



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

**“TRATAMIENTO ARTROSCÓPICO PARA LESIONES DEL CARTÍLAGO
ARTICULAR EQUINO BASADO EN EL IMPLANTE DE UNA MALLA DE
COLÁGENA CON CÉLULAS AUTÓLOGAS ENCAPSULADAS”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ GERMÁN LOMBARDEO GOLDARACENA

TUTOR

DR. ENRIQUE MARTÍN ABURTO FERNÁNDEZ

COMITÉ TUTORAL

DRA. ELIZABETH MORALES SALINAS

DRA. HILDA VILLEGAS CASTREJÓN

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la presente tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

JOSÉ GERMÁN LOMBARDEO GOLDARACENA

DEDICATORIAS

A mi amada esposa y adorables hijos....Con todo mi amor!

A mi madre querida....descanse en paz

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM
A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia FMVZ
Al Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Équidos de la FMVZ-UNAM
Al Instituto Nacional de Rehabilitación INR de la Secretaría de Salud
Al Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del INR
Al Servicio de Artroscopia y Ortopedia del Deporte del INR
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por el financiamiento del proyecto
CONACyT-SALUD C01-98 y la beca otorgada

A profesores, estudiantes, investigadores, tutores, asesores externos, colaboradores y amigos:

Dr. Enrique Martín Aburto Fernández- Tutor
Dra. Hilda Villegas Castrejón- Comité tutorial
Dra. Elizabeth Morales Salinas- Comité tutorial

Dra. Cristina Velasquillo Martínez- Asesora externa del INR y responsable del proyecto
CONACyT-SALUD C01-98

Dr. José Clemente Ibarra Ponce de León- Creador del proyecto y asesor externo del INR

Dra. María Masri Daba- Asesora externa de la FMVZ-UNAM
Biol. Valentín Martínez López- Asesor externo del INR
MVZ Hugo Lecona y su personal del Bioterio del INR
Colegas MVZ del programa DS-ILPH-UNAM
MVZ Esp. Alejandro Sigler Rangel- Anestesiólogo

MVZ M en C Tatiana Chavez Heres (INR)- por el apoyo en el estudio estadístico

Finalmente, doy gracias a Dios y a la Virgen de Guadalupe por ayudarme siempre, al igual que a mis padres y hermanos, a mi esposa, hijos y amigos...

Gracias a todos por hacer posible este trabajo!

RESUMEN

Sobre la troclea femoral medial en la articulación de la babilla de ocho yeguas (cuatro experimentales y cuatro testigos), se creó un defecto condral de espesor total, el cual fue tratado con una perforación en el hueso subcondral. Aunando a este tratamiento, las yeguas del grupo experimental fueron implantadas artroscópicamente con un constructo creado por ingeniería de tejidos. La calidad del tejido de reparación fue evaluada por artroscopía en ambos grupos seis meses después de los tratamientos. El grupo experimental mostró mejoría estadísticamente significativa ($P=0.001$) en el tejido de reparación, en comparación con el del grupo testigo. Las técnicas de ingeniería de tejidos y artroscopía utilizadas en el grupo experimental ofrecen un mejor pronóstico para el tratamiento exitoso de los defectos condrales en equinos. En dicho grupo, fue observada una mejor integración del tejido de reparación, lo cual le permite alcanzar un mayor tiempo de permanencia en la lesión.

Palabras clave: Cartílago articular, Equinos, Reparación condral, Artroscopía, Ingeniería de tejidos.

SUMMARY

On the medial femoral trochlea of the stifle joint of eight mares (four experimental and four control), a full-thickness chondral defect was created and was treated by perforation of the subchondral bone. In addition to this treatment, the experimental group received an arthroscopic implant of a construct that was created by tissue engineering. The quality of the repair tissue in both groups was evaluated by means of arthroscopy, six months after the treatments. The experimental group showed a statistically significant ($P=0.001$) improvement in tissue repair compared with that of the control group. The techniques of tissue engineering and arthroscopy used in the experimental group offer an improved prognosis for successful treatment of chondral defects in equines. Better integration of the repair tissue, which afforded greater permanence in the lesion, was observed.

***Key words:* Articular cartilage, Equines, Chondral repair, Arthroscopy, Tissue engineering.**

CONTENIDO

	Páginas
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	6
2.1 Equipo artroscópico	
2.2 Técnica artroscópica	
2.3 Complicaciones de la cirugía artroscópica	
2.4 Diagnóstico e imágenes	
2.5 Indicaciones de la artroscopía	
2.6 Lesiones articulares que pueden ser diagnosticadas o tratadas por artroscopía	
III. Hipótesis	14
IV. Objetivos	15
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivos específicos	
V. Material y métodos	16
5.1 Animales	
5.2 Manejo Quirúrgico	
5.2.1 Preparación del paciente para cirugía	
5.2.2 Protocolo de anestesia	
5.2.3 Manejo postoperatorio	
5.3 Obtención de las muestras osteocondrales (grupo experimental)	
5.4 Fabricación de los constructos (grupo experimental)	
5.5 Creación del defecto condral	
5.6 Tratamientos	
5.6.1 Perforación al hueso subcondral	
5.6.2 Implantación de los constructos (grupo experimental)	
5.7 Evaluación artroscópica de la calidad del tejido de reparación	
5.8 Análisis estadístico	
VI. Resultados	30
VII. Discusión	34
VIII. Literatura citada	37

“TRATAMIENTO ARTROSCÓPICO PARA LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR EQUINO BASADO EN EL IMPLANTE DE UNA MALLA DE COLÁGENA CON CÉLULAS AUTÓLOGAS ENCAPSULADAS”

I. INTRODUCCIÓN

Los problemas articulares en el equino son una causa importante de claudicación, invalidez y retiro prematuro de cualquier actividad zootécnica; ya sea de trabajo, deporte o placer. Los caballos deportivos están predispuestos a sufrir lesiones articulares serias, debido al exceso de tensión, carga o trauma articular.

La morbilidad substancial que provocan algunas lesiones o defectos en el cartílago articular se traduce en dolor crónico y pérdida de la función articular.

La osteoartritis es una entidad patológica que se caracteriza por la degeneración progresiva y pérdida del cartílago articular (Mankin, 1974) y tiene una gran importancia desde el punto de vista clínico y económico, ya que se encuentra entre las principales causas de desecho en caballos de diferentes funciones y edades.

En la mayoría de los pacientes equinos, la enfermedad articular degenerativa u osteoartritis se desarrolla a través de los años con el uso y desgaste de las superficies articulares o aparece de manera precoz como consecuencia del trauma articular. Las características bioquímicas, morfológicas y avasculares del cartílago articular impiden la reparación satisfactoria de las lesiones a largo plazo, además de que en ellas no se lleva a cabo un proceso de reparación normal como sucede en otros tejidos, posterior a una respuesta inflamatoria (Mankin 1974; Kold y Hickman 1986; Wakitani *et al.*, 1994; Frenkel y Di Cesare 1999; Schenck 2001; Ochi *et al.*, 2002).

La demanda clínica para la regeneración del cartílago articular obedece al bien conocido problema: “Una vez que se daña el cartílago articular adulto, su

capacidad de autoreparación es muy pobre”. Convery y colaboradores (1972) demostraron que los defectos condrales de 7 mm de diámetro no se reparan por sí solos.

Existe una gran variedad de tratamientos médicos encaminados a restablecer la función en una articulación dañada, sin embargo, son solo paliativos con resultados variables e insuficientes y todo dependerá del grado de lesión o enfermedad articular.

Desde hace varios años se han empleado diversas técnicas quirúrgicas en caballos, encaminadas a restaurar una superficie articular dañada, por ejemplo: artroplastía por abrasión, microfractura, mosaicoplastía, autoinjertos y aloinjertos osteocondrales entre otras. Sin embargo, ninguno de los métodos quirúrgicos actuales utilizados para reparar cartílago articular dañado puede restaurar de manera predecible y durable una superficie articular y los resultados clínicos no han sido del todo satisfactorios principalmente a largo plazo (Buckwalter y Mankin 1998; Frisbie *et al.*, 1999; Hurtig *et al.*, 2001; Frisbie 2004; Litzke *et al.*, 2004; Tins *et al.*, 2005).

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario de investigación que combina los conocimientos de las ciencias de los materiales con la biología celular y molecular, teniendo un gran potencial para su aplicación en el campo de la medicina regenerativa y ofrece mejores expectativas de tratamiento para los defectos condrales (Vachon *et al.*, 1992; Hurtig *et al.*, 1998; Frisbie *et al.*, 1999; Schachar *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2000; Temenoff y Mikos 2000; Athanasiou *et al.*, 2001; Hurtig *et al.*, 2001; Fortier *et al.*, 2002; Hardingham *et al.*, 2002; Hardingham *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2003; Athanasiou *et al.*, 2001; Van der Kraan *et al.*, 2002; Frisbie 2004).

La neocondrogénesis y el trasplante de cartílago articular están ganando un lugar prominente en la investigación de las ciencias básicas en ortopedia, desarrollando nuevos tratamientos para las enfermedades músculo-esqueléticas (Schachar *et al.*, 1999; Hardingham *et al.*, 2002; Ochi *et al.*, 2004).

Son diversas las estrategias que ha desarrollado la ingeniería de tejidos para su aplicación. El elemento clave es el uso de los mecanismos basados en los procesos biológicos que inducen la reparación de tejidos lesionados o afectados por alguna enfermedad (Hardingham *et al.*, 2002). En el futuro, la construcción de tejidos vivos *in vitro* se piensa que reduciría la necesidad de trasplantar órganos.

El principio de la ingeniería de tejidos se basa en el cultivo y multiplicación de células sobre estructuras de materiales tridimensionales biocompatibles y biodegradables que proveen una plantilla o vía que orienta el crecimiento del tejido (Griffith y Naughton 2002; Van der Kraan *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2003).

Existen datos clínicos publicados que respaldan el potencial de las terapias basadas en células para mejorar la reparación del cartílago. Las células más utilizadas en ortopedia son las células mesenquimales troncales provenientes de la médula ósea y los condrocitos autólogos (Brittberg *et al.*, 2001).

Los factores de crecimiento son un elemento básico para los cultivos celulares ya que estimulan la actividad celular y su diferenciación hacia factores físicos o químicos para producir hueso, cartílago o menisco entre otros (Nehrer 1997a; Nehrer 1998; Elisseeff 1999; Elisseeff 2000; Ibarra *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2000; Elisseeff 2001; Schenck 2001; Van der Kraan *et al.*, 2002).

En los últimos años, han sido publicados numerosos trabajos sobre el uso del factor de crecimiento parecido a la insulina o IGF-1 (Fortier *et al.*, 2002), el factor de crecimiento transformante beta o TGF β -1 y la proteína morfogenética de hueso o BMP para mejorar la formación de la matriz del cartílago y mantener el fenotipo de los condrocitos (Nixon 1999; Nixon 2000; Hunzinker 2001; Hunzinker *et al.*, 2001; Nixon *et al.*, 2001; Van den Verg 2001; Yang *et al.*, 2001; Blunk 2002; Van der Kraan *et al.*, 2002).

Los estudios experimentales sobre la colocación de implantes con condrocitos (constructos) en los defectos articulares de animales y humanos parece ser el concepto de terapia más prometedor (O'Driscoll 2001; O'Driscoll y Fitzsimmons

2001; Van der Kraan *et al.*, 2002). La finalidad de trasplantar condrocitos en un vehículo biocompatible y biodegradable de un compuesto adherente como matriz (Schultz *et al.*, 2000; Van der Kraan *et al.*, 2002) es la de proporcionar un vehículo para que dichas células permanezcan en el defecto, se asegure la síntesis de una matriz extracelular nueva y dichas células se integren al hueso subcondral y al tejido adyacente de la lesión.

Se han estudiado varios tipos de materiales, tanto biológicos como sintéticos. Los primeros son mejores en cuanto a su disponibilidad y compatibilidad con los condrocitos, pero los polímeros sintéticos (Moran *et al.*, 2003) proveen mayor duración y mínimo riesgo de una respuesta inmune en el ambiente articular (Fortier *et al.*, 1998; Steinwachs *et al.*, 1999; Temenoff y Mikos 2000; Ochi *et al.*, 2002).

Entre los polímeros biológicos se encuentra el uso de geles y esponjas de colágena, pegamentos de fibrina (Fortier *et al.*, 2002), hialuronato, quitosán, alginato y agarosa, los cuales han demostrado mantener el fenotipo de los condrocitos en cultivos tridimensionales, ofreciendo una alternativa en la reparación de los defectos condrales (Van der Kraan *et al.*, 2002).

Algunos investigadores (Kuettner *et al.*, 1982b; Vacanti y Langer 1999; Hardingham *et al.*, 2002) advierten que los condrocitos sembrados en monocapa por más de 6 semanas con cultivos de alta densidad se desdiferenciarán en fibroblastos. Sin embargo, otros autores (Nixon *et al.*, 1992; Paige *et al.*, 1996; Hunziker 2001a; Fortier *et al.*, 2002a) han demostrado que los fibroblastos al ser recultivados en 3 dimensiones, se rediferenciarán en condrocitos nuevamente.

Una de las ventajas del uso de la colágena como matriz para las células es que las enzimas celulares la reconocen y puede ser remodelada y degradada para permitir suficiente espacio para el tejido en crecimiento (Fortier *et al.*, 1998; Temenoff y Mikos 2000; Hardingham *et al.*, 2002; Ochi *et al.*, 2002).

Idealmente, el cartílago articular neoformado por ingeniería de tejidos deberá poseer una estructura, composición bioquímica, propiedades mecánicas y capacidad de auto-mantenimiento iguales a las del cartílago nativo sano, con ello se busca la desaparición del dolor y el restablecimiento de la función articular a largo plazo (Van der Kraan *et al.*, 2002; Tins *et al.*, 2005). Además, las características físicas de dicho tejido permitirán su implantación quirúrgica sobre una lesión dentro de una articulación, con la finalidad de inducir una reparación natural y su integración total al cartílago nativo del paciente (Jorgensen *et al.*, 2001; Hardingham *et al.*, 2002).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El implante quirúrgico de condrocitos autólogos en pacientes humanos y en animales experimentales incluyendo al caballo, ha sido utilizado como tratamiento para los defectos de cartílago articular desde hace algunos años con resultados clínicos satisfactorios en la mayoría de los casos (Schultz *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2003; Litzke *et al.*; 2004).

La técnica quirúrgica de elección para el implante de condrocitos autólogos ha sido la artrotomía. Esta técnica quirúrgica se basa en el abordaje a una cavidad sinovial articular a través de una incisión en la cápsula por medio de un bisturí. Al ser una técnica invasiva y traumática, la artrotomía presenta frecuentes complicaciones postoperatorias, como el dolor articular intenso y la artritis séptica.

Debido a las desventajas de la artrotomía, surgió la necesidad de sustituir dicha técnica por otra menos traumática. Con el tiempo, se diseñaron diferentes instrumentos a base de lentes y pequeños focos que permiten explorar el interior de una articulación sin causarle tanto daño. Tales instrumentos fueron evolucionando hasta llegar a lo que en la actualidad se conoce como artroscopio (Watanabe, 1960).

A partir de la década de los años setenta aparecen algunos informes en la literatura sobre las primeras cirugías artroscópicas en caballos (Smith 1975; Knezevic y Wruhs 1977).

Actualmente, al igual que en medicina humana, la artroscopía es la alternativa quirúrgica más importante para resolver problemas articulares en caballos. Con esta técnica es posible explorar minuciosamente el interior de una cavidad sinovial articular y realizar procedimientos diagnósticos y terapéuticos (McIlwraith 1990b; Walmsley 2004).

Sin duda, la artroscopía revolucionó el campo de la ortopedia, ya que por ser una técnica poco invasiva, es posible diagnosticar y tratar un gran número de

lesiones y enfermedades articulares sin traumatizar los tejidos como sucedía con la artrotomía. Por tales ventajas, los pacientes sufren menos dolor, se recuperan más rápido, no desarrollan grandes cicatrices y hay menos complicaciones.

La artroscopía permite evaluar clínicamente los tejidos intrarticulares incluyendo al cartílago, ya que al utilizar una fuente de iluminación, una lente y un medio acuoso, las estructuras articulares internas se visualizan a mayor aumento y con excelente iluminación (McIlwraith y Martin 1985).

Estudios recientes sobre neocondrogénesis en caballos, han demostrado la superioridad de la artroscopía sobre la artrotomía. Goodrich y colaboradores (2003) utilizaron técnicas artroscópicas para crear defectos condrales en la articulación fémoropatelar de 16 caballos, los cuales fueron tratados con condrocitos modificados genéticamente con un AdIGF-1 (adenovirus que induce la expresión del factor de crecimiento semejante a la insulina). En ninguno de los animales de dicho experimento se presentaron complicaciones relacionadas con la cirugía artroscópica. Por el contrario, en un estudio realizado por Litzke y colaboradores (2004), de 11 caballos sometidos a una artrotomía del tarso para implantarles condrocitos autólogos bajo un parche de periostio, 2 animales fueron eliminados del experimento como consecuencia de artritis séptica. En otro trabajo similar, Barnewitz y colaboradores (2003), implantaron por artrotomía en lesiones condrales de menudillo, un constructo de poliglactin/polidioxanon y condrocitos autólogos, ocasionando dolor postoperatorio intenso; y en 1 de 3 caballos se produjo claudicación crónica. Fortier y colaboradores (2002) implantaron artroscópicamente en la articulación fémoropatelar de 8 caballos, un constructo (condrocitos alogénicos y fibrina polimerizada con IGF-1), utilizando una tachuela biodegradable de ácido poliláctico como método de fijación al hueso subcondral. El uso de anclas artroscópicas biodegradables en humanos para fijar o reparar tejidos intrarticulares es una práctica común que da excelentes resultados. Tales técnicas pueden ser adaptadas a caballos para fijar implantes creados por ingeniería de tejidos. Finalmente, en otro estudio realizado en caballos (Frisbie,

2004), se implantó un constructo (condrocitos y malla de colágena) sobre una lesión condral. Los resultados demostraron que las características artroscópicas del tejido de reparación fueron superiores a las del grupo testigo.

2.1 Equipo artroscópico

Una torre artroscópica es un conjunto de aparatos eléctricos tales como fuente de luz, cámara artroscópica, videograbadora, monitor de televisión y bomba de infusión. Otra parte del equipo es manual, como el artroscopio o telescopio que posee una lente en la punta y una variedad de instrumentos de trabajo como la pinza “Rongeur”, los elevadores de periostio, los osteotomos y el gancho palpador entre otros. También existen equipos motorizados como el rasurador, así como el vaporizador de radiofrecuencia que facilitan el trabajo con tejidos blandos como el cartílago y la sinovia.

2.2 Técnica artroscópica

Para realizar una artroscopía con éxito, es fundamental contar con el equipo y los instrumentos adecuados funcionando a la perfección. La experiencia y habilidad del cirujano son muy importantes. No se recomienda empezar a hacer artroscopía con casos clínicos, ya que en la mayoría de ellos los primeros intentos quirúrgicos no son exitosos.

Para los cirujanos interesados en iniciarse con la artroscopía, es recomendable que practiquen en articulaciones de cadáveres hasta que dominen la técnica. Debe hacerse hincapié en que el aprendizaje toma tiempo y el costo del equipo es elevado.

La técnica consiste en la introducción del artroscopio a la cavidad sinovial a través de un pequeño orificio (5 mm de diámetro) que se hace en la cápsula articular y se conoce como portal. La cápsula debe permanecer distendida con solución salina durante toda la cirugía para permitir la observación de las

estructuras intrarticulares que son amplificadas e iluminadas por el artroscopio, lo que permite una evaluación mas detallada.

Para poder tocar, cortar, separar o extraer fragmentos de tejidos en el interior de la articulación es necesario realizar un segundo portal de trabajo por donde se introducen los instrumentos manuales, motorizados o de radiofrecuencia según las necesidades de cada caso.

En artroscopía existe un principio básico que se conoce como “triangulación” y consiste en que la lente del artroscopio debe enfocar hacia determinada área anatómica en la que deberá quedar visible el instrumento que se introduce por el segundo portal. De esta manera, se obtiene un campo visual de 30 o 70 grados según el tipo de lente, en el interior de la articulación.

2.3 Complicaciones de la cirugía artroscópica (Walmsley, 2004).

1. Hemartrosis (hemorragia intrarticular). La ruptura de algún vaso, por pequeño que sea, puede impedir la visualización durante el procedimiento quirúrgico.
2. Infiltración subcutánea de la solución. Obstaculiza el desarrollo de la cirugía al comprimir el espacio intrarticular.
3. Ruptura de un instrumento dentro de la articulación. Existe el peligro de que se libere un fragmento de metal en la cavidad articular.
4. Artritis séptica posoperatoria. Es una complicación grave, afortunadamente ocurre esporádicamente.

2.4 Diagnóstico e imágenes

Las imágenes en movimiento son captadas por la cámara del artroscopio y enviadas al monitor para ser observadas en video en tiempo real. La cirugía puede ser grabada en formato digital.

Una de las grandes ventajas de la artroscopía sobre otras técnicas de diagnóstico, es que las imágenes obtenidas del hueso subcondral, cartílago articular, ligamentos, membrana sinovial y meniscos, son de mejor calidad que las obtenidas en estudios radiográficos, ultrasonográficos y de resonancia magnética (Frisbie 2004; Walmsley 2004).

Con la artroscopía diagnóstica es posible observar fracturas y desprendimientos osteocondrales que no son visibles radiográficamente y que provocan sinovitis, dolor articular y claudicación. Asimismo, las lesiones o defectos condrales como fisuras, líneas de desgaste, atrofia segmental o difusa y condromalacia son fácilmente diagnosticadas con el artroscopio con mayor precisión que con otras técnicas de diagnóstico. Es por eso que gracias a la calidad de las imágenes artroscópicas es posible emitir un pronóstico más exacto (Macllwraith, 1990a).

La artroscopía se considera el procedimiento óptimo para el diagnóstico morfológico del cartílago articular y de otras estructuras intrarticulares (Frisbie, 2004).

2.5 Indicaciones de la artroscopía

Antes de realizar la cirugía artroscópica, es necesario confirmar que la causa de la claudicación es de origen articular. El examen locomotor, los bloqueos articulares y otros estudios morfológicos previos como radiografías y ultrasonografías son indispensables.

La artroscopía exploratoria es el estudio de elección cuando existe la sospecha clínica de daño articular y las imágenes obtenidas con los métodos convencionales no son concluyentes.

Frecuentemente, durante la exploración articular se descubren lesiones importantes y entonces la artroscopía diagnóstica pasa a ser terapéutica, ya que esta técnica permite el tratamiento directo de muchas lesiones tales como la remoción de fragmentos de tejidos y la dilución de mediadores de la inflamación como enzimas, prostaglandinas y citosinas.

Además, la cirugía artroscópica es la técnica de elección en casos de artritis séptica (Walmsley, 2004).

La presentación de las lesiones articulares es variable y depende del trabajo realizado por el caballo, por ejemplo, las fracturas de los huesos del carpo son mucho más comunes en los caballos de carreras.

La osteoartritis y la osteocondrosis son entidades patológicas que afectan a las articulaciones sinoviales de todos los caballos, independientemente de su función zootécnica. En la mayoría de los casos, estas enfermedades provocan claudicaciones que afectan el desempeño del animal y por ello, la artroscopía está indicada en su diagnóstico y tratamiento. Sin embargo, cabe mencionar que la respuesta al tratamiento artroscópico de cualquier lesión articular, dependerá del tiempo de su evolución y de su tamaño, severidad y ubicación.

2.6 Lesiones articulares que pueden ser diagnosticadas o tratadas por artroscopía

- Región del casco (articulación interfalángiana distal)

Fracturas fragmentarias del proceso extensor de la tercera falange, fracturas fragmentarias de la porción dorso distal de la segunda falange (Vail y McIlwraith 1992) y artritis crónica que no responde a la farmacoterapia.

- Región de la cuartilla (articulación interfalángiana proximal)

Remoción de fragmentos óseos (Schneider *et al.*, 1994).

- Región del menudillo (articulación metacarpo/tarso falangiana)

Fracturas osteocondrales “esquirlas” en la cara dorso medial de la primera falange (Kawkak y McIlwraith 1994) y en su cara palmar/plantar (Foerner *et al.*, 1987; Fortier *et al.*, 1995), lesiones de osteocondritis disecante (OCD) en la cresta sagital dorsal del metacarpo/tarso, sinovitis villonodular en la cara dorso proximal de la articulación (Dabareiner *et al.*, 1996), fracturas articulares abaxiales, basilares y apicales de los sesamoideos (Spurlock y Gabel 1983; Southwood *et al.*, 1998; Woodie *et al.* 1999; Southwood y McIlwraith 2000), fracturas condilares de metacarpo/tarso y artropatía crónica que no responde a la terapia médica.

- Región de la rodilla (articulación del carpo)

Fracturas osteocondrales en la porción dorso distal lateral o medial del radio y en la porción dorso proximal de los huesos carpo radial e intermedio en la articulación radio carpiana, así como en la porción dorso distal de los huesos carpo radial e intermedio y en la porción dorso proximal del tercer carpiano en la articulación intercarpiana (McIlwraith *et al.*, 1987). También está indicada la artroscopía de carpo en casos de fracturas en laja del tercer hueso carpiano que requieren fijación con tornillos (Richardson 1986; Stephens *et al.*, 1988) y en la artropatía con claudicación crónica que no presenta signos radiográficos (Moore y Schneider 1995).

- Región del codo (articulación húmero radio ulnar)

Osteocondritis disecante y quistes óseos subcondrales en húmero (McIlwraith 1990c; Nixon 1990).

- Región del hombro (articulación escápulo humeral)

Osteocondritis disecante y quistes subcondrales en cavidad glenoidea y cabeza humeral (Bertone *et al.*, 1987), fibrilación y fisuras del cartílago, defectos condrales de espesor total (Doyle y White 2000).

- Región del corvejón (articulación del tarso)

Lesiones de osteocondritis disecante (OCD) en la cresta intermedia y maleolo medial de la tibia y en la troclea lateral y medial del talus, fracturas fragmentarias intrarticulares del maleolo lateral de la tibia y artropatía crónica que no responde al tratamiento conservador (McIlwraith *et al.*, 1991).

- Región de la babilla (articulación fémoro tibio patelar)

Lesiones de osteocondritis disecante (OCD) en troclea femoral lateral, patela, surco intertroclear y troclea femoral medial (Foland *et al.*, 1992; Montesso 1995), La artroscopía de babilla también está indicada en las fracturas: sagital medial (Dyson *et al.*, 1992), basilar y apicales de patela, fracturas fragmentarias en trocleas femorales y patela (McIlwraith, 1990d); quistes óseos subcondrales en cóndilo femoral medial (Howard *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1997) y meseta tibial (Textor *et al.*, 2001), fracturas fragmentarias de cóndilos femorales (Stick, 1992) y de eminencia intercondilea de la tibia (Walmsley, 1997), desgarres de los meniscos (Walmsley *et al.*, 2003) y de ligamentos (Wisner, 1979) y claudicación crónica que no responde al tratamiento conservador.

- Región de la cadera (articulación coxofemoral)

Osteocondrosis, artritis traumática (Honas *et al.*, 1993; Nixon 1994).

III. HIPÓTESIS

Con el tratamiento de una lesión condral de espesor total basado en la perforación del hueso subcondral y en el implante de un constructo con células autólogas, se espera la formación de un tejido de reparación de mejor calidad artroscópica que el que se obtiene con un tratamiento basado únicamente en la perforación del hueso subcondral.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Comparar la calidad artroscópica del tejido de reparación de un defecto condral de espesor total, tratado con dos técnicas: Perforación del hueso subcondral *versus* perforación del hueso subcondral con la implantación de un constructo creado por ingeniería de tejidos.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener artroscópicamente una muestra osteocondral (grupo experimental).
- Aislar, cultivar y expandir los condrocitos del cartílago de la muestra osteocondral.
- Fabricar un implante (constructo) a partir de una malla de colágena, células autólogas y matriz extracelular.
- Crear artroscópicamente una lesión o defecto condral de espesor total en ambos grupos (experimental y testigo).
- Tratar la lesión condral en ambos grupos con una perforación del hueso subcondral.
- Tratar la lesión condral del grupo experimental previamente perforada, mediante la fijación artroscópica del constructo (implante).
- Evaluar artroscópicamente en ambos grupos, el tejido de reparación formado sobre la lesión condral en 6 meses.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo del presente proyecto fue revisado y aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El trabajo fue realizado en el quirófano del Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Équidos (MCZE) de la FMVZ de la UNAM y en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) de la Secretaría de Salud (SS) en la Ciudad de México.

5.1 Animales

Se realizó un estudio de seguimiento artroscópico en 8 yeguas criollas clínicamente sanas de entre 3 y 5 años de edad, divididas en dos grupos de 4 animales cada uno (experimental y testigo). A cada animal se le asignó aleatoriamente una letra para su identificación, de tal forma que las yeguas A, B, E y D fueron del grupo testigo y las yeguas C, F, H y J fueron del grupo experimental.

Las yeguas se alojaron en caballerizas de concreto de 4 x 5 m con piso de goma y cama de viruta y se alimentaron tres veces al día (6, 12 y 18 h.), con una ración a base de heno de avena, alfalfa achicalada, salvado de trigo y grano de avena, así como agua a libre acceso. Las cantidades de alimento para cada yegua se calcularon con base en su peso y condición corporal para cubrir sus necesidades de mantenimiento.

Los animales fueron desparasitados con moxidectina oral en pasta (Equest®, Ford Dodge, México) y además fueron vacunados contra tétanos (Tetanol®, Schering- Plough, México) 15 días antes de iniciar el experimento.

5.2 Manejo quirúrgico

Las cirugías artroscópicas fueron realizadas bajo anestesia general con las yeguas en posición decúbito dorsal.

5.2.1 Preparación del paciente para cirugía

- Baño 24 horas antes de la cirugía.
- Ayuno 12 horas previas a la cirugía.
- Evaluación preanestésica 2 horas antes de la cirugía.
- Colocación de un catéter de teflón en la vena yugular izquierda, calibre 14 x 2 pulgadas de longitud (Equipos Médicos Vizcarra, México) con extensión (PISA, México) y tapón (BRAUN, Alemania).
- Rasurado y depilado de la babilla.

5.2.2 Protocolo de anestesia

1. Sedación con xilacina endovenosa (Ford Dodge, E.U.A) a una dosis de 1.1 mg/kg de peso.
2. Relajación muscular con una solución de 500 ml de Dextrosa al 5% con 25 g de gliceril guayacol éter administrada por vía endovenosa a efecto.
3. Inducción anestésica con hidrocloreuro de ketamina endovenosa (Ford Dodge, E.U.A) a una dosis de 2.2 mg/kg de peso.
4. Mantenimiento anestésico con el uso de anestesia inhalada a efecto, mediante la combinación de halotano (Halanest® RIMSA, México) y oxígeno medicinal (INFRA, México).

5. Evaluación de signos vitales durante la anestesia (cada 5 minutos): frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, pulso, llenado capilar, color de mucosas, presión arterial y oximetría de pulso.

5.2.3 Manejo posoperatorio

Después de cada artroscopía, las yeguas de ambos grupos fueron alojadas en caballerizas individuales durante un periodo de 2 semanas y posteriormente se trasladaron a un corral circular de 50 m de diámetro con área techada.

A todos los animales se les dió el mismo tratamiento después de la cirugía. Se administró fenilbutazona endovenosa (Brovel, México) a dosis de 4.4 mg/kg de peso al momento en que los animales salían del quirófano y se continuó con el mismo antiinflamatorio 2 días más a la misma dosis. Posteriormente, la dosis se redujo a la mitad por un periodo de 3 días más. Asimismo, se administraron antibióticos en forma preventiva a cada animal: Penicilina G sódica (Pisa, México) por vía endovenosa a una dosis de 22000 UI/kg de peso cada 6 horas y gentamicina (Shering Plough, México) endovenosa a una dosis de 6.6 mg/kg de peso cada 24 horas durante 5 días.

5.3 Obtención de las muestras osteocondrales (grupo experimental)

De cada una de las yeguas se obtuvieron por vía artroscópica dos muestras osteocondrales de forma cilíndrica de 8 milímetros de diámetro por 15 milímetros de longitud, tomadas de la tróclea femoral medial de la babilla izquierda (donadora de cartílago). El equipo utilizado fue un artroscopio con una lente de 30 grados de angulación y 4 mm de diámetro (Olympus Winter and Ibe GMBH, Hamburgo, Alemania), una video cámara digital (Dyonics Inc. Smith & Nephew. OK, E.U.A) y una fuente de luz de xenón (Stryker Endoscopy, Quantum 250. Sunnyvale, CA E.U.A). Todas las cirugías fueron grabadas en cinta de video de 8 mm y editadas en formato digital.

Una vez que la yegua se encontraba anestesiada sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal con el miembro pelviano izquierdo extendido, se embrocó la babilla izquierda con yodo povidona espuma y alcohol.

Se procedió a cubrir el miembro con campos desechables estériles, y el área operatoria se aisló con un campo autoadherible. Se introdujo un catéter metálico para vena calibre 16 X 2 pulgadas de longitud a la articulación fémoro patelar (abordaje lateral a la patela) y se administraron intrarticularmente 120 ml de solución de Hartmann para distender la articulación.

Sobre la piel de la cara craneal de la babilla se palparon los tres ligamentos patelares (medial, medio y lateral). Se identificó el espacio entre los ligamentos lateral y medio, donde se ubicó el sitio para realizar el primer portal artroscópico (abordaje), a nivel del punto medio entre la cresta tibial y el borde distal de la patela. En este sitio, se realizó una incisión vertical de 5 mm de longitud con una hoja de bisturí del número 11. A través de esta misma incisión y usando otra hoja de bisturí se perforó la cápsula articular y se introdujo a la articulación el trocar artroscópico de punta roma con su camisa. De esta manera se creó el primer portal (orificio) que sirvió para introducir el artroscopio. Después, se sacó el trocar de la camisa, la cual quedó dentro de la cavidad articular y se introdujo en ella el artroscopio, al que se conectó la cámara y el cable de fibra óptica que va a la fuente de luz. Las imágenes intrarticulares se observaron en un monitor a color (Sony Trinitron, Sony corporation, Japón).

Para mantener distendida a la articulación durante toda la cirugía, se administró solución de Hartmann a efecto, mediante una bomba de infusión (Masterflex, Coleparmer Instrument Co. Chicago, EUA) conectada a una vía para líquido directamente a la camisa del artroscopio.

Al quedar ubicada la lente del artroscopio frente al surco troclear, se movió medial y proximalmente para localizar la troclea medial del fémur en su tercio proximal, la cual fue el área donadora de las muestras osteocondrales.

El segundo portal se realizó mediante una incisión vertical en piel de 5 mm de longitud entre los ligamentos patelares medio y medial, a nivel del punto medio entre la cresta tibial y el borde distal de la patela. Se incidió la cápsula y se introdujo perpendicularmente a la tróclea medial del fémur, un instrumento palpador de plástico de punta roma (Olympus, Alemania) el cual sirvió para ubicar el sitio de muestreo del área donadora (troclea femoral medial). Después, se retiró dicho instrumento y se introdujo un sacabocado de acero inoxidable de doble componente en forma de "T" (COR system, Mitek E.U.A) el cual se apoyó sobre el área donadora. Se dieron golpes al sacabocado con un martillo ortopédico (FIEM, México), para cortar el cartílago articular y el hueso subcondral. Mediante movimientos rotatorios del sacabocado se extrajo de la cavidad articular y se obtuvo así la primer muestra osteocondral.

Se utilizó el mismo portal para obtener la segunda muestra osteocondral, flexionando un poco la babilla para ubicar otro sitio de donación en la misma troclea femoral medial. Posteriormente, la articulación se lavó con el sistema de irrigación, se retiraron los instrumentos y se suturaron las incisiones en piel (portales) mediante puntos simples con sutura no absorbible de poliéster calibre 1 (Braunamid, BRAUN Aesculap, Alemania). Sobre las heridas quirúrgicas se suturó un apósito de gasa de 20X10 cm que funcionó como aislante.

Finalmente, se retiraron los campos, el paciente fue oxigenado y desconectado del aparato de anestesia y fue transportado con una grúa al cuarto de recuperación. Una vez recuperado, fue trasladado a su caballeriza.

Las 2 muestras osteocondrales se colocaron en un tubo cónico de plástico estéril de 50 ml, que contenía 10 ml de un medio para cultivo celular M199 (Bio-Whittaker, Maryland, E.U.A), al cual se le adicionaron antimicrobianos al 10%, penicilina-estreptomicina y anfotericina B (Gibco BRL, Grand Island, EUA). El tubo se colocó en una hielera a 4°C y se trasladó de inmediato al Laboratorio del INR donde se inició el proceso de aislamiento y cultivo de condrocitos.

5.4 Fabricación de los constructos (grupo experimental)

Los constructos (Fig.1) fueron fabricados a base de células autólogas, matriz extracelular y una malla de colágena en forma de disco de 8 mm de diámetro (Mitek DePuy, MA USA). Para tal fin, se utilizó la técnica de encapsulamiento celular descrita por Masri y colaboradores (2007). Las dimensiones de cada constructo fueron de 1 cm de diámetro por 4 mm de espesor en promedio.



Fig.1

Procedimiento:

1. Las muestras osteocondrales fueron manejadas dentro de una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA) en condiciones de esterilidad.
2. En una caja de Petri y con la ayuda de una hoja de bisturí del No.11 (BD, Monterrey, México) se separó al cartílago articular del hueso subcondral de ambas muestras osteocondrales, cortando el cartílago en fragmentos de aproximadamente 2 X 2 mm³.
3. Se hicieron 2 lavados del cartílago articular fragmentado con solución salina buferada de fosfatos "PBS" (Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA), adicionada con los antimicrobianos previamente mencionados.
4. Se preparó una solución de colagenasa tipo II al 0.3% (Worthington. NJ, E.U.A) en el medio para cultivo celular M199.
5. Se colocó la muestra de cartílago en un tubo con 5 ml de medio M199, antimicrobianos al 1% y 75 microlitros de colagenasa (200 microgramos/ml), formándose así una solución de colagenasa al 0.3%.
6. La solución con los fragmentos de cartílago se introdujo en un incubador (Shel Lab, Oregon E.U.A) a 37°C en agitación constante durante 4 horas, para su digestión enzimática.
7. Se centrifugó el tubo a 1200 rpm durante 12 min/21°C.
8. Se resuspendió el botón celular (condrocitos) con 5 ml de solución M199 más antimicrobianos al 1% y se centrifugó nuevamente.
9. Se resuspendió el botón celular en 2 ml de solución M199 más suero fetal bovino (SFB) al 10 % (Gibco, E.U.A).
10. Se tomaron 10 microlitros de la suspensión celular y se mezclaron con 10 microlitros de azul de tripano al 0.4 % (Gibco BRL, Life technologies. NY, E.U.A).

11. En una cámara de Neubauer, se contaron las células del cuadrante central con la ayuda del microscopio óptico de luz invertida (40x) [Carl Zeiss, Axiovert 25, Alemania]. Las células vivas se observaron de color blanco y las muertas de color azul.
12. Se calculó el porcentaje de viabilidad celular.
13. Se calculó el número de células a sembrar mediante la siguiente fórmula:
[Número de células vivas x 2 (factor de dilución-20microl) x 10000 (constante) x volumen de suspensión].
14. Se sembraron las células en una caja de cultivo primario T75 con 10 ml de una solución compuesta por: medio de cultivo M199 + antimicrobianos al 1% y suero fetal bovino.
15. Se incubó la caja de cultivo durante 4 semanas en un incubador de CO₂ al 5%, 37°C y 85% de humedad relativa (NUAIRE, US Autoflow, E.U.A).
16. Se cambió el medio de cultivo de la caja cada tercer día, monitoreando las células al microscopio y se esperó hasta que éstas llegaran a confluencia.
17. Se agregaron 8 ml de PBS + EDTA al 1 milimolar.
18. Se agregaron 5 ml de tripsina al 0.25% (Gibco, Invitrogen Corp. NY, E.U.A) para desprender las células del fondo de la caja y esta se incubó con CO₂ a 37 °C durante 5 minutos (tripsinización).
19. Se agregó 5 ml de suero fetal bovino para bloquear a la tripsina.
20. Se centrifugó a 1200rpm/12 min.
21. Se resuspendió el botón celular con 5 ml de PBS y se volvió a centrifugar.
22. Se resuspendió en 2 ml de solución M199 con suero fetal bovino al 10%.
23. Se calculó la viabilidad celular.

24. Se calculó el número de células obtenidas en el cultivo primario (aproximadamente 5×10^6). El cultivo primario tuvo una duración aproximada de 4 semanas.
25. Se recultivó en cajas T150 durante 4 semanas más (primer pase) para obtener una población de 15×10^6 células aproximadamente (repetir pasos 8-24).
26. Se recultivaron esas células por otras 4 semanas para un segundo pase, en 2 cajas T150 y una caja de Petri (repetir pasos 8-24).
27. A cada una de las 3 cajas se les sembraron aproximadamente 5 millones de células. A la caja de Petri se le adicionó ácido ascórbico con la finalidad de que se produjera una gran cantidad de matriz extracelular.
28. De las 2 cajas T150 se obtuvieron aproximadamente 30-40 millones de células, las cuales se sembraron en igual proporción sobre dos discos de 8 mm de diámetro de la malla de colágena.
29. Se permitió que las células de la caja de Petri llegaran a confluencia en alta densidad, con una gran cantidad de matriz extracelular.
30. Con la ayuda de un separador celular y con el efecto de la tripsina (repetir paso 18), se separaron de la caja de Petri las células y su matriz extracelular.
31. Al centro de la caja de Petri se colocaron los dos discos de colágena con células y se envolvieron con la matriz extracelular a manera de “crepa”.
32. La “crepa” se incubó durante 5 días para permitir que las células se adhiriesen perfectamente a una estructura tridimensional. La adhesión de las células a la malla, se valoró en el microscopio óptico de luz invertida. De esta manera quedó formado el “constructo”, listo para ser implantado.

5.5 Creación del defecto condral

En la babilla derecha de las yeguas de ambos grupos se creó de manera artroscópica un defecto condral de espesor total de 8 mm de diámetro sobre el tercio proximal de la tróclea femoral medial con la ayuda del sacabocados, un elevador de periostio y una pinza “Rongeur”.

5.6 Tratamientos

5.6.1 Perforación al hueso subcondral

En el centro del defecto condral en ambos grupos se realizó con un taladro una perforación en el hueso subcondral de 2.4 mm de diámetro por 15 mm de profundidad (Fig.2).

Esta técnica tiene por objeto provocar hemorragia para liberar células mesenquimales de la médula ósea e inducir la reparación del defecto.

5.6.2 Implantación de los constructos (grupo experimental)

El procedimiento fue realizado mediante artroscopía. En la perforación del hueso subcondral se introdujo un ancla biodegradable Panalok™ (Mitek, MA E.U.A), unida a una sutura absorbible de polidioxanona PDS™ (Mitek, MA E.U.A) calibre 1 (Fig.3).

Los dos cabos de la sutura quedaron fuera de la articulación y se introdujeron en dos perforaciones realizadas en el constructo con una aguja hipodérmica calibre 20. El constructo fue deslizado desde el exterior hacia la cavidad articular, pasando a través de una cánula de plástico de rosca exterior (Mitek, MA E.U.A) de 14 mm de diámetro, la cual fue utilizada como túnel (Fig.4).

Una vez que el constructo se colocó sobre el defecto, fue sujetado con nudos y de esta manera fue implantado (Fig.5).

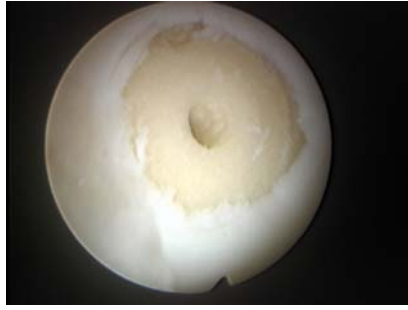


Fig.2



Fig.3



Fig.4



Fig.5

5.7 Evaluación artroscópica de la calidad del tejido de reparación

Los defectos condrales de ambos grupos (experimental y testigo) fueron evaluados a los 6 meses de la intervención quirúrgica, mediante el Sistema de Calificación Artroscópica de “Oswestry” para el tejido de reparación condral (Smith *et al.*, 2005). El sistema se basa en la medición de 5 parámetros donde el puntaje máximo que se puede alcanzar es de 10/10 y el mínimo es de 0/10 (Tabla 1).

Tabla 1
 Sistema de Calificación Artroscópica de "Oswestry"
 para el tejido de reparación condral

<p>1- Nivel Determina la altura del tejido de reparación en relación con la altura del cartílago de la periferia.</p> <p>Normal = 2 Elevado = 1 Hundido = 0</p>
<p>2- Integración Determina el grado de unión del tejido de reparación con el cartílago de la periferia.</p> <p>Completa = 2 Interrupción menor (<25% del área) = 1 Interrupción mayor (>25% del área) = 0</p>
<p>3- Apariencia de la superficie Representa la textura que aparenta el tejido de reparación al ser observado artroscópicamente.</p> <p>Lisa = 2 Irregular = 1 Muy irregular/fibrilación = 0</p>
<p>4- Color Representa la coloración del tejido de reparación.</p> <p>Aperlado, parecido al cartílago = 2 Blanco = 1 Amarillo hueso = 0</p>
<p>5- Rigidez Indica el grado de dureza del tejido de reparación, el cual se determina con la ayuda de un instrumento palpador. Es importante comparar con el cartílago de la periferia.</p> <p>Normal, comparada con el cartílago adyacente = 2 Blando = 1 Muy blando/duro = 0</p>

Es importante mencionar que el cartílago articular sano calificado con dicho sistema, obtiene la calificación más alta (10/10). Entre más alta sea la calificación del tejido de reparación, mejor será su calidad y viceversa.

5.8 Análisis Estadístico

Cada uno de los 5 parámetros del Sistema “Oswestry” funcionó como una variable. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney con un 95% de confianza para determinar la diferencia entre grupos. Todo el análisis se realizó a través del paquete SPSS™ *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS Inc. IL E.U.A) para Windows™ versión 11.

VI. RESULTADOS

Es importante mencionar que ninguna de las yeguas presentó complicación articular postoperatoria (dolor intenso o infección) ni rechazo del constructo.

Los resultados por yegua y por grupo, así como las frecuencias por parámetro en ambos grupos, se muestran en las tablas 2 y 3 respectivamente.

En la gráfica 1, se muestran los resultados por parámetro en cada grupo y el resultado total por grupos, donde el grupo tratado con constructo (experimental) obtuvo 22/40 puntos, mientras que el grupo testigo obtuvo 7/40 puntos, lo cual, mostró una diferencia estadísticamente significativa con una $P=0.001$ (Tabla 2).

En el grupo tratado con constructo se obtuvieron tejidos de reparación de mejor calidad artroscópica (Fig. 6), que en el grupo testigo (Fig. 7).



Fig.6



Fig.7

Tabla 2

Resultados por yegua y por grupo con base en la aplicación del Sistema "Oswestry"

Parámetros (variables)	Puntuación	Yeguas n = 8							
		Grupo testigo				Grupo experimental			
		A	B	E	D	C	F	H	J
Nivel	Normal = 2 Elevado = 1 Hundido = 0	0	0	0	0	0	0	2	2
Integración	Completa = 2 Interrupción menor (<25% del área) = 1 Interrupción mayor (>25% del área) = 0	0	0	0	1	1	1	2	2
Apariencia de la superficie	Lisa = 2 Irregular = 1 Muy irregular/fibrilación = 0	0	0	1	0	1	1	1	1
Color	Aperlado, parecido al cartílago = 2 Blanco = 1 Amarillo hueso = 0	0	0	1	0	1	1	1	1
Rigidez	Normal = 2 Blando = 1 Muy blando/duro = 0	1	1	1	1	1	1	1	1
Total por yegua		1/10	1/10	3/10	2/10	4/10	4/10	7/10	7/10
Total por grupo		7/40				22/40			

Prueba de Mann - Whitney = 76.00 P = 0.001

Tabla 3

Frecuencias por parámetro en ambos grupos

Parámetros	Puntuación	Grupo	Grupo
		Testigo	Experimental
		n=4 (%)	n=4 (%)
Nivel	Normal = 2	0 (0)	2 (50)
	Elevado = 1	0 (0)	0 (0)
	Hundido = 0	4 (100)	2 (50)
Integración	Completa = 2	0 (0)	2 (50)
	Interrupción menor (<25%) = 1	1 (25)	2 (50)
	Interrupción mayor (>25%) = 0	3 (75)	0 (0)
Apariencia de la superficie	Lisa = 2	0 (0)	0 (0)
	Irregular = 1	1 (25)	4 (100)
	Muy irregular/fibrilación = 0	3 (75)	0 (0)
Color	Aperlado = 2	0 (0)	0 (0)
	Blanco = 1	1 (25)	4 (100)
	Amarillo hueso = 0	3 (75)	0 (0)
Rigidez	Normal = 2	0 (0)	0 (0)
	Blando = 1	4 (100)	4 (100)

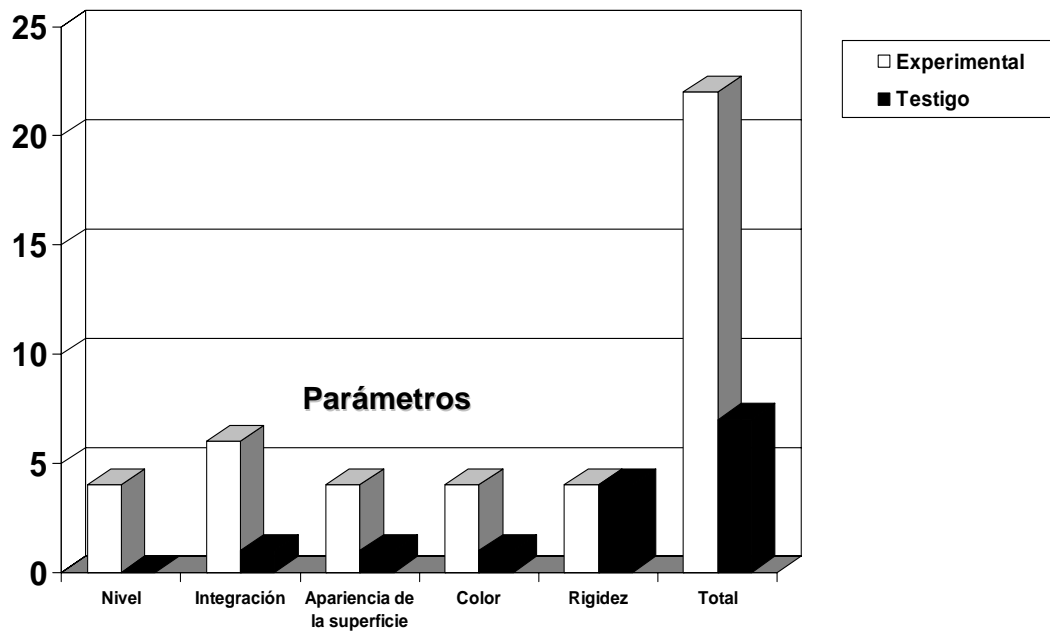
Muy blando/duro = 0

0 (0)

0 (0)

Gráfica 1

Resultados por parámetro de cada grupo y resultado total por grupos



VII. DISCUSIÓN

Los resultados demostraron que con el tratamiento de un defecto condral de espesor total basado en la perforación del hueso subcondral y la implantación de un constructo creado por ingeniería de tejidos, se obtiene un tejido de reparación de mejor calidad artroscópica que con el tratamiento de perforación subcondral únicamente.

La superioridad de los resultados del grupo tratado con constructo (experimental) sobre el grupo testigo muestra la efectividad del constructo implantado, ya que es la única diferencia en el tratamiento de ambos grupos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Masri y colaboradores (2007). Consideramos que las células permanecieron en el constructo el tiempo necesario para inducir la formación de un tejido de reparación de mejor calidad artroscópica, destacando una mejor integración con el cartílago de la periferia (gráfica 1).

La diferencia estadísticamente significativa que se observó al analizar los resultados, nos permite recomendar el procedimiento utilizado en el grupo tratado con el constructo y sugiere seguir empleando al Sistema “Oswestry” en estudios posteriores.

Mediante la artroscopía fue posible detectar ligeras diferencias en el tejido de reparación entre individuos, gracias a la capacidad óptica que tiene la técnica, aunado a la amplificación e iluminación de los tejidos. Con nuestras observaciones confirmamos lo que Ayrál (1996) señala: “La artroscopía se considera el estándar de oro para la evaluación del cartílago articular”.

El presente estudio corroboró los resultados de Smith y colaboradores (2005) en relación a la necesidad de evaluar artroscópicamente el tejido de reparación condral como una parte fundamental en la valoración de los tratamientos. Consideramos que dicha evaluación arroja información importante sobre la evolución y el pronóstico de una lesión condral reparada.

Por otra parte, con respecto a la reparación de los defectos condrales en ambos grupos, cabe mencionar la importante participación de las células mesenquimales de la médula ósea al perforar el hueso subcondral. Sin embargo, en el grupo testigo no existió un constructo que sirviera como estructura de sostén para esas células y que les permitiera un mayor tiempo de permanencia sobre el defecto como sucedió en el grupo experimental. De acuerdo con lo anterior, suponemos que en el grupo experimental se dio un efecto aditivo de reparación entre las células del constructo y las células de la médula ósea, lo cual se vio reflejado en los mejores resultados.

Asimismo, creemos que la malla de colágena utilizada en el experimento también influyó de manera positiva en los resultados del grupo tratado con el constructo. Tal observación es respaldada por lo que Lubiowski y colaboradores (2006) mencionan: “El uso de polímeros biodegradables como la colágena en la reparación de defectos condrales mejora la calidad en el tejido de neoformación”. Un ejemplo de ello, es el estudio donde se repararon defectos condrales con condrocitos autólogos y una membrana de colágena en rodillas de humanos (Steinwachs y Kreuz 2007). En este caso, los autores observaron que el tejido de reparación mejoraba a medida que aumentaba el tiempo de su evaluación. Tal observación será tomada en cuenta en estudios posteriores, ya que consideramos que los 6 meses de espera para la evaluación de dicho tejido en nuestro estudio no fueron suficientes, con base en los resultados del grupo experimental. Cabe señalar, sin embargo, que a pesar de que este último grupo superó al testigo, no fue posible obtener un tejido de reparación con la calidad artroscópica del cartílago articular normal.

De nuestros resultados surge la recomendación de conducir futuros estudios para comparar los efectos en la reparación condral entre defectos articulares tratados con polímero biodegradable de colágena desprovisto de células autólogas y aquellos tratados con el mismo polímero sembrado con condrocitos autólogos como en el presente estudio.

En conclusión, consideramos que con la utilización de técnicas de ingeniería de tejidos y artroscopía para la reparación de defectos condrales en equinos (implantación de constructos), se obtienen mejores resultados de tratamiento que con las técnicas basadas únicamente en la perforación del hueso subcondral.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Athanasiou KA, Shah AR, Hernández RJ, LeBaron RG. Basic science of articular cartilage repair. *Clinics and Sports Medicine* 2001; 20 (2): 223-247.
2. Ayrál X. Diagnostic and quantitative arthroscopy: quantitative arthroscopy. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 1996; 10 (3): 477-494.
3. Barnewitz D, Evers A, Zimmermann J, Wilke I, Kaps C, Sittinger M. Tissue engineering: new treatment of cartilage alterations in degenerative joint diseases in horses- preliminary results of a long term study. *Berl. Münch. Tierärztl Wochenschr* 2003; 116: 157-161.
4. Bertone AL, McIlwraith CW, Powers BE *et al.* Arthroscopic surgery for the treatment of osteochondral in the equine shoulder joint. *Vet Surg* 1987; 16 (4): 303-311.
5. Blunk T. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Engineering* 2002; 8(1): 73-84.
6. Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: An update. *Clin.Orthop.* 2001; 391: 337-348.
7. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr. Course Lect.* 1998; 47: 487-504.
8. Convery FR, Akeson WH, Keown GH. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1972; 82: 253-262.
9. Dabareiner RM, White Na, Sullins KE. Metacarpophalangeal joint synovial pad fibrotic proliferation in 63 horses. *Vet Surg* 1996; 25: 199-206.

10. Doyle PS, White NA. Diagnostic findings and prognosis following arthroscopic treatment of subtle osteochondral lesions in the shoulder joint of horses: 15 cases (1996-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217 (12): 1878-1882.
11. Dyson SJ, Wright I, Kold S, Vatisstas N. Clinical and radiographic features, treatment and outcome in 15 horses with fracture of the medial aspects of the patella. *Equine Vet J* 1992; 24: 264-268.
12. Elisseeff J. Controlled-release of IGF-1 and TGF- β 1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Research* 2001; 19 (6): 1098-1104.
13. Elisseeff J. Photoencapsulation of chondrocytes in polyethylene oxide-based semi-interpenetrating networks. *Journal of Biomedical Material Research* 2000; 51 (2):164-171.
14. Elisseeff J. Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proceedings of the National Academy of Science* 1999; 96 (6): 3104-3107.
15. Foerner JJ, Barclay WP, Phillips TN, *et al.* Osteochondral fragments of the palmar/plantar aspect of the fetlock joint. *Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the American Association of Equine Practitioners*, 1987; 739-744.
16. Foland JW, McIlwraith CW, Trotter GW. Arthroscopic surgery for osteochondritis dissecans of the femoropatellar joint of the horse. *Equine Vet J* 1992; 24: 419-423.
17. Fortier LA, Brofman PJ, Nixon AJ, Mohammed HO. Disparate chondrocyte metabolism in three-dimensional fibrin cultures derived from autogenous or commercially manufactured fibrinogen. *American Journal of Veterinary Research* 1998; 59 (4): 514-520.

18. Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *The Journal of Bone and Joint Surgery (Br)* 2002; 84-B (2): 276-288.
19. Fortier LA, Nixon AJ, Lust G. Phenotypic expression of equine articular chondrocytes grown in three-dimensional cultures supplemented with supraphysiologic concentrations of insulin-like growth factor-1. *American Journal of Veterinary Research* 2002a; 63 (2): 301-305.
20. Frenkel SR, Di Cesare PE. Degradation and repair of articular cartilage. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4: 671-685.
21. Frisbie D. Current and future treatments of equine joint disease. Focus on joints Seminar of the American Association of Equine Practitioners (AAEP); 2004 July 22-24; Louisville, Kentucky: AAEP Seminar, 2004:157-176.
22. Frisbie D.D: Current and future treatments of equine joint disease. Proceedings of "Focus on Joints" Meeting. American Association of Equine Practitioners. Louisville, Kentucky U.S.A, 2004; 157-176.
23. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, Park RD and McIlwraith CW. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Veterinary Surgery* 1999 ; 28 (4):242-255.
24. Frontier LA, Foerner JJ, Nixon AJ Arthroscopic removal of axial osteochondral fragments of the plantar/palmar proximal aspect of the proximal phalanx in horses: 199 cases (1988-1992). *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206 (1): 71-74.

25. Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ. Genetically modified chondrocytes over expressing insulin-like growth factor-1 enhance early healing of articular cartilage. Transactions of the 49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society; 2003 february 2-5; New Orleans LA, USA. USA: Orthopaedic Research Society, 2003 (28): poster # 893.
26. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. Science 2002; 295: 1009-1016.
27. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. Arthritis Research 2002; 4 (suppl 3): 63-68.
28. Henderson IJ, Tuy B, Connell D, Oakes B, Hettwer WH. Prospective clinical study of autologous chondrocyte implantation and correlation with MRI at three and 12 months. Journal of bone and joint surgery Br 2003; 85: 1060-1066.
29. Honnas CM, Zamos DT, Ford TS. Arthroscopy of the coxofemoral joint of foals. Vet Surg 1993; 22 (2): 115-121.
30. Howard RD, McIlwraith CW, Trotter GW. Arthroscopic surgery for subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle in horses; 41 cases (1988-1994). J Am Vet Med Assoc 1995; 206: 842-850.
31. Hunziker EB, Driesang IM and Morris EA. Chondrogenesis in cartilage repair is induced by members of the transforming growth factor-beta superfamily. Clinical Orthopaedics and Related Research 2001; (391 Suppl): 171-181.
32. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis and Cartilage 2001a; 10, 432-463.
33. Hunziker EB. Growth factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage 2001; 9 (1): 22-32.

34. Hurtig M, Pearce S, Warren S, Kalra M, Miniaci A. Arthroscopic mosaic arthroplasty in the equine third carpal bone. *Veterinary Surgery* 2001; 30: 228 – 239.
35. Hurtig MB, Novak K, McPherson R, McFadden S, McGann LE, Muldrew K, Schachar NS. Osteochondral dowel transplantation for repair of focal defects in the knee: An outcome study using an ovine model. *Veterinary Surgery* 1998; 27: 5-16.
36. Ibarra C, Koski JA, Warren RF. Tissue engineering meniscus : cells and matrix. *Orthopaedics Clinics of North America* 2000 ; 31 : 411-418.
37. Jorgensen C, Noel D, Apparailly F, Sany J. Stem cells for repair of cartilage and bone : the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2001 ; 60 (4) : 305-309.
38. Kawcak CE, McIlwraith CW. Proximodorsal first phalanx osteochondral chip fragmentation in 336 horses. *Equine Vet J* 1994; 26 (5): 392-396.
39. Knezevic RF; Wruhs O: Arthroscopy in the horse, ox, pig and dog. *Vet. Med. Rev* 1977; 1:54-63.
40. Kold SE and Hickman J. An experimental study of the healing process of equine chondral and osteochondral defects. *Equine Veterinary Journal* 1986; 18 (1): 18-24.
41. Kuettner KE, Memoli VA, Pauli BU, Wrobel NC, Thonar EJ, Daniel JC. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro* II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. *The Journal of Cell Biology* 1982b; 93: 751-757.
42. Litzke LE, Wagner E, Baumgaertner W, Hetzel U, Josimovic-Alasevic O, Libera J. Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Annals of Biomedical Engineering* 2004; 32 (1): 57-69.

43. Lubiowski P, Kruczynski J, Gradys A, Trzeciak T, Jaroszewski J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplantation Proceedings* 2006; 38 (1): 320-322.
44. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander E, Hunziker E, Kandel R, Nehrer S, Pritzker K, Roberts S, Stauffer E. Histological assessment of cartilage repair. *J. Bone Joint Surg.* 2003; 85A: 45-57.
45. Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts). *The New England Journal of Medicine* 1974; 291(24): 1285-1292.
46. Masri M, Lombardero G, Velasquillo C, Martínez V, Neri R, Villegas H, Ibarra C. Matrix-encapsulation cell-seeding technique to prevent cell detachment during arthroscopic implantation of matrix-induced autologous chondrocytes. *Arthroscopy. The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2007; 23 (8): 877-883.
47. McIlwraith CW: General technique and diagnostic arthroscopy. In: McIlwraith CW. *Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse*, 2nd edn. Philadelphia: Lea and Febiger; 1990a; 21-32.
48. McIlwraith CW: Introduction and brief historical review. In: McIlwraith CW. *Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse*, 2nd edn. Philadelphia: Lea and Febiger; 1990b; 1-4.
49. McIlwraith CW, Foerner JJ, Davis DM. Osteochondritis dissecans of the tarsocrural joint: results of treatment with arthroscopic surgery. *Equine Vet J* 1991; 23 (3): 155-162.
50. McIlwraith CW, Martin GS. Arthroscopic surgery for the treatment of osteochondritis dissecans in the equine femoropatellar joint. *Veterinary Surgery* 1985; 14: 105-116.

51. McIlwraith CW, Yovich JV, Martin GS. Arthroscopic surgery for the treatment of osteochondral chip fractures in the equine carpus. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 191: 531-540.
52. McIlwraith CW. Osteochondral fragmentation of the distal aspect of the patella in horses. *Equine Vet J* 1990d; 22: 157-163.
53. McIlwraith CW. Other uses of arthroscopy in the horse. In: McIlwraith CW. *Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse*, 2nd edn. Philadelphia: Lea and Febiger; 1990c; 220-221.
54. Montesso F, Wright IM. Removal of chip fractures of the femoral trochlear ridges of three horses. *Vet Res* 1995; 137: 94-96.
55. Moore RM, Schneider RK. Arthroscopic findings in the carpal joint of lame horses without radiographically visible abnormalities: 41 cases (1986-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206 (11): 1741-1746.
56. Moran JM, Pazzano D, Bonassar LJ. Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering* 2003; 9 (1): 63-70.
57. Nehrer S. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997a; 38 (2): 95-104.
58. Nehrer S. Chondrocytes seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 1998; 19 (24): 2313-2328.
59. Nixon AJ, Lust G, Vernier-Singer M. Isolation, propagation, and cryopreservation of equine articular chondrocytes. *American Journal of Veterinary Research* 1992; 53 (12): 2364-2370.
60. Nixon AJ, Saxer RA, Brower-Toland BD. Exogenous insulin-like growth factor-I stimulates an autoinductive IGF-I autocrine/paracrine response in chondrocytes. *Journal of Orthopaedics Research* 2001; 19 (1): 26-32.

61. Nixon AJ. Arthroscopic approaches and intrarticular anatomy of the equine elbow. *Vet Surg* 1990; 19(2): 93-101.
62. Nixon AJ. Diagnostic and operative arthroscopy of the coxofemoral joint in horses. *Vet Surg* 1994; 23: 337-385.
63. Nixon AJ. Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *Journal of Orthopaedics Research* 1999; 17 (4): 475-487.
64. Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2000; (379 Suppl): 201-213.
65. Ochi M, Adachi N, Nobuto H, Yanada S, Ito Y, Agung M. Articular cartilage repair using tissue engineering technique-novel approach with minimally invasive procedure. *Artificial Organs* 2004; 28 (1): 28-32.
66. Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *Journal of Bone and Joint Surgery, British* 2002; 84: 571-578.
67. O'Driscoll SW and Fitzsimmons JS. The role of periosteum in cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; (391 Suppl): 190-207.
68. O'Driscoll SW. Preclinical cartilage repair: current status and future perspectives. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; (391 Suppl): 397-401.
69. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Schloo BL, Vacanti JP, Vacanti CA. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. *Plastic Reconstructive Surgery* 1996; 97 (1): 168-178.

70. Richardson DW. Technique for arthroscopic repair of third carpal bone slab fractures in horses. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 188 (3): 288-291.
71. Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE, Richardson JB. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Research and Therapy* 2003; 5 (1): 60-73.
72. Schachar NS, Novak K, Muldrew K, Zernicke RF, McGann LE. Articular cartilage joint surface reconstruction techniques. *Journal of Orthopaedic Science* 1999; 4(6): 457-461.
73. Schenck RC. Strategies in contemporary tissue engineering. *Proceedings of the 68th Annual Meeting*; 2001 March 1; USA. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2001.
74. Schneider RK, Ragle CA, Carte BG, *et al.* Arthroscopic removal of osteochondral fragments from the proximal interphalangeal joint of the pelvic limbs in three horses. *J Am Vet Am Assoc* 1994; 205 (1): 79-82.
75. Schultz O, Sittinger M, Haeupl T, Burmester GR. Emerging strategies of bone and joint repair. *Arthritis Research* 2000; 2: 433-436.
76. Shneider RK, Jenson P, Moore RM. Evaluation of cartilage lesions on the medial femoral condyle as a cause of lameness in horses: 11 cases 1988-1994. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210: 1649-1652.
77. Smith M: Arthroscopy in large animals. *Proceedings of the eleven conference of the european society of veterinary surgery*, 1975.
78. Smith GD, Taylor J, ALMqvist KF, Erggelet Ch, Knutsen G, Portabella MG, Smith T, Richardson JB. Arthroscopic assessment of cartilage repair: A validation study of 2 scoring systems. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2005; 21 (12): 1462-1467.

79. Southwood LL, McIlwraith CW. Arthroscopic removal of fracture fragments involving a portion of the base of the proximal sesamoid bone in horses: 26 cases (1984-1997). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217 (2): 236-240.
80. Southwood LL, Trotter GW, McIlwraith CW. Arthroscopic removal of abaxial fracture fragments of the proximal sesamoid bones in horses: 47 cases (1989-1997). *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213 (7):1016-1021.
81. Spurlock GH, Gabbel AA. Apical fractures of the proximal sesamoid bones in 109 Standardbred horses. *J Am Vet Med Assoc* 1983; 183: 76-79.
82. Steinwachs MR, Erggelet C, Lahm A, Guhlke-Steinwachs U. Clinical and cell biology aspects of autologous chondrocytes transplantation. *Unfallchirurg* 1999; 102 (11): 855 - 860.
83. Steinwachs M, Kreuz PC. Autologous chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with a type I/III collagen membrane: A prospective study with a 3-year follow-up. *Arthroscopy. The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2007; 23 (4): 381-387.
84. Stephens PR, Richardson DW, Spencer PA. Slab fractures of the third carpal bone in Standardbreds and Thoroughbreds: 155 cases (1977-1984). *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193 (3): 353-358.
85. Stick JA, Borg LA, Nickels FA, Peloso JG, Perau DL. Arthroscopic removal of an osteochondral fragment from the caudal pouch of the lateral femorotibial joint in a colt. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200 (11): 1695-1697.
86. Temenoff JS and Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(5): 431- 440.
87. Textor JA, Nixon AJ, Lumsden J, Ducharme NG. Subchondral cystic lesions of the proximal extremity of the tibia in horses: 12 cases (1983-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 408-413.

88. Tins BJ, McCall IW, Takahashi T, Cassar-Pullicino V, Roberts S, Ashton B, Richardson J. Autologous chondrocyte implantation in knee joint: MR imaging and histologic features at 1-year follow-up. *Radiology* 2005; 234: 501-508.
89. Vacanti JP and Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999; (354 Supp) I: 132-134.
90. Vachon AM, McIlwraith CW, Powers BE, McFadden PR, Amiel D. Morphologic and biochemical study of sternal cartilage autografts for resurfacing induced osteochondral defects in horses. *American Journal of Veterinary Research* 1992; 53 (6): 1038 - 1047.
91. Vail TB, McIlwraith CW. Arthroscopic removal of an osteochondral fragment from the middle phalanx of a horse. *Vet Surg* 1992; 21 (4): 269-272.
92. Van den Berg WB. Growth factors and cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; (391 Suppl): 244 - 250.
93. Van der Kraan PM, Buma P, Van Kuppevelt T, Van den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002; 10: 631-637.
94. Wakitani S, Goto T, Pineda S, Young R, Mansour J, Caplan A, Goldberg V. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of Bone and Joint Surgery, American* 1994; 76: 579 - 592.
95. Walmsley JP. Fracture of the intercondylar eminence of the tibia treated by arthroscopic internal fixation. *Equine Vet J* 1997; 29: 148-150.

96. Walmsley JP: Arthroscopic examination and surgery. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, Bayly W. Equine sports medicine and surgery. London: Saunders; 2004; 188-209.
97. Wamsley JP, Phillips TJ, Townsend HGG. Meniscal tears in horses: an evaluation of clinical signs and arthroscopic treatment of 80 cases. Equine Vet J 2003; 35: 402-406.
98. Watanabe M, Takeda S: The 21 arthroscope. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi 1960; 34: 1041.
99. Wisner AB. Surgical removal of an avulsion fracture of the stifle joint. Equine Vet Med Surg 1979; 3: 337-339.
100. Woodie JB, Ruggles AJ, Bertone AL, *et al.* Apical fracture of the proximal sesamoid bone in Standardbred horses: 43 cases (1990-1996). J Am Vet Med Assoc 1999; 214 (11): 1653-1656.
101. Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng Ch. TGF- β /Smad 3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. The Journal of Cell Biology 2001; 153 (1): 35 - 46.