevalencia en presentación de osteoartrosis, pero después de los 50 años de edad, el riesgo de gonartrosis y coxartrosis aumenta en la mujer. En otro estudio realizado por Rico (2007), en el Hospital Escandón, de la delegación Tacubaya, en el D.F., México, 77% de pacientes con gonartrosis fueron mujeres, y sólo el 23% eran varones. En el reporte sobre los factores de presión sobre el gasto médico del IMSS en 2010, la artrosis constituyó el tercer motivo de consulta, con 568,543 pacientes, lo que significó el 3.3% del total de las consultas. A nivel mundial, la osteoartrosis es la cuarta causa de morbilidad en la mujer mayor de 60 años, y la octava en el hombre de 50 a 59 años (Jordan y cols., 1995; Reginster, 2002). Además de su repercusión en la salud pública, la osteoartrosis supone elevados costos sanitarios, en E.U.A supera los 60 billones de dólares anuales (Monfort, 2006).

I.5. Tratamiento de la artrosis

Los principales objetivos del tratamiento de la osteoartrosis son:

- Alivio del dolor y malestar; reducción de la inflamación y minimización de la incapacidad funcional.
- Retardo en la progresión del daño, modificando la estructura del cartílago y minimizando la pérdida de espacio articular.
- Minimizar efectos secundarios, con el tratamiento adoptado (Gurt, 2006).

I.5.1. Tratamiento con analgésicos

El uso de fármacos incluye el empleo de analgésicos, coadyudantes y fármacos de acción sintomática lenta. La herramienta más útil para el uso de estos medicamentos es la escalera analgésica de la OMS, que consiste en la utilización escalonada de fármacos, de acuerdo a la intensidad del dolor y la respuesta del paciente. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), constituyen el primer escalón, poseen acción analgésica y antiinflamatoria, pero éstas se encuentran limitadas por su techo analgésico, efectos secundarios e interacciones farmacológicas. Los fármacos del

grupo de analgésicos opioides constituyen el segundo y tercer escalón de la escalera analgésica; tienen acción a nivel de receptores en sistema nervioso central (SNC), bloqueando el dolor; presentan limitaciones ya que los efectos dados por estos, dependen de la dosis administrada, además de poder causar dependencia y adicción. El cuarto escalón, está constituido por la administración de opioides de acción potente vía espinal, combinados con la realización de un procedimiento quirúrgico encaminado a eliminar definitivamente el dolor (Joern y cols., 2010).

1.5.2. Tratamientos quirúrgicos convencionales de la artrosis

En una fase inicial está indicada la artroscopía para realizar un lavado y desbridamiento, para eliminar detritus cartilaginosos y enzimas líticas. La mejoría es temporal (6 meses a 4 años) (Miralles, 2007). La extracción de proteoglicanos y agregados celulares de la superficie de cartílago dañado, puede promover la movilización y adhesión de factores celulares antiinflamatorios, pero no hay evidencia biológica que indique el inicio de la reparación del daño articular (Hunziker, 2002).

Otro procedimiento, cuya aplicación va en desuso, es el rasurado condral guiado por artroscopía; consiste en la remoción de tejido condral morbosos utilizando instrumentos quirúrgicos especiales. Supone que la remoción de este tejido disminuirá la posible fricción y promoverá la regeneración del tejido retirado. Sin embargo, experimentos en conejos no han revelado evidencia de reparación luego de 12 semanas de la intervención, más aún, el cartílago remanente se degenera con el tiempo, ello se ha atribuido a procesos apoptóticos (Hunziker, 2002).

La debridación articular, un procedimiento más drástico que el rasurado condral, combina la técnica anterior con el lavado, menisectomía, la remoción de fragmentos de articulación libres y una escisión limitada de osteofitos. En experimentos con animales se ha observado que el conjunto de procedimientos, conduce a apoptosis celular, transformación de tejido esquelético normal en tejido neoplásico y exacerbamiento de la osteoartrosis (Furl y cols., 2000; Hunziker, 2002).

La condroplastía con láser puede ser utilizada como alternativa de tratamiento quirúrgico para remover tejido mediante cortes. Una de las ventajas del empleo del láser es la cauterización del tejido, sin la intervención de elementos metálicos en la articulación. Sin embargo, la alta temperatura emitida sobre el tejido articular puede conducir a la no reparación del daño (Furl y cols., 2000).

Otra técnica de reparación de tejido articular es la condroplastía por ablación. Ésta consiste en ingresar quirúrgicamente a la médula ósea y compartimientos vecinos, induciendo un sangrado en el hueso subcondral, que conducirá a la formación de un coágulo de sangre, que ayudará a la formación de fibras del tipo cartilaginoso y la reparación del daño articular. Los resultados van a depender de diversos factores, como la edad, nivel de actividad física, severidad de la osteoartrosis y estadio de las lesiones. (Palau, 2006).

La osteotomía proximal de la tibia está encaminada a promover la reparación del tejido articular, eliminando el dolor causado por la osteoartrosis, así como corregir el alineamiento de los componentes de la articulación de la rodilla. Se utiliza en combinación con la condroplastía por ablación o el rasuramiento condral; cuando se utiliza sola el fin es alinear casos de deformación severa por mal contacto en los componentes de la articulación. Los resultados de estas intervenciones duran de 10-15 años, y a partir de ahí comienzan a deteriorarse (Palau, 2006).

Otro recurso quirúrgico utilizado es la artrodesis, la cual consiste en la fijación de una articulación cuando ésta está destruida y no puede ser reparada o sustituida por una prótesis; anula el movimiento articular, el dolor y las posibles inestabilidades (Palau, 2006).

1.5.3. Injerto de plasma rico en plaquetas en lesiones músculoesqueléticas

Las plaquetas son pequeñas células discoidales originadas en la médula ósea, con una vida media de 7-10 días. Contienen glicógeno, lisosomas y dos tipos de gránulos. Los

gránulos α contienen factores de coagulación y crecimiento, eventualmente liberados en el proceso de regeneración, además de participar en la interacción plaquetaria. El otro tipo de gránulos, los gránulos densos contienen Ca^{2+} , fósforo inorgánico, 60% del ADP intraplaquetario y serotonina (Martínez y Quintana, 2008). Además de participar en la coagulación, las plaquetas liberan sustancias y proteínas bioactivas responsables de la atracción de macrófagos, células mesenquimales y osteoblastos, los cuales promueven la remoción de tejido necrótico y a la regeneración de tejidos (Akeda y cols., 2006).

El plasma rico en plaquetas (PRP) ha sido definido por Sampson y Gerhardt (2008) como un volumen fraccional de plasma, de sangre autóloga, cuyo contenido de plaquetas es por lo menos 4 veces por encima de lo normal; su uso puede disminuir la inflamación, la pérdida de sangre, infecciones, requerimientos de narcóticos, promover la osteogénesis y la regeneración de tejidos blandos y heridas. Los factores de crecimiento contenidos en el PRP alcanzan concentraciones 10-12 veces más altas que el plasma común, por ello es utilizado como una fuente autóloga de dichos factores en la reparación de hueso y tejidos blandos. Los factores de crecimiento más abundantes en el PRP son TGF- β (factor de crecimiento transformante- β), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF (factor de crecimiento epidermoide) e IGF-1 (factor de crecimiento insulínico-1); todos ellos inducen cambios en la proliferación celular y la síntesis de matriz en una gran variedad de tejidos conectivos (Akeda y cols., 2006).

Tomando esto en cuenta, se ha introducido el uso de las plaquetas en la regeneración de tejido en lesiones crónicas como estimulantes para la liberación de factores de crecimiento. Varios autores han señalado que la implantación de plasma rico en plaquetas durante el período transquirúrgico, en artroplastias y reconstrucción de ligamentos en articulación de la rodilla disminuyó el dolor, así como el tiempo de recuperación y la incidencia de infecciones, además de aumentar el rango de movimiento articular (Sampson y Gerhardt, 2008).

Existen dos formas de utilización del PRP, la forma “activada” y la “inactivada”. La forma activada requiere el uso de trombina y calcio, que son agregados al PRP para activar a las plaquetas y producir un coágulo que contiene los factores de crecimiento liberados por las plaquetas. La forma inactivada, se refiere a la utilización del PRP fresco, sin agregar trombina o calcio, o cualquier otro factor que induzca la activación plaquetaria.

Akeda y cols. (2006) fueron los primeros en utilizar el PRP “activado”, como fuente de factores de crecimiento en cultivos celulares de condrocitos provenientes de cerdo. Dichos autores observaron que la adición de PRP a dichos cultivos promovía y aumentaba la síntesis de colágeno II. Por otro lado, Mishra y cols. (2009), agregaron PRP inactivado (fresco) a cultivos de células mesenquimales, observando un aumento en la proliferación celular (10% mayor que el cultivo control), además del aumento en la expresión génica y marcadores celulares para diferenciación hacia condrocitos (niveles de unidad18S del mRNA de Sox-9, 29.74 contra 2.29 en cultivo control), así como un aumento en el nivel de síntesis de agreganos (21.04, contra 1.93 en cultivo control). Clínicamente, el PRP ha mostrado disminuir el dolor e incrementar la funcionalidad de la articulación en pacientes con tendinitis crónica. También ha sido utilizado como tratamiento en fascitis plantar, fusión espinal y en artroplastia total de rodilla, variando en todos el resultado final (Mishra y cols., 2009).

1.5.4. Terapia con células mesenquimales

Durante el desarrollo, las células madre mesenquimales se originan de la cresta neural, migran, se diferencian y participan en la morfogénesis de estructuras como el cartílago, hueso, ligamentos, músculos, tendones, y otros tejidos. No pueden dividirse indefinidamente y se diferencian generalmente solamente en tipos celulares maduros de tejidos finos de los cuales se originan, o para las cuales son designadas (multipotencialidad). En los adultos, las células mesenquimales son células madre no hematopoyéticas que dan origen a hueso cartílago y tejido adiposo, entre otros. Estas líneas celulares se caracterizan por su habilidad para adherirse a superficies plásticas y por la expresión de antígenos de superficie específicos, que permiten su identificación *in vitro* (Mao y cols., 2006). La médula ósea es una fuente aceptada de varios linajes

celulares de células madre hematopoyéticas y mesenquimales, en organismos adultos. En la médula ósea las células mesenquimales representan sólo del 0.001 al 0.01% del total de las células nucleadas (Hwang y cols., 2009). Koga y cols. (2008) y Hwang y cols. (2009) establecen que las células mesenquimales son una fuente de células atractiva, para la regeneración de cartílago, ya que pueden obtenerse mediante métodos mínimamente invasivos, ser fácilmente aisladas y expandidas, y su multipotencialidad incluye la condrogénesis. Estos mismos autores realizaron implantes heterólogos de estas células en lesiones articulares originadas quirúrgicamente, en articulación patelar de conejos, obteniendo como resultado la adhesión de las mismas en los defectos articulares y una diferencia significativa en cuanto a regeneración de cartílago articular, comparados con el grupo control.

En un estudio realizado por Kassis y cols. (2006), se utilizó factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) para producir y movilizar células mesenquimales, en sangre de donadores sanos. La utilización del G-CSF permitió elevar el número de células de la fracción mononuclear, para su posterior implantación intraarticular en la rodilla. El G-CSF, permite la extracción de células mesenquimales de sangre periférica, sin la necesidad de puncionar médula ósea para obtener un gran número de éstas por muestra.

Las células mesenquimales también se utilizan en combinación con PRP como tratamiento para osteoartrosis. Haleem y cols. (2010), colocaron células mesenquimales de médula ósea, expandidas *in vitro* y combinadas con PRP, en defectos condrales en rodillas de 5 individuos; la totalidad de ellos mostró mejoría significativa en cuanto a dolor, rango de movilidad y hallazgos radiográficos, luego del tratamiento.

Los hallazgos de los diversos autores muestran la capacidad de las células mesenquimales provenientes de médula ósea, para diferenciarse en líneas condrocitarias, que contribuyen a la mejoría en lesiones articulares en rodilla.

I.6. Pruebas de diagnóstico para la osteoartritis (OA)

El diagnóstico de osteoartritis se realiza por métodos clínicos y de imagenología.

I.6.1. Manifestaciones clínicas

La evaluación clínica involucra grado de dolor, de movimiento y presencia de crepitaciones en la articulación. La exploración física tiene el objetivo de observar la anatomía de la articulación y la presencia/ausencia de los hallazgos antes mencionados al realizar movimientos en ella. En la gonartrosis (artrosis de rodilla) generalmente existe dolor a la flexión y crépito femorrotuliano; en fases avanzadas de la enfermedad existirá limitación acusada a la flexión y desplazamiento lateral de la rótula, deformidad en varo, valgo o flexo y atrofia del músculo cuádriceps.

I.6.2. Rayos X

Esta técnica de imagen proporciona estimación indirecta de la degeneración del cartílago, expresada como disminución del espacio articular, esclerosis, presencia de osteofitos y quistes subcondrales y anquilosis. Constituye una técnica óptima para evaluar la participación del hueso subcondral en el proceso de artrosis. La limitación de esta técnica está dada porque los hallazgos sugerentes de degeneración articular se observan, por lo general, en las fases tardías de la patología.

Los estudios radiográficos son utilizados como herramienta de diagnóstico en la medicina humana y veterinaria; siendo las proyecciones antero-posterior (A-P) para los humanos, y cráneo-cauda (Cr-Cd) para perros, así como medio-lateral (M-L) para ambas especies, las de más utilidad.

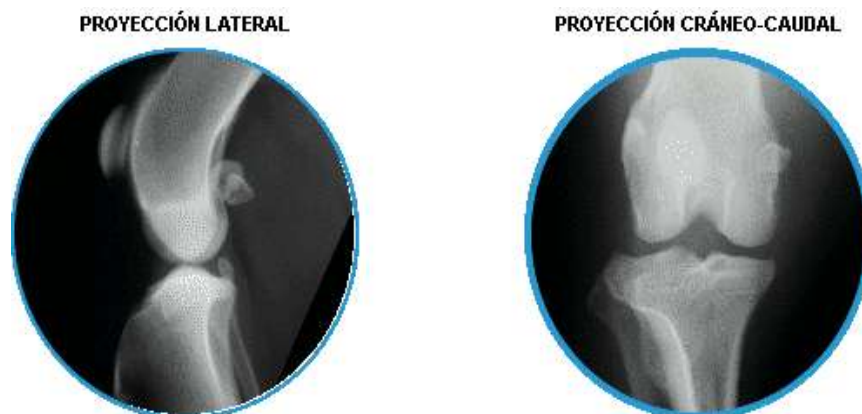


Figura 10. Proyecciones radiográficas para la evaluación de la articulación femorotibial en el perro

El análisis radiográfico de la rodilla, debe utilizarse en conjunto con la evaluación de la movilidad articular, la limitación funcional y el grado de atrofia muscular.

1.6.3. Ultrasonido

Esta técnica proporciona imágenes en tiempo real, permite la visualización de tejidos blandos y líneas de crecimiento óseo (Friedman y cols., 2001). Las posiciones para la evaluación de cartílago articular se muestran en la figura 11.



Figura 11. Posiciones sagital-lateral, -sagital-media y sagital-medial del transductor de ultrasonido, para evaluación de cartílago articular.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación se realizó en la Clínica Veterinaria para perros y gatos de la Universidad Michoacana, y en las instalaciones del edificio de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, durante el período comprendido de septiembre de 2010 a agosto de 2011. El análisis histopatológico de las muestras tomadas al final del estudio se realizó en el Laboratorio de Histopatología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue de tipo experimental, longitudinal y prospectivo. Se siguieron los lineamientos marcados en las normas oficiales mexicanas NOM-062-ZOO-1999 sobre Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, NOM-033-ZOO-1995 Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres, y NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico-infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.

Se utilizaron ocho perros criollos (unidades experimentales) de entre 1.5-3 años de edad, de 13-20 kg de peso corporal, 4 hembras y 4 machos, clínicamente sanos, sin patologías en articulación femorotibial. Los animales que enfermaron, sistémica o localmente (articulación femorotibial), luego de ser intervenidos quirúrgicamente o una vez administrado el tratamiento intrarticular, fueron excluidos del estudio.

Las unidades experimentales se mantuvieron alojadas en jaulas individuales de 3 m², en las instalaciones de la Clínica Veterinaria de la Universidad Michoacana (CVUM). Se aseó, vacunó y desparasitó a cada uno de ellos. En un período de 4 semanas se condicionó a los animales para el manejo clínico. Se realizó un examen físico completo, y se obtuvieron muestras de sangre, para evaluar su estado de salud general. Se tomaron placas radiográficas (en sus proyecciones cráneo-caudal y medio-lateral) y prueba de ultrasonido de articulaciones femorotibiales (rotulianas), de ambos miembros pélvicos, para evaluar su integridad. Una vez comprobado que las unidades

experimentales eran aptas para ser incluidas en el estudio, fueron asignadas aleatoriamente en 3 grupos de tratamientos: 1) grupo control (2 individuos), 2) grupo de plasma rico en plaquetas (3 individuos) y 3) grupo de células mesenquimales (3 individuos).

II.1. Abordaje quirúrgico de articulación femorotibial: Los perros fueron atropinizados (0.04mg/kg SC), para luego ser anestesiados, utilizando como preanestésicos hidrocloreuro de romifidina (400µg/kg IV), buprenorfina (0.02mg/kg IV) y propofol (4mg/kg IV); éste último como inductor de anestesia, para después continuarse ésta con isoflourano. Para el abordaje quirúrgico, se tricotomizó el área y se realizó antisepsia de la misma. El procedimiento fue el señalado por Piermattei (1993), para el abordaje parapatelar lateral (Figura 12). Una vez expuesta la superficie articular de los cóndilos y corredera troclear lateral se retiró la totalidad del cartílago articular del cóndilo lateral en la rodilla derecha, la profundidad de la lesión abarcó hasta el hueso subcondral.

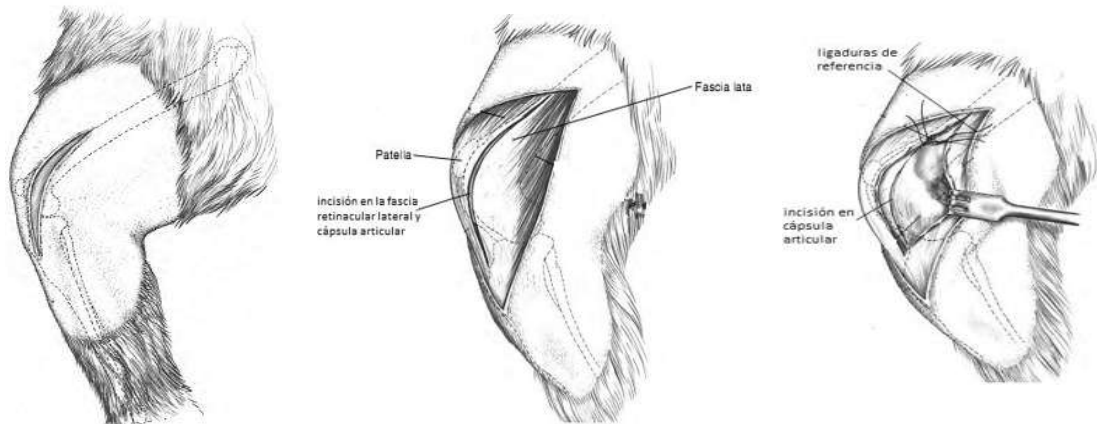


Figura 12. Abordaje quirúrgico parapatelar (Piermateii,1993)

II.2. Grupo 1 (Grupo plasma rico en plaquetas –PRP-). Una vez expuesta la superficie articular de los cóndilos y corredera troclear se retiró la totalidad del cartílago articular del cóndilo lateral, abarcando hasta el hueso subcondral. A los 28 días luego del procedimiento quirúrgico, se les extrajeron 60 ml de sangre periférica utilizando una jeringa de 50 ml con aguja calibre 18G que contenía solución anticoagulante de ácido cítrico-dextrosa (ACD), a relación 1.5ml por cada 10ml de sangre. Se centrifugó a

2000rpm durante 10 minutos para separar el paquete rojo (eritrocitos y leucocitos) de las plaquetas. Se extrajo el plasma con plaquetas utilizando una aguja calibre 17G, colocándolo en un nuevo tubo para ser centrifugado a 3000rpm durante 10 minutos para generar el concentrado plaquetario. Se desechó el plasma sin plaquetas, dejándose 1.9ml de plasma rico en plaquetas. El concentrado plaquetario se mezcló con agarosa al 0.6% y se implantó en la articulación previamente dañada de los perros, bajo anestesia general. La articulación fue inmovilizada aplicándose vendaje de Robert-Jones durante 8 días. En dicho intervalo se realizarán movimientos suaves de flexión y extensión de la articulación de la rodilla, diariamente, durante 10 minutos, 3 veces por día. A los días 30, 60 y 90 luego de la implantación autóloga de plasma rico en plaquetas, se les tomaron placas de rayos X y ultrasonido, para evaluar la regeneración del daño articular. Se midió el espacio en la articulación femorotibial. Al día 90 se realizó una toma de muestra de cartílago articular para análisis histopatológico.

II.3. Grupo 2. (Grupo células mesenquimales y mononucleares –CMM-). A los 25 días posteriores al procedimiento quirúrgico de daño articular, se administró a cada individuo de este grupo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a dosis de 5µg/kg vía SC, durante 4 días consecutivos (Hammond y cols., 1991). Al cuarto día, se les extrajeron 60 ml de sangre y se separaron las células mononucleares por el método de Ficoll- Paque™ PREMIUM. Las células mononucleares y mesenquimales (CMM) se concentraron en 1.9ml de plasma y se mezclaron con 0.6ml de agarosa al 0.6% para ser implantadas en la articulación previamente dañada, bajo anestesia general. La articulación fue inmovilizada, rehabilitada, evaluada y biopsiada como en el grupo 1.

II.4. Grupo 3. (Grupo control). A los 28 días luego del procedimiento quirúrgico de daño articular, se extrajeron 5ml de sangre periférica de cada perro, utilizando una jeringa previamente cargada con ACD (relación 10:1.5ml). La muestra fue centrifugada a 3500rpm/10 minutos para obtener un plasma sin elementos celulares. Se mezclaron 1.9ml de plasma con 0.6ml de agarosa para ser implantado en la articulación previamente dañada, bajo anestesia general. La articulación fue inmovilizada, rehabilitada, evaluada y biopsiada, como se mencionó en el grupo 1.

II.5. Evaluación ultrasonográfica y radiográfica. Se realizó ultrasonido de articulación femorotibial (rodilla) derecha de cada perro, utilizando un transductor lineal de 7.5 MHz (Aloka UST-55120), para evaluar el grosor del cartílago y la superficie articular. Para la evaluación radiográfica se utilizó un equipo de rayos X (Philips MCD100) , tomándose las proyecciones cráneo-caudal (Cr-Cd) y medio-lateral (M-L) de la articulación antes mencionada, para evaluar el espacio articular (EA) y hallazgos radiográficos sugerentes de cambios en la articulación. El EA se expresó en milímetros (mm), y fue medido en los puntos laterales distales del fémur y la tibia (cóndilos laterales) utilizando un vernier (Scala® INOX 222).

II.6. Evaluación de la masa muscular (MM). La masa muscular se evaluó utilizando una cinta métrica. Se midió siempre en la base de la circunferencia del miembro pélvico dañado, tomando como referencia el trocánter del fémur, a 2/3 distalmente de éste. Fue evaluada basalmente en el miembro pélvico derecho, y luego cada 15 días después de la administración del tratamiento correspondiente en cada grupo. El resultado obtenido se expresó en centímetros (cm).



Figura 13. Medición de la masa muscular

II.7. Evaluación del grado de dolor y de claudicación. Para evaluar el grado de dolor se utilizó la escala de dolor de Melbourne y Glasgow modificada (Hellier, 2002) (Anexo 1). El grado de claudicación se evaluó de acuerdo con los signos clínicos establecidos en la escala utilizada por Santoscoy (2008).

II.8. Análisis estadístico. Para la evaluación estadística los momentos del trabajo experimental se dividieron como sigue:

- día 0:daño articular.
- día 30: administración del tratamiento (Tx) correspondiente a cada grupo.
- día 60: 30 días después de administrado el tratamiento.

- día 90: 60 días luego de administrado el tratamiento.
- día 120: 90 días luego de administrado el tratamiento, último día del trabajo experimental y toma de biopsia.

Las variables dependientes fueron la masa muscular y el espacio articular. El modelo matemático para el análisis de la MM y el EA fue el correspondiente a un diseño en parcelas divididas en el tiempo (Montgomery, 2001):

$$Y_{ijr} = \mu + \tau_i + \alpha(\tau)_{j:i} + \beta_k + (\tau\beta)_{ik} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijr} = es la variable de interés medida en el $k^{\text{ésimo}}$ período, sobre la $j^{\text{ésima}}$ unidad experimental, asignado el $i^{\text{ésimo}}$ tratamiento

μ = constante común en todas las observaciones (media general)

τ_i = efecto del $i^{\text{ésimo}}$ tratamiento

$\alpha(\tau)_{j:i}$: efecto de la $i^{\text{ésima}}$ unidad experimental anidado en el $j^{\text{ésimo}}$ tratamiento.

β_k : efecto del $k^{\text{ésimo}}$ período

$(\tau\beta)_{ik}$: efecto de la interacción entre el $i^{\text{ésimo}}$ tratamiento en el $k^{\text{ésimo}}$ período

E_{ijk} : efecto de los factores no controlados en el experimento en el $k^{\text{ésimo}}$ período sobre el $j^{\text{ésimo}}$ unidad experimental, asignada al $i^{\text{ésimo}}$ tratamiento

En el modelo anterior se considera que τ_i , β_k y $(\tau\beta)_{ik}$ son efectos fijos, mientras que $\alpha(\tau)_{j:i}$ es un efecto aleatorio.

Debido a que los animales fueron medidos en 5 períodos de tiempo (día 0 –daño articular-, día 30, día 60, día90 y día120 –pos tratamiento-), desde 0 a 120 días con una separación de 30 días para el análisis de este experimento se utilizó el procedimiento MIXED del Sistema de Análisis Estadístico (SAS), siguiendo los lineamientos señalados por Littell y cols. (1998). Se modeló la mejor estructura de covarianza en la matriz de errores basados en el Criterio de Información de Akaike (AIC), con la finalidad de comparar los efectos con el error típico apropiado (Littell y cols., 1996).

Los análisis posteriores al análisis de la varianza, se realizaron por medio de comparaciones de los tratamientos 1 y 2 contra el testigo (grupo 3), en el caso de que la interacción no fuera significativa.

Para el caso en que la interacción fue significativa los análisis fueron por contrastes por polinomios ortogonales (Montgomery, 2001), fijando tratamientos y analizando el efecto polinomial hasta un máximo del término cuadrático en cada variable, dependiendo de la significancia del término de grado mayor se obtuvieron las ecuaciones de predicción correspondientes.

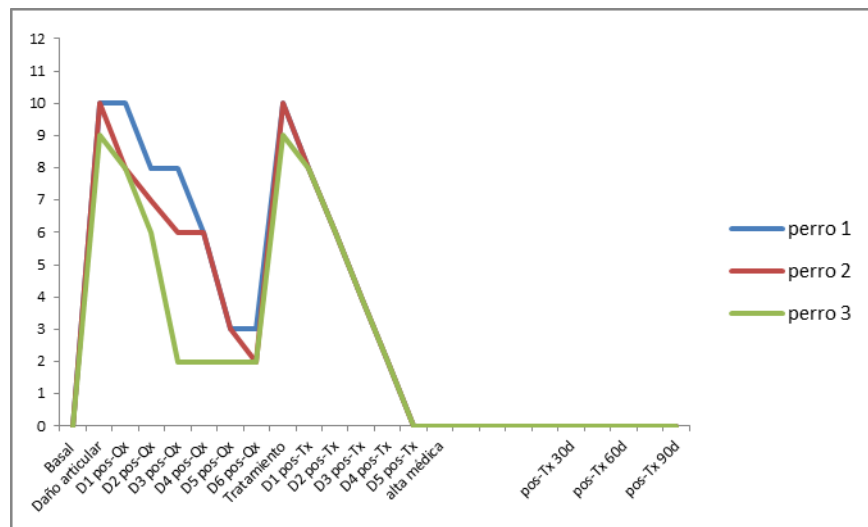
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Grupo plasma rico en plaquetas (PRP). En el cuadro 1 se muestra la cantidad de plaquetas implantadas en cada individuo perteneciente a este grupo.

Cuadro 1. Número de plaquetas trasplantadas intraarticularmente a cada individuo

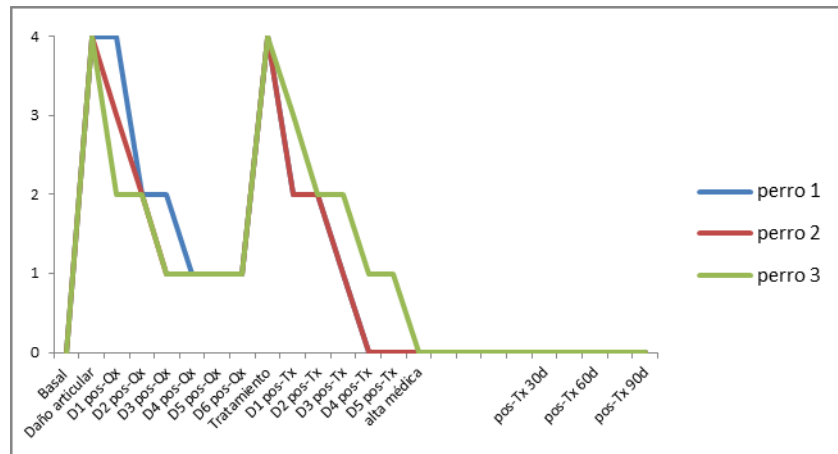
Identificación del ejemplar	Número de plaquetas/ml (PRP)	Número de plaquetas en sangre periférica ($10^9/L$)
1	1 540 000	184
2	2 350 000	335
3	850 000	210

Se observó que el grado de dolor disminuyó a 0 (normal) hacia el día 5 en los perros 1, 2 y 3, luego de la aplicación del PRP, manteniéndose así hasta el final del estudio (gráfica 1).



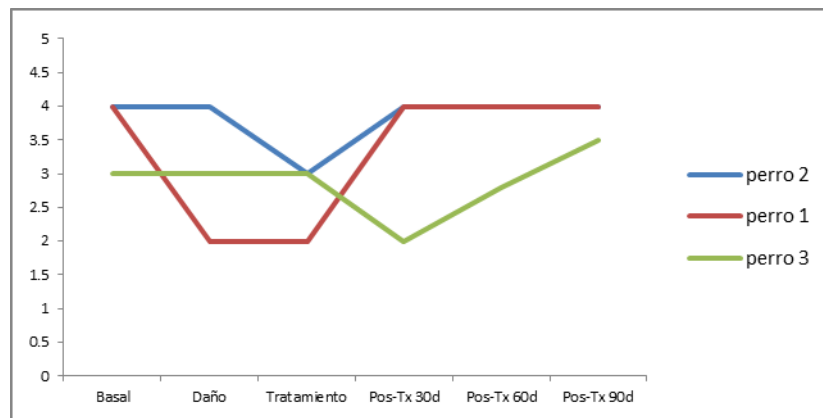
Gráfica 1. Grado de dolor en el grupo de PRP

El grado de claudicación disminuyó a 0 (normal) a los 4, 4 y 5 días luego del tratamiento con PRP, en los perros 1, 2 y 3, respectivamente, y se mantuvo en dicho valor hasta el final del estudio (Gráfica 2).



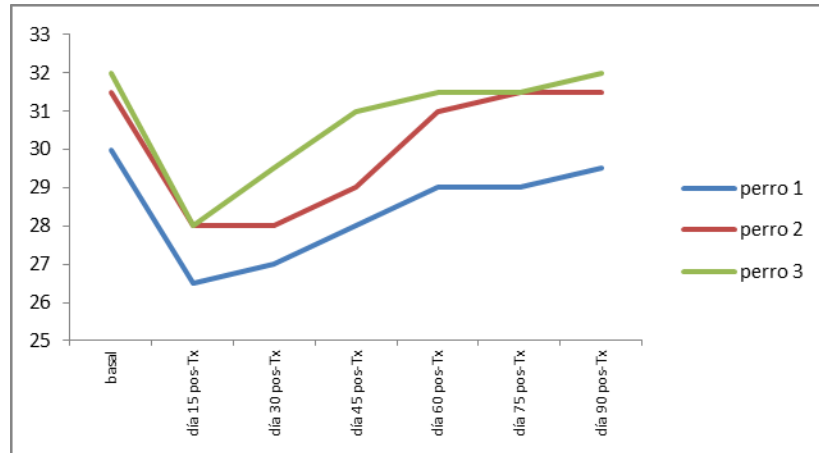
Gráfica 2. Grado de claudicación en el grupo PRP

La medición del espacio articular (lateral), mostró una reducción luego de causar el daño articular quirúrgicamente, aumentando su valor gradualmente, en los 3 perros de este grupo, luego de la administración del PRP (Gráfica 3).



Gráfica 3. Espacio articular lateral, expresado en milímetros, del grupo PRP

La masa muscular mostró una disminución después del daño articular originado en los tres individuos de este grupo, tendiendo a aumentar al día 22 luego del tratamiento intraarticular con PRP. Los perros 2 y 3 alcanzaron el valor basal, hacia el día 90 luego de la administración del tratamiento con PRP, sin embargo el perro 1 no alcanzó el valor basal hacia el final de la fase experimental (Gráfica 4).



Gráfica 4. Valores de masa muscular, en centímetros, en el grupo PRP

Al día 90, luego del implante de PRP, se procedió a la toma de biopsia de la superficie del cóndilo lateral. En el perro 1, macroscópicamente se observó aparente neoformación de cartílago sobre cóndilo lateral, con bordes lisos y delimitados; no se observó presencia del gel de agarosa ni de tejido fibroso en ninguna capa (fig. 14).

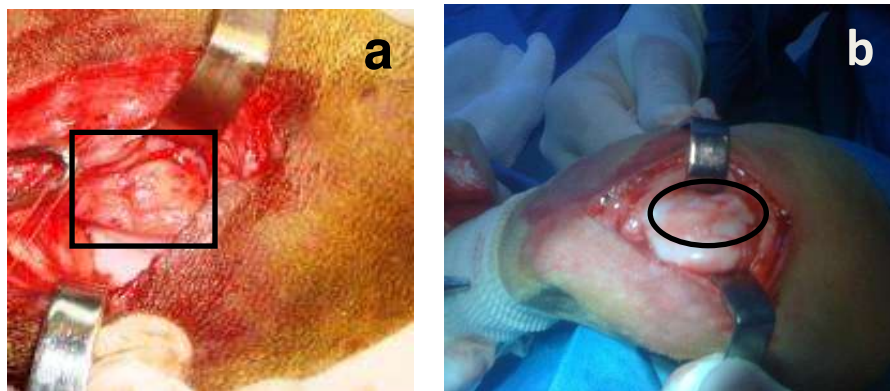


Figura 14. **a:** Fotografía de la articulación patelar del perro uno (grupo PRP), que muestra el cóndilo femoral al día 28 luego del daño articular (rectángulo); no hay signos de regeneración de cartílago articular. **b:** Misma articulación que en **a** mostrándose 90 días luego del tratamiento con PRP; se observa presencia de tejido en neoformación (círculo), sugerente de cartílago sobre la superficie articular.

En el perro 2 se observó aparente cartílago en neoformación, con bordes del cóndilo lisos y delimitados, con presencia de tejido fibroso en tejido subcutáneo.

En el perro 3, se observó una superficie lisa con aparente cartílago en neoformación, con presencia de gran número de vasos capilares, bordes irregulares, exostosis y presencia de osteofito en región proximal de cóndilo lateral, así como tejido fibroso en tejido subcutáneo; no se observó presencia del gel de agarosa.

Los resultados mostraron que la adición de un implante de plasma rico en plaquetas, combinado con agarosa al 0.6%, tuvo un efecto macroscópico de regeneración significativo, disminuyendo el grado de dolor pocos días después de realizado el implante, ya que puede suprimir la liberación de citocinas, lo que disminuye el grado de inflamación y de dolor en el sitio de aplicación (Lacci, 2010).

III.2. Grupo Células Mononucleares y Mesenquimales (CMM). En el cuadro 2 se señalan las cantidades de leucocitos presentes en el implante intraarticular de cada individuo perteneciente a este grupo.

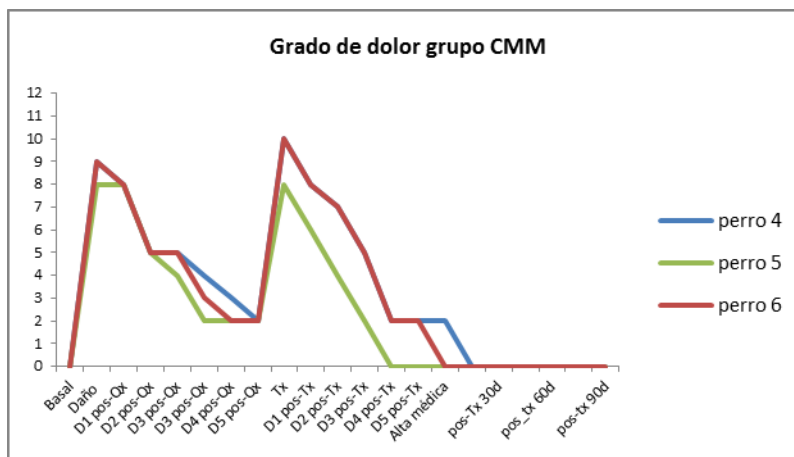
Cuadro 2. Cantidad de leucocitos presentes en el implante intraarticular

	Células	Perro 4	Perro 5	Perro 6
Implante (10⁹/L)	<i>L e u t o t</i>	27	72	56.92
	<i>M o n o n u</i>	82.3	97	45.53
	<i>P o l i m o r</i>	17.7	3	11.4
	<i>P l a q u e</i>	1280	1339	1086

Se observó que al separar las células mononucleares con el método de Ficoll, gran cantidad de plaquetas eran “arrastradas” junto con estas células (Cuadro2), dicha variable no se pudo controlar. El contenido de plaquetas en los implantes de CMM, pudo influir en el grado de regeneración tisular en este grupo de perros.

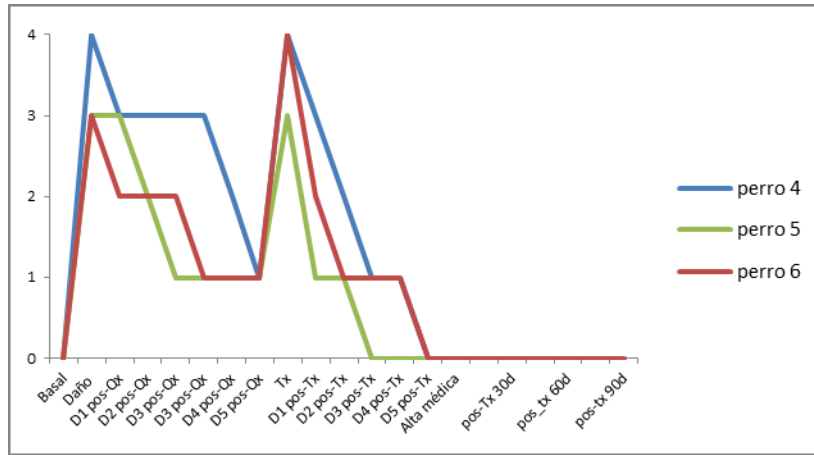
En un estudio realizado por Mishra y cols. (2009), donde se cultivaron *in vitro* células mesenquimales obtenidas de sangre periférica, previa estimulación con G-CSF de los donadores para que éstas fueran movilizadas hacia la circulación periférica, se observó un incremento en la producción de marcadores celulares de diferenciación condrogénica al agregar PRP fresco a estos cultivos, así como un aumento en la proliferación celular, misma que también fue atribuida al uso de PRP, ya que éste contiene factores de crecimiento que estimulan la proliferación y la diferenciación celular.

En los perros de este grupo se observó una disminución en el grado de dolor, hasta el valor 0 (normal), hacia los días 7, 9 y 5 en los perros 6, 4 y 5, respectivamente (gráfica 5).



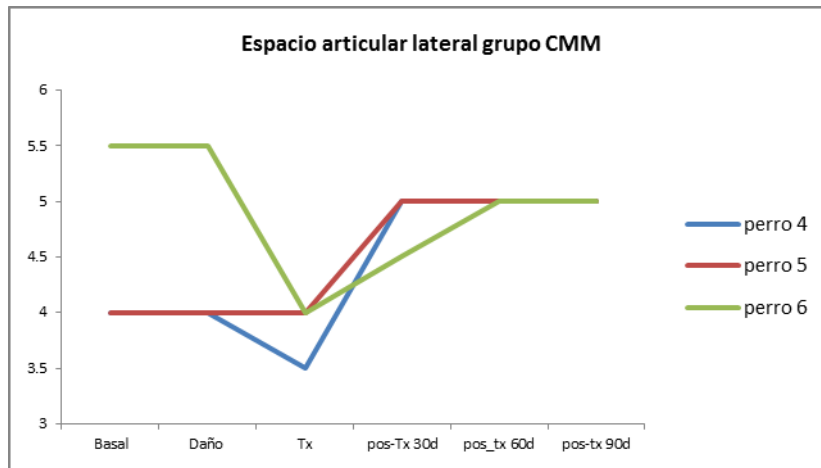
Gráfica 5. Grado de dolor en el grupo de CMM

El grado de claudicación disminuyó a 0 (normal) al día 6 en los perros 6 y 4, y al día 4 en el perro 5 (gráfica 6).



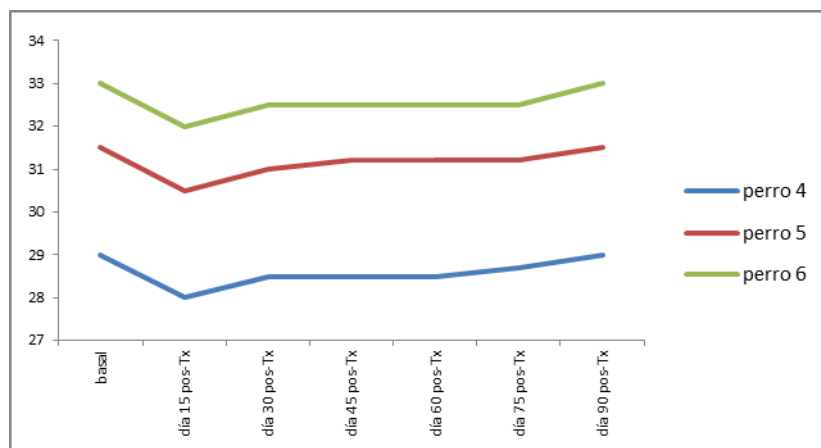
Gráfica 6. Grado de claudicación en el grupo CMM

En los tres ejemplares de este grupo se observó una disminución en el espacio articular (lateral) luego de la cirugía de daño quirúrgico, aumentando sus valores luego del implante de células mononucleares (gráfica 7).



Gráfica 7. Espacio articular lateral, expresado en milímetros, del grupo CMM

La masa muscular disminuyó luego del daño articular, aumentando gradualmente hacia el día 23, en todos los individuos de este grupo, logrando alcanzar el valor basal hacia el día 90 luego del tratamiento intraarticular con CMM (gráfica 8).



Gráfica 8. Valores de masa muscular, expresada en centímetros, en el grupo CMM

Al día 90, luego de la administración intraarticular de células mononucleares, se procedió a tomar muestra para biopsia en los tres perros. En el perro 4, se encontró cartílago cubriendo la superficie del cóndilo femoral previamente dañado; este tejido tenía distribución irregular, con presencia de abundante líquido articular de apariencia normal, y tejido fibroso en cápsula articular (fig. 15).

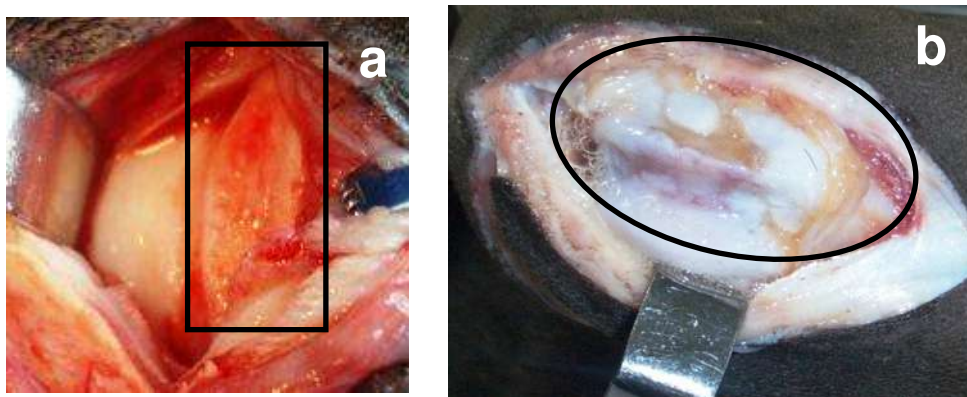


Figura 15. **a:** Imagen de la articulación patelar del perro 4 (grupo CMM) mostrando el cóndilo femoral 28 días después del daño quirúrgico (rectángulo), no hay signos de regeneración articular. **b:** Misma región que en **a** luego de 90 días del tratamiento con células mononucleares y mesenquimales, se observan regiones cubiertas con tejido en regeneración, sugerente de cartílago articular.

En el perro 5, se observó aparente cartílago en formación, cubriendo la totalidad del cóndilo femoral; la superficie del mismo se mostró lisa, con bordes definidos y presencia de abundante líquido articular, de apariencia normal (fig. 16).

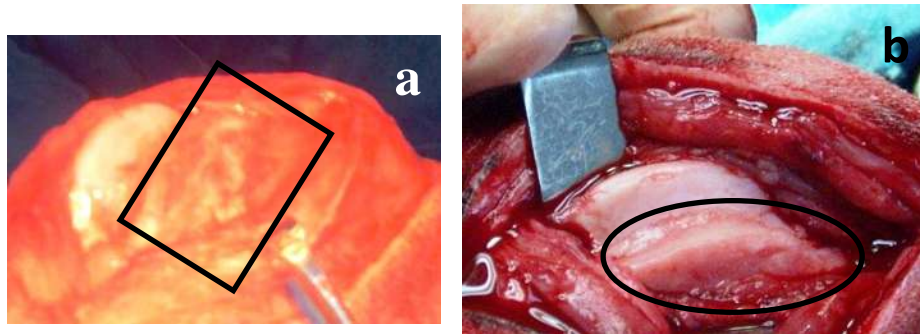


Figura 16. **a:** Fotografía de la articulación patelar del perro 5, mostrando el cóndilo femoral luego de 28 días del daño articular, no hay signos de regeneración de tejido en superficie articular. **b:** Misma región que en **a** 90 días luego del tratamiento con células mononucleares y mesenquimales, se observa una capa de tejido liso de aparente cartílago en neoformación y gran cantidad de capilares cubriendo a esta.

Macroscópicamente, la superficie del cóndilo femoral previamente dañado del perro 6, se observó lisa, cubierta de cartílago, con bordes definidos y regulares, así como presencia de abundante líquido articular de apariencia normal (fig. 17). En ninguno de los individuos de este grupo se observó presencia del gel de agarosa, sugiriendo que éste fue degradado y absorbido.

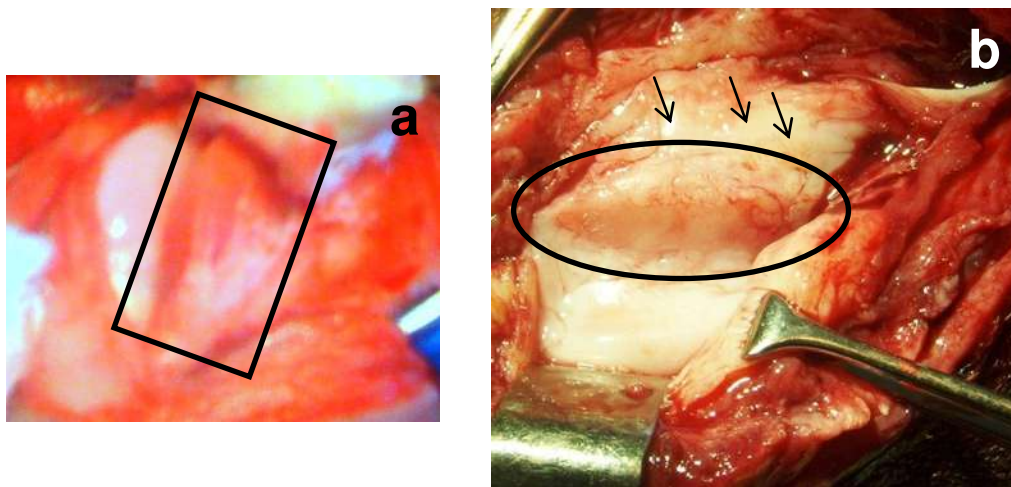
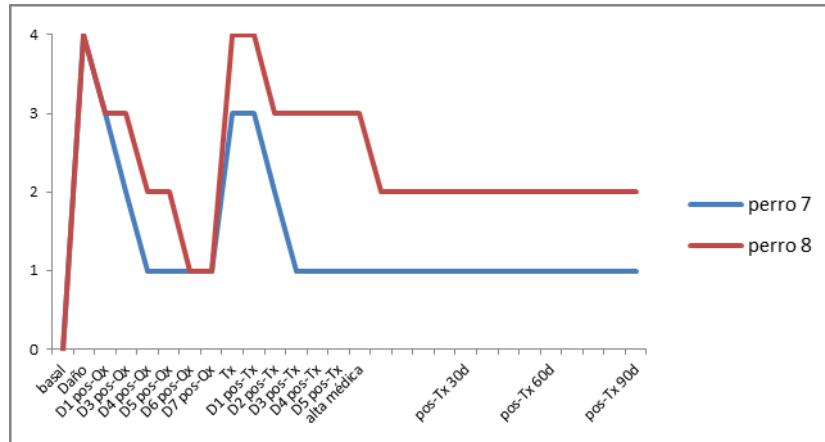


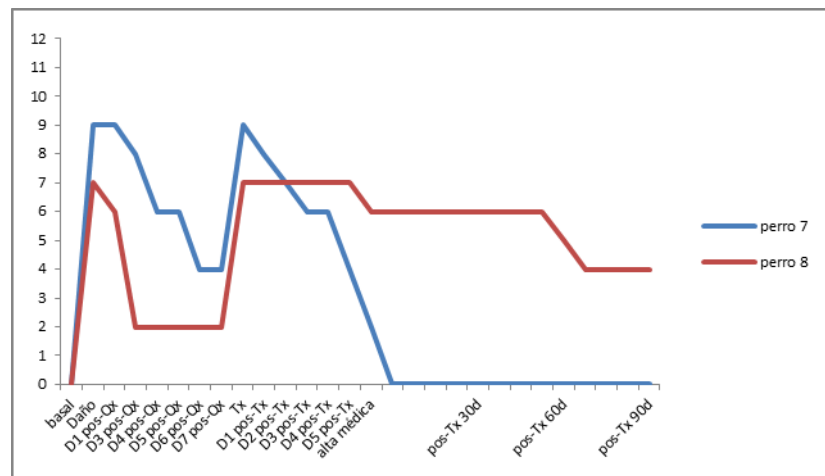
Figura 17. **a:** Fotografía de la articulación patelar del perro 6, mostrando el cóndilo femoral luego de 28 días del daño articular (rectángulo), no hay signos de regeneración de cartílago articular. **b:** Misma región que en **a** 90 días luego del tratamiento con células mononucleares y mesenquimales, se observa tejido en neoformación, sugerente de cartílago, cubriendo la superficie articular dañada, así como gran cantidad de capilares en la superficie de dicha zona.

III.3. Grupo control. El grado de claudicación en los individuos del grupo control, disminuyó de 4 (máximo) a 1 al día 3 y 7, -para el perro 7 y el perro 8, respectivamente, luego del trasplante de plasma con agarosa, sin alcanzar el valor 0 (basal) durante el estudio (gráfica 9).



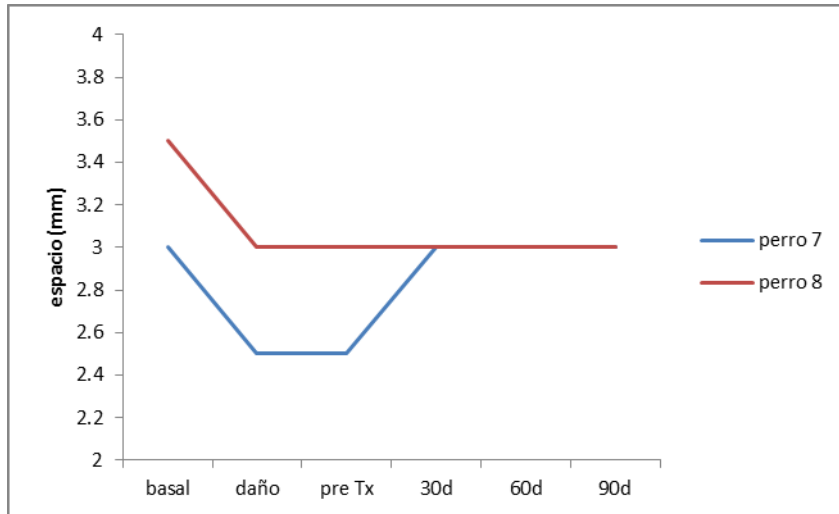
Gráfica 9. Grado de claudicación en el grupo control

El grado de dolor disminuyó de 9 a 2 en seis días, alcanzando el valor 0 al día 7 en el perro 7, luego del trasplante de plasma con agarosa. En el perro 8 el grado de dolor se mantuvo en 7 durante 7 días, disminuyendo hasta el valor 4 al día 45 luego del tratamiento con agarosa y plasma (gráfica 10).



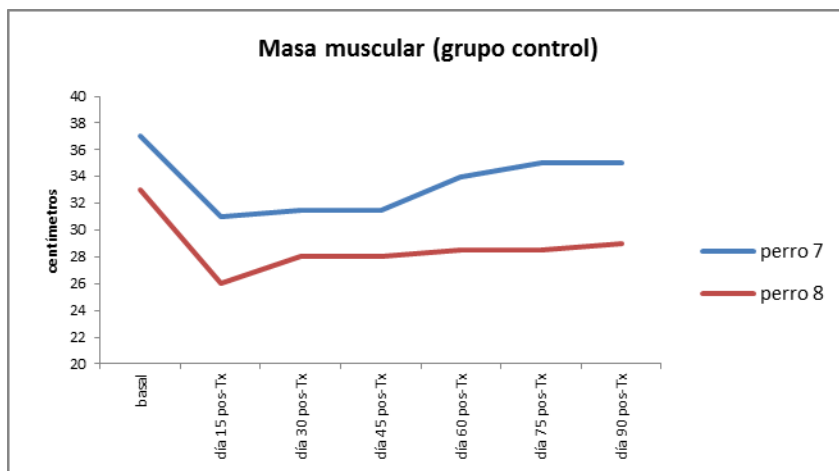
Gráfica 10. Grado de dolor en el grupo control

Se observó disminución del espacio articular en ambos individuos de este grupo, luego de la cirugía de daño articular, observándose un aumento del mismo en el perro 7 al día 30, mismo que alcanzó el valor basal. En perro 8 el espacio articular se mantuvo disminuido hasta el final del estudio (gráfica 11)



Gráfica 11. Espacio articular lateral, expresado en milímetros, del grupo control

La masa muscular mostró una disminución luego del daño articular generado, tendiendo a aumentar hacia el día 30 en el perro 8 y hacia el día 45 en el perro 7. Sin embargo, en ambos individuos de este grupo, no se alcanzó el valor basal al final del estudio (gráfica 12).



Gráfica 12. Valores de masa muscular, expresada en centímetros, en el grupo control

Al día 90, luego de la aplicación del implante intraarticular de plasma con agarosa, se procedió a la toma de muestra para biopsia en ambos perros de este grupo.

En el perro 7, macroscópicamente se observó presencia de tejido fibroso en cápsula articular y tejido subcutáneo, así como exostosis en la región proximal del cóndilo femoral lateral y presencia de poco líquido sinovial. No se observaron signos sugerentes de regeneración en superficie articular (fig. 18).

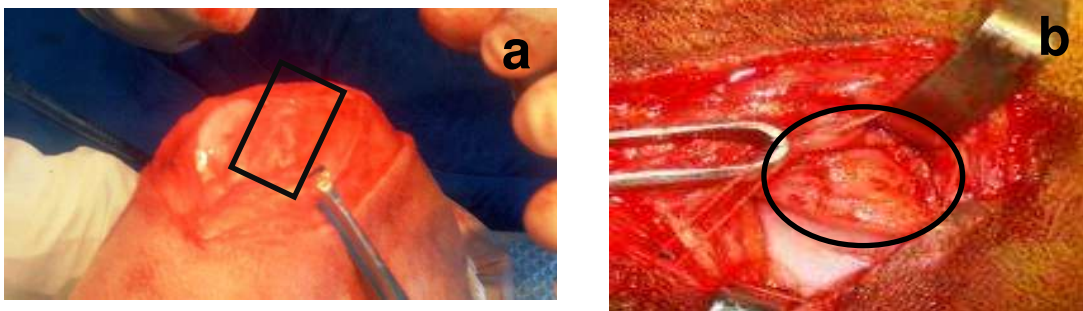


Figura 18. **a**: Fotografía de la articulación patelar del perro 7 (grupo control), que muestra el cóndilo femoral al día 28 luego del daño articular (rectángulo); no hay signos de regeneración de cartílago articular. **b**: Misma articulación que en **a** mostrándose 90 días luego del tratamiento con plasma y agarosa; se observa presencia de tejido fibroso sobre superficie articular y cápsula sinovial(círculo).

En el perro 8, se observó abundante tejido fibroso en cápsula articular y cóndilo femoral lateral, así como exostosis en la región proximal de esta misma zona; el líquido sinovial era escaso y de apariencia irregular (color amarillo-ocre). No se observaron hallazgos sugerentes de regeneración en superficie articular (fig 19).

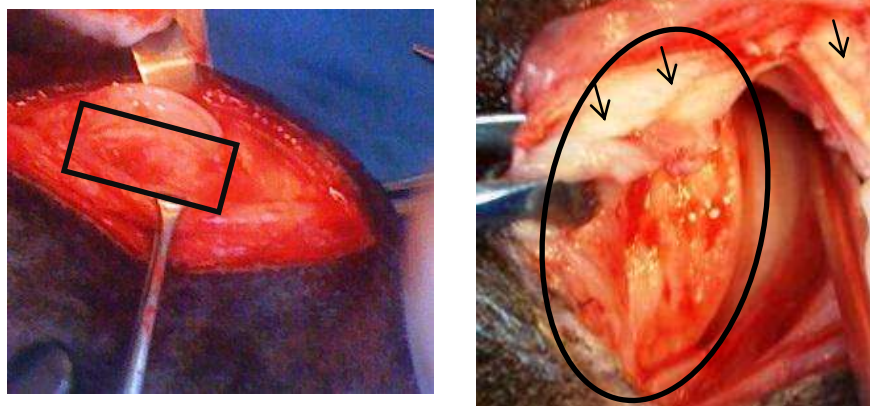


Figura 19. **a:** Fotografía de la articulación patelar del perro 8 (grupo control), mostrando el cóndilo femoral al día 28 luego del daño articular (rectángulo); no hay signos de regeneración de cartílago articular. **b:** Misma articulación que en **a** mostrándose 90 días luego del tratamiento con plasma y agarosa; macroscópicamente no hay signos de regeneración articular(círculo); se observa presencia de tejido fibroso sobre superficie articular y cápsula sinovial (flechas).

III.4. Análisis estadístico

III.4.1. Masa muscular.

Se observaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), para los días y la interacción tratamiento x día, no observándose diferencias entre tratamientos ($P > 0.01$) (Cuadro 3). Se observaron efectos significativos por períodos, así como en la interacción tratamiento por períodos ($P < 0.01$). El efecto entre tratamientos no resultó significativo ($P > 0.01$) (Anexo 2).

Las medias para la masa muscular y el espacio articular se presentan en el cuadro 5. Se observó que el promedio de los tratamientos 1 y 2 son inferiores a los del grupo control, sin embargo la comparación estadística no mostró diferencias entre ellos (cuadro 3).

Cuadro 3. Medias para la masa muscular y el espacio articular

TRATAMIENTO	MASA MUSCULAR		ESPACIO ARTICULAR	
	\bar{X}	<i>E.T</i>	\bar{X}	<i>E.T</i>
1	29,50 ^a	1,29	3,29 ^a	0.20.
2	30,83 ^a	1,29	4,53 ^b	0.20
3	32,10 ^a	1,58	2.90 ^a	0.25

^{a y b}= diferencias estadísticas (p<0.05)

Las medias de la interacción tratamiento/días se presentan en el cuadro 4. Siendo el tiempo un factor cuantitativo, se realizaron los contrastes ortogonales para establecer las ecuaciones de predicción (cuadro 5), observándose un comportamiento cuadrático en los tres tratamientos (P<0.05) (cuadro 6).

Cuadro 4. Medias de interacción tratamiento/días en los tres grupos de perros: 1. Plasma rico en plaquetas, 2. Células mononucleares y mesenquimales, 3. Control.

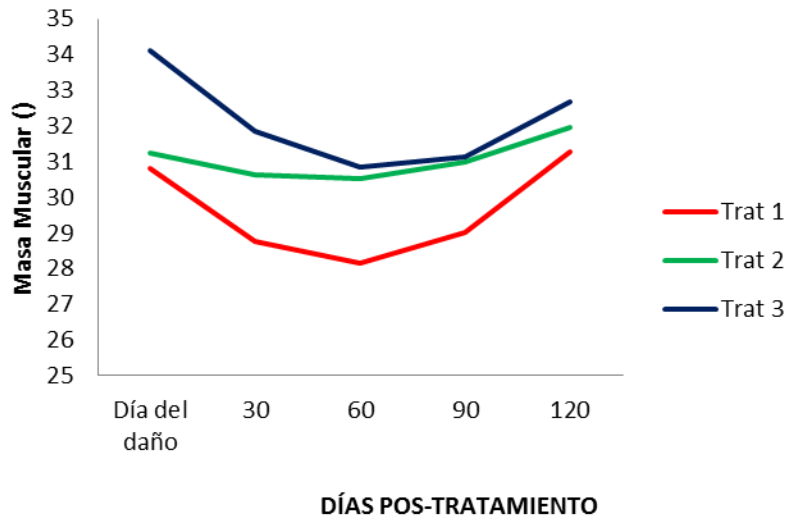
TRATAMIENTO	PERÍODO	MASA MUSCULAR		ESPACIO ARTICULAR	
		\bar{X}	ET	\bar{X}	ET
1	0	31,35	1.34	3,60	0,32
1	30	27,50	1.34	2,62	0,32
1	60	28,67	1.34	3,83	0,32
1	90	29,33	1.34	3,60	0,32
1	120	30,67	1.34	3,83	0,32
2	0	31,50	1.34	4,00	0,32
2	30	30,00	1.34	3,83	0,32
2	60	30,67	1.34	4,83	0,32

2	90	30,83	1.34	5,00	0,32
2	120	31,16	1.34	5,00	0,32
3	0	35,00	1.64	2,75	0,39
3	30	29,75	1.64	2,75	0,39
3	60	31,75	1.64	2,75	0,39
3	90	32,00	1.64	2,75	0,39
3	120	32,00	1.64	3,50	0,39

Las ecuaciones de predicción se presentan en el cuadro 5 y se ilustran con la gráfica 13.

Cuadro 5. Ecuaciones de predicción para la masa muscular en cada tratamiento.

TRATAMIENTO	ECUACIÓN DE PREDICCIÓN
1	$\hat{y} = 30,80 - 0,092 \text{ días} + 0,0008 \text{ días}^2$
2	$\hat{y} = 31,25 - 0,030 \text{ días} + 0,0003 \text{ días}^2$
3	$\hat{y} = 34,10 - 0,096 \text{ días} + 0,0007 \text{ días}^2$



Gráfica 13. Ilustración de la interacción tratamiento/ días, para la masa muscular.

III.4.2. Espacio articular

Se observaron diferencias significativas para el espacio articular, entre el tratamiento con CMM (tratamiento 2) en comparación con el grupo control (tratamiento 3), siendo 156% mayor la media para el espacio articular en el grupo CMM, comparada con el grupo control (cuadro 3).

Además, las diferencias entre tratamientos y períodos fueron altamente significativas ($P < 0.01$). Sin embargo, la interacción entre estas dos variables no fue significativa ($P > 0.05$) (Cuadro 3).

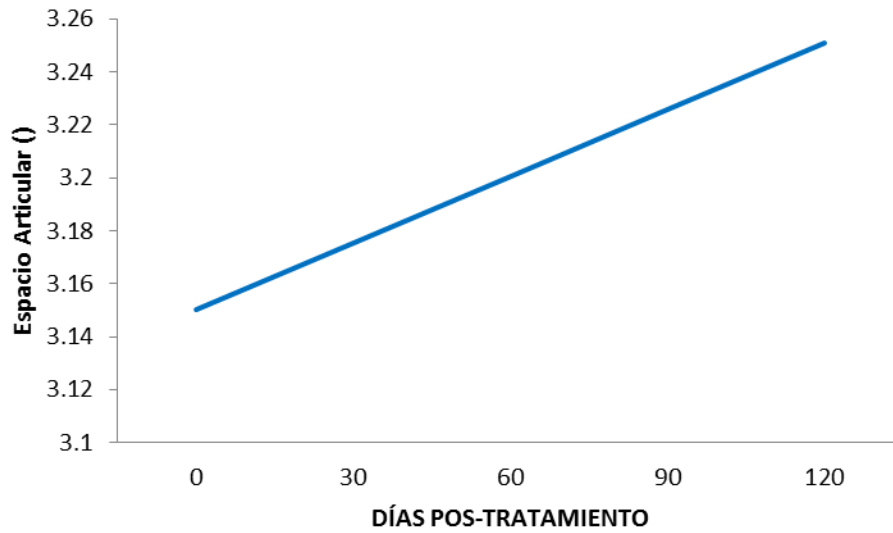
Cuadro 6. Análisis de varianza para masa muscular (MM) y espacio articular y (EA), para perros sometidos a tratamiento articular con PRP, CMN y plasma con agarosa (grupo control)

FV	GI numerador	GI denominador	MASA MUSCULAR		ESPACIO ARTICULAR	
			F	P>F	F	P>F
Tratamiento	2	5	0,83	0,4891	15,50	0,0072
Días	4	20	50,31	0,0001	3,98	0,0150
Tratamiento x días	8	20	5,27	0,0012	0,70	0,0895

Para el espacio articular la ecuación de predicción fue la siguiente:

$$\hat{y} = 3,15 + 0,0084 \text{ días}$$

Ya que la interacción no fue significativa entre tratamiento x día para esta variable (Cuadro 3), se tomó sólo la media (gráfica 14).



Gráfica 14. Media de la interacción tratamiento x día, de los tres grupos del estudio

Para el espacio articular se observaron diferencias estadísticas, por el efecto a tratamiento y períodos ($P < 0.01$). Sin embargo, la interacción tratamiento por período no resultó estadísticamente significativa (Anexo 2).

CONCLUSIONES

Estudios recientes han mostrado que el plasma rico en plaquetas estimula el metabolismo celular de los condrocitos y la proliferación celular, con la consecuente producción de nueva matriz extracelular (Akeda y cols., 2006). Sin embargo, existen pocos trabajos donde el plasma rico en plaquetas fresco sea utilizado *in vivo* en lesiones condrales crónicas.

El uso de agarosa como medio de soporte y contenido para las plaquetas y las células mononucleares y mesenquimales, permitió que los factores de crecimiento producidos y las células contenidas, permanecieran en el sitio del daño, originando un grado de regeneración tisular en el mismo, y la posterior degradación del gel.

Los hallazgos radiográficos de la osteoartrosis de rodilla no están correlacionados con los signos y síntomas. En las personas, solo 15% de los pacientes con signos radiográficos de OA desarrollan dolor en esta articulación (Joern y cols., 2010).

El uso de plasma rico en plaquetas es menos costoso y el proceso de preparación es más sencillo y barato, que la implantación autóloga de condrocitos. Además la activación plaquetaria previa a la implantación de las mismas, no es necesaria, ya que el alto contenido de colágeno de los tejidos adyacentes en la articulación, será un estímulo suficiente para que estas se activen al entrar en contacto con éste (Mishra y cols., 2009).

No se encontraron reportes sobre el uso de G-CSF para la movilización de células mesenquimales hacia sangre periférica, para su posterior utilización en implantes en tejidos con algún grado de daño; por lo que se concluye que la utilización de este fármaco con dicho fin es un proceso novedoso, que podría significar útil en la medicina regenerativa utilizando trasplantes autólogos de células mesenquimales, sin la necesidad de que éstas sean expandidas *in vitro*, u obtenidas directamente de médula ósea.

La separación de células mesenquimales y mononucleares utilizando el método de Ficoll, presenta la desventaja de “arrastrar” gran cantidad de plaquetas con estas células. En el presente trabajo, dicha variable no se pudo controlar.

ANEXO 1

Escala modificada de Melbourne y Glasgow ⁽⁴⁾ para la evaluación del dolor en perros

Fecha

POSTURA

Normal	0
Rígido	1
Arqueamiento	2
Tenso	2
Anormal	3
Protege alguna zona	4

APARIENCIA

Descansa, duerme	0
Intranquilo	1
Incómodo	2
Girándose, revolcándose	3

¿MIDRIASIS? Sí: 1; No: 0

¿SALIVACIÓN? Sí: 1; No: 0

¿VÓMITOS? Sí: 1; No: 0

Si presente, nº veces / 5 minutos

VOCALIZACIÓN

No vocaliza	0
Ladrado (si es anormal)	1
Llorar o gemir	2
Quejidos	3
Aullidos	4

ESTADO MENTAL

Agresivo	
Letárgico	
Apático	
Nervioso / Miedoso / Ansioso	Sí: 1; No: 0
Contento	
Contento y activo	
Sumiso	
¿Cambios en el estado mental?	

MARCHA

Evaluación no posible	0
Rigidez	1
Ataxia	1
Lentitud o reticencia a levantarse/sentarse	2
Cojera	2

RESPUESTA A LA PALPACIÓN

Ninguna de las siguientes	0
Mira hacia la herida	1
Ansioso	1
Chilla	2
Se retira	2
Muerde / Aulla / Gime	3
Grüñe o protege la herida	3

ANEXO 2.

	0	30	60	90	120
0	5.4160	5.1435	4.8847	4.6390	4.4050
30		5.4160	5.1435	4.8847	4.6390
60			5.4160	5.1435	4.8847
90				5.4160	5.1435
120					5.4160

ANEXO 3. Correlación para la masa muscular (MM) entre los diferentes períodos

	0	30	60	90	120
0	1.0	0.9497	0.9019	0.8565	0.8134
30		1.000	0.9457	0.9819	0.8565
60			1.000	0.9457	0.9819
90				1.000	0.9457
120					1.000

VI. BIBLIOGRAFÍA

Ahern B.J, Parvizi J., Boston R., y Schaer T.P. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*. Published by Elsevier Ltd. 2008; 17: 705-713.

Altman R.D. Fisiopatología de la artrosis y la sinovitis. *Condroprotección*. 2008; pp 4-6.

Bartlett W., Skinner J. A., Gooding C. R., Carrington R. W. J., Flanagan A. M., Briggs T. W. R., Bentley G... Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2005; 87 (5): 640-645.

Chaipinyo K., Oakes B.W., Van Damme M.P.I. The use of debrided human articular cartilage for autologous chondrocyte implantation: maintenance of chondrocyte differentiation and proliferation in type I collagen gels. *Journal of Orthopaedic Research*. 2004; 22: 446-455.

Cherubino P., Grassi F.A, Bulgheroni P., Ronga M. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: A preliminary report. *Journal of Orthopaedic Surgery*. 2003; 11(1): 10-15.

De Pavia M.E, Larios G.M.G. y Briseño C.G.. Manejo de la Osteoartrosis en Medicina Familiar y Ortopedia. *Archivos en Medicina Familiar*. 2005; 7(3): 93-98.

Done S.H., Goody P.C., Evans S.A. y Stickland N.C. Anatomía Veterinaria, El perro y el gato. Elsevier Science España S.A. Madrid, España. ISBN: 84-8174-200-7. pp 724-727.

Friedman L., Finlay K., Jurriaans E. Ultrasound of the knee.. *Skeletal Radiol*. 2001; 30:361-377.

Furl M., Ehlers E.M., Russlies M., Rohwedel J. and Behrens P. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions: A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Annals of Anatomy*. 2000; 182:303-310.

González R.A. 2008. Evaluación del efecto analgésico de la farmacopuntura en puntos Zuzanli (E-36), Dubi (E-35), Ququan (h-8), Xiyang (extra) y Ashi en pacientes con diagnóstico de artrosis de rodilla. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.

Gurt D.A.. Tratamiento de la artrosis. En: *Evidencia Científica en Artrosis: Manual de actuación*. Toquero T.F. Publicado por la OMC. Madrid, España. 2006; pp 49-74. ISBN: 84-690-3300-X

Haleem A.M., El Singergy A. A., Sabry D., Atta H.M., Rashed L.A., Chu C.R., El Shewy M., Azzam A. and Aziz M.T.A. The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. *Cartilage*. 2010; 1(4): 253-261.

Hammond W.P., Csiba E., Canin A., Hockman H., Souza L.M., Layton J.E. and Dale D.C. Chronic Neutropenia: A New Canine Model Induced by Human Granulocyte Colony-stimulating Factor. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 87: 704-710.

Hwang Nathaniel S., Zhang Chao, Hwang Yong-Sung, Varghese Shyni. Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine. *WIREs Syst Biol Med*, 2009; 1: 97-106.

Hunziker E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *OsteoArthritis Research Society International*. Published by Elsevier Science Ltd. 2002; 10 (6): 432–463.

Jenniskens Y. M., Koevoet W., De Bart A. C. W., Weinans H., Jahr H., Verhaar J. A. N., De Groot J., Van Osch G. J. V. M.. Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGF β 2 and FGF21. *OsteoArthritis and Cartilage*. 2006; 14 (11): 1136-1146.

Jordan JM, Linder GF, Renner JB, Fryer JG. The impact of arthritis in rural populations. *Arthritis Care Research*. 1995; 8(4):242-50.

Joern W.-P. Michael, Klaus U. Schlüter-Brust, Peer Eysel. The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee. *Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2010; 107(9): 152–62.

Jorgensen C. and Noël D. Mesenchymal stem cells in osteoarticular diseases. *Regenerative Medicine*. 2011; 6 (6): 44-51.

Kassis I., Zangi L., Rivkin R., Levdansky L., Samuel S., Marx G. and Gorodetsky R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation*. 2006; 37: 967–976.

Kellgren J.H y Lawrencw J.S. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann. Rheum Dis*. 1957, 16: 494-502.

Koga H., Shimaya M., Muneta T., Nimura A., Morito T., Hayashi M., Suzuki S., JinJu Y., Mochizuki T. and Sekiya I. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Research & Therapy*. 2008; 10 (4):1-10.

Leah C. A., Dice J.F., Lee K., and Kaplan D.L. Phagocytosis and remodeling of collagen matrices. *Exp Cell Res*. 2007; 313(5): 1045–1055.

Lee C.R., Grodzinsky A.J., Hsu H.P., Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *Journal of Orthopaedic Research*. 2003; 21: 272–281.

Lee H., Overall C.M., McCulloch C.A. and Sodek J. A Critical Role for the Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase in Collagen Phagocytosis. *Molecular Biology of the Cell*. 2006; 17: 4812–4826.

Littell R.C., Henry P.R. y Ammorman C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci*. 1998; 76: 1216-1281.

Littell R.C., Milliken G.A., Stroup W.W y Wolfinger R.D. SAS system for mixed models. SAS Institute Inc., CARY, N.C. 1996; pp 633.

Mao J.J. Giannobile W.V., Helms J.A., Hollister S.J., Krebsbach P.H., Longaker M.T. and Shi S.. Craniofacial Tissue Engineering by Stem Cells. J Dent Res. 2006; 85(11): 966–979.

MartínezM.C. y QuintanaG.S.. Hemostasia y trombosis. 2ª Ed. Editorial Prado. México, D.F., 2008; pp 31-54.

Miralles M.R.C. Biomecánica clínica de las patologías del aparato locomotor. 13ª edición. Editorial Elsevier-Saunders. 2007; pp 316-318, 327-330. ISBN 978-84-458-1680-6.

Mishra A., Tummala P., King A., Byung L., Krauss M., Tse V. and Jacobs C. R. Buffered Platelet-Rich Plasma Enhances Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chondrogenic Differentiation. Tissue Engineering. 2009; 15(3): 431-435.

Molina Z.C.M, Bravo B.P.A. Estudio epidemiológico. Pacientes internados en el servicio de ortopedia, pabellón 106 del Hospital General de México de septiembre de 1985 a febrero de 1992. Revista mexicana de ortopedia y traumatología. 1998; 12(5):416-420.

Monfort F.J. Introducción. En: Evidencia Científica en Artrosis: Manual de actuación. Toquero T.F. Publicado por la OMC. Madrid, España. 2006; pp 9-14. ISBN: 84-690-3300-X

Montgomery D.C. Desing and analysis of experiments. John Wiley & SONS Inc. 5th Edition. 2001; pp 684.

Moragues P.C. Definición, clasificación clínica y diagnóstico de la artrosis, en Evidencia Científica en artrosis, Manual de Actuación. Organización Médica Colegial de España. 2006. ISBN: 84-690-3300-X.

Palau G.J. Cirugía ortopédica en artrosis. En: Evidencia Científica en Artrosis: Manual de actuación. Toquero T.F. Publicado por la OMC. Madrid, España. 2006; pp 75-80. ISBN: 84-690-3300-X.

Piermattei D.L. Atlas de Abordajes quirúrgicos de huesos y articulaciones en perros y gatos. 3ª Ed. Interamericana McGraw-Hill. México. 1993; pp 272-275. ISBN: 968-25-2390-7.

Punwar S. and Khan W.S. Mesenchymal Stem Cells and Articular Cartilage Repair: Clinical Studies and Future Direction. The prevalence and burden of arthritis. Rheumatology. 2011; 41:3-6.

Rico L.C. Incidencia de padecimientos ortopédicos en pacientes adultos atendidos en un Hospital de asistencia privada. Acta Ortopédica Mexicana. 2007; 21(4): 177-181.

Santoscoy M.E.C. Ortopedia, neurología y rehabilitación en pequeñas especies. Perros y gatos. México, D.F: Editorial El Manual Moderno, 2008.

Sisson S. y Grossman J.D. Anatomía de los animales domésticos. Tomo II. 5ª Edición. Barcelona, España: Masson S.A. 1604-1605 p. ISBN: 0-7216-4102-4.

Schwinghammer TL. Bone and joint disorders. En: Wells BG, Dipiro JT, Schwinghammer TL, Hamilton CW. Pharmacotherapy handbook. 2nd ed. Connecticut: Appleton & Lange; 2000; p.8-16.

Shoulders M.D. and Raines R.T. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 929–958.

The burden of musculoskeletal diseases at the start of the new millennium. Report of a WHO scientific group.. *World Health Organ Techniques Rep.* 2003; 919:i-x, 1-218.

Tuli R, Li W-J and Tuan R.S.. Current state of cartilage tissue engineering. *Cartilage Biology and Orthopaedics Branch. Arthritis Research Therapy.* 2003; 5:235-238.

Tunrhaut M.C., Schiper H., Engel B., Buist W., Kranenbarg S., Leeuwen J.L. Postnatal development of collagen structure in ovine articular cartilage. *BMC Developmental Biology.* 2010; 10(62): 1-16.

