



01674

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA,
ARTROSCOPIA E HISTOLOGÍA
DE DEFECTOS CONDRALES EN CABALLOS,
REPARADOS MEDIANTE TÉCNICAS
DE INGENIERÍA DE TEJIDOS**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JOSÉ GERMÁN LOMBARDERO GOLDARACENA

TUTOR:

DR. JOSÉ CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEÓN

COMITE TUTORAL:

DRA. HILDA VILLEGAS CASTREJÓN

DR. ENRIQUE MARTÍN ABURTO FERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

2005

m341270



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo académico.

NOMBRE: José Germán Lombardero Goldaracena

FECHA: 22 02 05

FIRMA: [Firma manuscrita]

[Firma manuscrita]

JOSÉ GERMÁN LOMBARDERO GOLDARACENA

DEDICATORIAS

A mi esposa Iliana y a mi hijo José Emiliano....Con todo mi amor

A mi querido amigo y colega Fausto Rodríguez....Descanse en paz

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM
A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia FMVZ
Al Centro Nacional de Rehabilitación CNR de la Secretaría de Salud

Y a los que a continuación menciono:

Dr. José Clemente Ibarra Ponce de León - Tutor principal y Director de tesis
Dr. Enrique Martín Aburto Fernández - Comité Tutorial FMVZ-UNAM
Dra. Hilda Villegas Castrejón - Comité Tutorial CNR
Dr. Leopoldo Paasch - Responsable del proyecto PAPIIT-UNAM
MVZ MSc María Masri Daba - Co-responsable del proyecto PAPIIT-UNAM
Biol. MC Cristina Velasquillo Martínez - Laboratorio de Ingeniería de Tejidos CNR
Biol. Valentín Martínez López - Laboratorio de Ingeniería de Tejidos CNR
Ing. MSc Ivette Quiñones - Ingeniería Biomédica CNR
Dr. Andrés Gutiérrez y su personal - Laboratorio de Terapia Celular CNR
Dr. Reyes, Dr. Téliz y Técnicos Radiólogos - Unidad de Resonancia Magnética CNR
MVZ Hugo Lecona y su personal de Servicio Social - Bioterio CNR
Dr. Saúl Renán León Hernández- División de Enseñanza CNR
Dra. Erendira Estrada y Técnicos: Enrique y Nayeli - Departamento de Patología CNR
Investigadores: Rosario, Lily, Blanca, Alma y Jaime - Departamento de Morfología CNR
Drs: Pérez Jiménez, Almazán, Encalada, Cruz.; y Vero - Servicio de Artroscopia CNR
MVZ MSc Raúl Armendáriz Félix y Dr. Mario Pérez Martínez - Sinodales
MVZ MSc Alejandro Rodríguez, Clínicos, Residentes y demás personal - Depto. Equinos FMVZ
Estudiantes: Honorarios, PPS, Estancias, Especialidad, Servicio Social - Depto. Equinos FMVZ
Dra. Aline Schuneman, MVZ MC Mariano Hernández y demás personal de DS-ILPH-UNAM
Dr. Fernando Constantino, Don Aureliano- Departamento de Patología FMVZ
A mis compañeros de la Policía Montada: Javier, Sigler, Marco y Vicente
A mis Profesores, a mis compañeras Elizabeth, Simone y Aytzee, a mi amigo Pepe Neyra
A Dios y a la Virgen, a mis Padres y Hermanos, a mi Esposa y mi Hijo, a mis Amigos...

Gracias a todos por hacer posible este trabajo !

CONTENIDO	Páginas
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Biología tisular del cartílago articular	5
2.1.1 Histogénesis del cartílago articular	5
2.2 Células mesenquimales	5
2.3 Generalidades del cartílago articular	6
2.4 Matriz extracelular (MEC)	6
2.4.1 Colágena	7
2.4.2 Proteoglicanos	8
2.4.2.1 Agregán	9
2.4.2.2 Ácido hialurónico	9
2.4.3 Proteínas no colágenas	9
2.5 El cartílago articular como un elemento mecánico	10
2.6 Histología del cartílago articular	11
2.7 Fibrocartílago	12
2.8 Nutrición del cartílago articular	13
2.9 Metabolismo de los condrocitos	14
2.10 Recambio de la matriz extracelular (MEC) del cartílago	14
2.11 Patobiología del cartílago artrósico y osteoartritis	15
2.12 Tipos de lesiones en el cartílago articular y su reparación natural	16

2.13 Estrategias en la reconstrucción de una superficie articular	18
2.13.1 Técnicas quirúrgicas basadas en la actividad de la médula ósea	19
2.13.2 Injertos osteocondrales	21
2.13.3 Injertos con tejidos de origen no articular	23
2.13.4 Implante de condrocitos	24
2.14 Ingeniería de tejidos	26
2.14.1 Polímeros naturales	28
2.14.2 Polímeros sintéticos	29
2.14.3 Uso de bioreactores en la ingeniería de tejidos	31
2.15 Evaluación del cartílago articular	31
2.15.1 Resonancia magnética	31
2.15.2 Técnicas histológico-histoquímicas	32
2.15.2.1 Tinción con hematoxilina y eosina (HyE)	33
2.15.2.2 Tinción tricrómica de Masson	33
2.15.2.3 Tinción con azul alciano	33
2.15.2.4 Tinción con safranina-O	33
III. HIPÓTESIS	34
IV. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo general	35
4.2 Objetivos específicos	35
V. MATERIAL Y MÉTODOS	36
5.1 Manejo individual y cuidados preoperatorios	36
5.2 Protocolo de anestesia	37

5.3	Procedimiento quirúrgico artroscópico	37
5.3.1	Toma de la muestra osteocondral para el cultivo de condrocitos del cartílago articular	37
5.4	Protocolo para el procesamiento del cartílago articular	39
5.5	Construcción de un andamio o matriz (copolímero) para las células	40
5.6	Siembra de las células sobre el copolímero (PGLA)-Formación del implante (constructo)	41
5.7	Implantación artroscópica del constructo en la babilla experimental	41
5.8	Cuidados y manejo posoperatorio	42
5.9	Evaluación del tejido de reparación	43
5.9.1	Evaluación por resonancia magnética	43
5.9.2	Evaluación artroscópica	44
5.9.3	Evaluación histológica	44
5.10	Protocolo para el procesamiento del tejido de reparación obtenido	45
5.10.1	Tinción con hematoxilina y eosina (HyE)	46
5.10.2	Tinción con safranina-O	46
5.10.3	Tinción tricrómica de Masson	46
5.10.4	Tinción con azul alciano, pH 1.0	47
5.11	Análisis estadístico	47

VI. RESULTADOS	48
6.1 Evaluación por resonancia magnética del tejido de reparación	48
6.1.2 Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación por resonancia magnética del tejido de reparación	54
6.2 Evaluación por artroscopía del tejido de reparación	55
6.2.1 Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación artroscópica del tejido de reparación	61
6.3 Evaluación histológica del tejido de reparación	62
6.3.1 Resultados por tinciones	68
6.3.2 Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación histológica del tejido de reparación	69
6.4 Resultados de los tres diferentes tipos de evaluaciones del tejido de reparación	69
6.5 Análisis estadístico	75
VII. DISCUSIÓN	81
VIII. LITERATURA CITADA	89

RESUMEN

Los problemas ortopédicos en la especie equina son la causa número uno de invalidez y retiro prematuro de cualquier actividad zootécnica. La osteoartritis es la enfermedad articular que se caracteriza por la pérdida progresiva del cartílago articular, el cual es incapaz de regenerarse en forma natural. Se han intentado diferentes alternativas de tratamiento con la finalidad de restaurar una superficie articular dañada. Sin embargo, los resultados clínicos en caballos no ofrecen mejoría a largo plazo. La ingeniería de tejidos brinda mejores expectativas para la reparación condral. El objetivo de este estudio fue evaluar por medio de resonancia magnética, artroscopía e histología a un tejido de reparación, obtenido de la implantación de condrocitos autólogos sobre un copolímero sintético biodegradable (autoinjerto) en una lesión condral. Se utilizaron 5 caballos, a quienes se les creó una lesión osteocondral en la tróclea femoral medial de la babilla izquierda, que sirvió como control, mientras que en la babilla derecha se creó una lesión condral de espesor total, que fue reparada artroscópicamente con el injerto. El tejido de reparación fue evaluado a las 8 semanas posteriores a la implantación. Los resultados de la evaluación por resonancia magnética y artroscopía fueron superiores en el grupo experimental. De acuerdo a la evaluación histológica, tanto en el grupo experimental como en el control, se obtuvo un tejido conectivo fibroso de reparación. El resultado global demostró que con las 3 evaluaciones, el grupo experimental superó al control, lo cual fue estadísticamente significativo. En ninguna de las investigaciones que a la fecha se han hecho con caballos y otras especies, se ha podido demostrar la regeneración artificial del cartílago articular. Con las técnicas de ingeniería de tejidos empleadas en esta investigación, fue posible inducir la formación de un tejido fibroso de reparación en lesiones condrales de la babilla equina.

Palabras clave: Ingeniería de tejidos, cartílago articular, artroscopía, reparación condral, caballo.

SUMMARY

Equine orthopedic problems are the first cause of disability and premature retirement of any activity. Osteoarthritis is a joint disease that is characterized by progressive loss of articular cartilage, which is unable to undergo spontaneous repair after injury. Different treatment alternatives have been attempted in order to resurface damaged articular surface. However, clinical results in horses do not offer long term improvement. Tissue engineering offers a potential new alternative for cartilage repair. The objective of this study was to evaluate by magnetic resonance imaging (MRI), arthroscopy and histology the repair tissue obtained with autologous chondrocytes and biodegradable synthetic polymers in a chondral lesion. Five horses were used. An osteochondral defect was created in each animal in the medial femoral trochlea of left stifle joint. Chondrocytes were isolated from an osteochondral plug. A full thickness chondral defect was then created on the right stifle joint and was repaired arthroscopically using autologous cells seeded onto a biodegradable polymer. Repair tissue was evaluated 8 weeks after implantation of the cell-polymer construct. MRI and arthroscopic evaluation results were graded higher in experimental group than controls. Histological evaluation reported fibrous connective repair tissue in both groups. Results in the experimental group was graded higher than control group in a statistically significant manner. Tissue engineering techniques used in this study induced the formation of fibrous repair tissue in chondral defects of horse stifle joint.

Key words: Tissue engineering, articular cartilage, arthroscopy, chondral repair, horse.

EVALUACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA, ARTROSCOPIA E HISTOLOGÍA DE DEFECTOS CONDRALES EN CABALLOS, REPARADOS MEDIANTE TÉCNICAS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS

I. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre ha considerado al caballo como un animal doméstico de estima, gracias a su noble temperamento y desempeño de su sistema de locomoción, el cual ha sido aprovechado para desarrollar distintas actividades, tanto de trabajo y transporte, como de esparcimiento y deporte.

De acuerdo con datos presentados en 1996 por el Consejo Americano del Caballo sobre el impacto económico de la industria equina en los Estados Unidos de América, se menciona que son generados alrededor de 25 billones de dólares anualmente en negocios relacionados con esta especie. Algunos estudios epidemiológicos han determinado que las claudicaciones en los caballos pura sangre de carreras, son la principal causa de desecho y retiro prematuro (Fubini *et al.*, 1999; Frisbie *et al.*, 2000).

La enfermedad articular es la causa más común de claudicación en el equino y representa un gran porcentaje en la casuística de los veterinarios dedicados a dicha especie (Schneider *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002).

Las lesiones articulares son la causa número uno de discapacidad entre los atletas humanos y equinos. En los caballos, tales lesiones ocurren durante el entrenamiento o las competencias, como resultado de estrés biomecánico de intensidad, duración y frecuencia anormal, sobre los tejidos que conforman las articulaciones sinoviales (McIlwraith, 1996). Una secuela común al daño articular es la pérdida del cartílago articular, lo que conduce a corto plazo a la presencia de dolor y disfunción articular (Frisbie *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Frisbie *et al.*, 1999; Fortier *et al.*, 2002; Van der Kraan *et al.*, 2002).

Históricamente, desde los tiempos de Hipócrates hasta la actualidad, está universalmente aceptado que una vez destruido el cartílago articular no hay forma de recuperarlo, por lo que ha sido considerado como un tejido inerte cuando se encuentra en estado adulto (Brittberg *et al.*, 1994; Ochi *et al.*, 2002).

El cartílago articular tiene muy limitada la capacidad de reparación intrínseca espontánea y al perderse, es incapaz de regenerarse (Vachon *et al.*, 1989; May *et al.*, 1992; Schultz *et al.*, 2000; Fortier *et al.*, 2002; Van der Kraan *et al.*, 2002; Hidaka *et al.*, 2003; Litzke *et al.*, 2004). El daño al cartílago puede ser causado por el impacto agudo o repetitivo sobre el mismo, así como por las fuerzas de carga y torsión que se ejercen en una articulación sinovial (Buckwalter 1998; Markel 2002; Van der Kraan *et al.*, 2002). La respuesta del cartílago articular normal al trauma o a la degeneración, frecuentemente resulta en una reparación deficiente (Desjardins *et al.*, 1991^a; Fortier *et al.*, 2002) y los tratamientos actuales en medicina veterinaria son insuficientes (Barnewitz *et al.*, 2003).

Los defectos o lesiones focales del cartílago articular ocurren frecuentemente como resultado de trauma u osteocondritis disecante idiopática (Hidaka *et al.*, 2003).

Las características bioquímicas, morfológicas y avasculares del cartílago articular, impiden su regeneración y la reparación satisfactoria de las lesiones a largo plazo, además de que en dicho tejido no se lleva a cabo un proceso de reparación normal como sucede en cualquiera de los otros tejidos, posterior a una respuesta inflamatoria (Mankin 1974a; Kold y Hickman 1986; Wakitani *et al.*, 1994; Frenkel y Di Cesare 1999; Schenck 2001, Ochi *et al.*, 2002).

La biología del cartílago articular equino es similar a la del cartílago humano, pero es totalmente diferente a la del cartílago de los animales de laboratorio, como es el caso del conejo, en el cual la reparación de las lesiones condrales es exuberante y frecuentemente completa (Hurtig *et al.*, 2001).

Al ocurrir una lesión y perderse el cartílago hialino de las superficies articulares, éste puede ser reemplazado en forma natural por cualquiera de los dos tejidos de reparación: fibrocartílago o tejido fibroso (Chen *et al.*, 1999). Tales tejidos no son capaces de soportar carga articular intensa y uso constante, por lo que eventualmente se desprenden y las lesiones aparecen nuevamente en el mismo sitio, dejando expuesto al hueso subcondral y ocasionando dolor articular crónico y claudicación (Vachon *et al.*, 1991b; Vachon *et al.*, 1992; McIlwraith 1996; Frenkel y Di Cesare 1999; Ochi *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista ortopédico, esta aceptado que tanto la artritis traumática aguda como la crónica son capaces de desencadenar una osteoartritis temprana (Jobb and Kennedy 1985; Brittberg *et al.*, 1994; Dabareiner *et al.*, 1996; Buckwalter 1997; Frisbie *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1997; Fortier *et al.*, 2002). Dicha enfermedad posee una alta morbilidad y es considerada como un problema importante de índole económico y social en equinos y humanos (Frisbie *et al.*, 2002; Goodrich *et al.*, 2003), siendo la enfermedad no inflamatoria más común de las articulaciones sinoviales (Mankin 1974b; Yang *et al.*, 2001). Otras de las causas que predisponen a la aparición de la osteoartritis en caballos son: osteocondrosis, defectos de conformación, desórdenes del desarrollo, infección articular, fractura articular, edad del cartílago y corticosteroides intra-articulares administrados inapropiadamente, entre otros (McIlwraith 1996; Frisbie y Nixon 1997). Además, la relación entre la edad avanzada del paciente y la incidencia de osteoartritis ha sido ampliamente aceptada (Morris y Treadwell 1994).

El concepto de osteoartritis es considerado como un problema de "uso y desgaste articular" (May *et al.*, 1992), siendo la enfermedad número uno de los trastornos del sistema músculo-esquelético en los caballos atletas (Kawcak *et al.*, 2001). Dicho padecimiento involucra la degeneración progresiva de la matriz del cartílago articular, conduciendo a la pérdida de su función mecánica. El proceso degenerativo es irreversible y su patogénesis aún es un enigma para la medicina (Mankin 1974b; Jobb and Kennedy 1985).

En un estudio posmortem donde se evaluaron aleatoriamente 72 articulaciones de caballos de todo tipo, se encontró que el 35% de ellas tuvo evidencia visible de daño al cartílago articular, compatible con osteoartritis (Morris y Treadwell 1994).

Este tipo de enfermedad articular degenerativa (osteoartritis) se caracteriza por signos de dolor, claudicación, deformación y disminución en el grado de movilidad articular (Morris y Treadwell 1994; Sun *et al.*, 2002). Las lesiones más comunes de la osteoartritis son: erosión progresiva del cartílago articular, esclerosis en el hueso subcondral y formación de osteofitos en los márgenes articulares. Todo lo anterior ocasiona que la articulación quede imposibilitada parcial o totalmente, desde el punto de vista funcional (Mankin 1974b; Jobb and Kennedy 1985; Poole 1999; Frisbie *et al.*, 2000; Sulzbacher 2000; Temenoff y Mikos 2000; Kawcak *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001).

Una vez que los caballos se ven afectados con la osteoartritis, la habilidad de éstos para mantener su desempeño atlético se ve fuertemente impedida (Frisbie *et al.*, 2002), por lo que la osteoartritis es una causa importante de invalidez y desecho para cualquier actividad zootécnica del equino (Kawcak *et al.*, 2001; Barnewitz *et al.*, 2003).

En la mayoría de los casos, la osteoartritis aparece de manera insidiosa sin aparente causa inicial. En el caso de una enfermedad sistémica relacionada o trauma articular, la destrucción del cartílago es considerada como una osteoartritis secundaria. La patogénesis de la osteoartritis primaria sugiere una enfermedad intrínseca del cartílago en el cual las alteraciones bioquímicas y metabólicas resultan en su degeneración y destrucción. El evento preciso que conduce a esos cambios y su mecanismo molecular aún se desconocen (Sulzbacher 2000; Yang *et al.*, 2001).

El caballo es una de las especies que puede desarrollar osteoartritis idiopática y se presume que es causada por una combinación de factores desencadenantes, más que por una simple causa predisponente como trauma, inestabilidad articular o artritis química (Morris y Treadwell 1994).

Una de las tareas más importantes en la investigación del cartílago es el entender el mecanismo de la falla mecánica del tejido, que ocurre en la osteoartritis.

Debido a que en el pasado la osteoartritis era clasificada como un desorden simplemente mecánico de desgaste y erosión del cartílago articular, solamente los analgésicos y anti-inflamatorios eran prescritos como tratamiento paliativo (Polisson, 2001).

Uno de los métodos de diagnóstico más exactos para detectar lesiones del cartílago articular es la evaluación artroscópica de la articulación (Dabareiner *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1997).

Se han desarrollado numerosos tratamientos médicos para prevenir la osteoartritis o minimizar los signos clínicos asociados, con la finalidad de permitir que los caballos sigan trabajando (Markel, 2002). Algunas terapias en contra de la osteoartritis están encaminadas hacia la disminución de la inflamación articular (Frisbie *et al.*, 1997). Desde 1955 los corticoesteroides intra-articulares han sido usados en el tratamiento de la enfermedad articular traumática y hasta la fecha se han venido utilizando comúnmente en la medicina equina. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que aún existen considerables controversias sobre el relativo riesgo o beneficio que pueden causar en el cartílago articular.

La combinación de los corticoesteroides con el ácido hialurónico intra-articular (Markel, 2002) y el uso de glicosaminoglicanos orales y sistémicos, se han utilizado desde hace algunos años como una alternativa de tratamiento médico para la osteoartritis en caballos; sin embargo, los resultados no han sido totalmente satisfactorios ya que no detienen la degeneración del cartílago, ni reparan las lesiones (McIlwraith 1996; Frisbie y Nixon 1997; Frisbie *et al.*, 1997; Frisbie *et al.*, 2000).

A lo largo del tiempo se han intentado diferentes tipos de tratamiento quirúrgico para defectos condrales y osteocondrales en animales de experimentación, caballos y humanos, encaminados a estimular y modular la regeneración del cartílago articular (Fortier *et al.*, 2002; Goodrich *et al.*, 2003). Uno de los criterios más importantes en la reparación exitosa del cartílago es obtener un tejido de reparación que tenga propiedades biomecánicas similares a las del cartílago articular normal (Ochi *et al.*, 2004).

Desde hace varios años se han desarrollado algunas técnicas de cirugía articular en caballos con la finalidad de reparar lesiones de una superficie articular (Buckwalter, 1998). Entre dichas técnicas destacan las siguientes: estimulación al hueso subcondral y a la médula ósea (Vachon *et al.*, 1986), implante de autoinjertos y aloinjertos condrales y osteocondrales, así como el trasplante de condrocitos autólogos (Litzke *et al.*, 2004; Ochi *et al.*, 2004). Sin embargo, tales alternativas quirúrgicas ofrecen resultados deficientes ya que es frecuente que el tejido nuevo no se integre a la zona adyacente al cartílago lesionado, debido a las propiedades antiadhesivas de la matriz extracelular del cartílago (Fortier *et al.*, 2002). Desafortunadamente, aún no existe ningún tipo de tratamiento universalmente aceptado que sea capaz de inducir la regeneración total del cartílago articular para la reparación satisfactoria de las lesiones a largo plazo, por lo que sigue siendo un reto para la ortopedia (Shapiro *et al.*, 1993; Brittberg *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1994; Blevins 1998; Frisbie *et al.*, 1999; Hunzinker 2001; Fortier *et al.*, 2002; Hidaka *et al.*, 2003; Ochi *et al.*, 2004).

Por otro lado, la ingeniería de tejidos ofrece mejores expectativas de tratamiento para los defectos condrales mediante la utilización de polímeros tridimensionales, biológicos y sintéticos, que sirven como una estructura de transporte y sostén para células de cartílago articular en cultivo (Vachon *et al.*, 1992; Hurtig *et al.*, 1998; Frisbie *et al.*, 1999; Athanasiou *et al.*, 2001; Hurtig *et al.*, 2001; Fortier *et al.*, 2002; Hardingham *et al.*, 2002). Sin embargo, el reto de construir cartílago *in vitro* es el producir un tejido con la estructura y propiedades necesarias para que pueda ser implantado sobre una lesión dentro de una articulación. Dicho neo-tejido deberá inducir una reparación natural hasta integrarse totalmente al cartílago nativo del paciente (Jorgensen *et al.*, 2001; Hardingham *et al.*, 2002).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Biología tisular del cartílago articular

2.1.1 Histogénesis del cartílago articular

El cartílago articular tiene su origen en el mesodermo y se desarrolla a partir de las células del mesénquima. Durante la vida fetal se forman cúmulos densos de células mesenquimales denominados centros de condricación. Durante la diferenciación, las células se agrandan y comienzan a dividir la sustancia fundamental y el tropocolágeno, el cual se polimeriza extracelularmente formando fibras de colágena. A medida que aumenta la cantidad de matriz, las células se agrupan en lagunas y se diferencian a condrocitos, los cuales son rodeados por una capa fibrosa denominada pericondrio, formada por fibroblastos y fibras de colágena (Ross y Reith 1987; Geneser 1993; Fawcett 1995; Fortier *et al.*, 1998a).

En el centro de condricación se produce un tipo de crecimiento del cartílago joven denominado crecimiento intersticial, en el cual se llevan a cabo divisiones mitóticas de las células cartilaginosas ya diferenciadas (condroblastos). Tras una nueva división de las células hijas, se forma un pequeño grupo de 4 células que a su vez también pueden dividirse. Cada uno de los pequeños grupos formados, es denominado grupo isógeno, y contiene células provenientes de un solo condrocito. Este tipo de crecimiento intersticial del cartílago se da en las placas de crecimiento de los huesos de animales jóvenes, durante su desarrollo longitudinal. Por otro lado, existe otra forma de crecimiento del cartílago denominada crecimiento aposicional, el cual se produce por la diferenciación a condrocitos de varias células mesenquimales que rodean al cartílago en formación. Después de la formación del pericondrio, en su interior o capa condrogénica, se produce la diferenciación de células a condroblastos y condrocitos. Durante toda la vida fetal y el periodo de crecimiento del animal, se da el crecimiento aposicional constante desde el pericondrio, con un aumento de tamaño de la masa del cartílago (Mankin 1974a; Ross y Reith 1987; Geneser 1993; Fawcett 1995; Temenoff y Mikos 2000).

2.2 Células mesenquimales

Las células mesenquimales son las células estromales de la médula ósea y a diferencia de las células hematopoyéticas pluripotenciales, tienen la capacidad de diferenciarse en condrocitos (Van der Kraan *et al.*, 2002), miocitos, osteoblastos, fibroblastos y adipocitos; dependiendo de la influencia de las condiciones de crecimiento, vascularidad, oxigenación del tejido, señalización celular y fuerzas mecánicas (Schultz *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 2001). En el animal adulto, a partir de las células mesenquimales se originan las células del cartílago articular o condrocitos, quienes constituyen una pequeña proporción del tejido en volumen (Mankin 1974a; Geneser 1993; Fawcett 1995; Temenoff y Mikos 2000; Van der Kraan *et al.*, 2002).

En los caballos, el esternón es una fuente rica de células mesenquimales, las cuales al ser aspiradas y cultivadas en fibrina de manera tridimensional, demuestran una producción activa de proteoglicanos, ya que se diferencian en condrocitos por el efecto de algunos factores de crecimiento. Dichas células pueden ser una fuente importante de material biológico para inducir la neocondrogénesis en defectos de cartílago articular (Fortier., *et al* 1998a; Schultz *et al.*, 2000; Van der Kraan *et al.*, 2002).

2.3 Generalidades del cartílago articular

El cartílago articular hialino es un tipo de tejido conectivo de sostén altamente especializado, con una marcada durabilidad y recubre las superficies articulares de los huesos en las articulaciones sinoviales o diartroidales (Hayes *et al.*, 2001; Van der Kraan *et al.*, 2002). Sus propiedades físicas, bioquímicas y biomecánicas son únicas, además de ser un tejido avascular, aneural y alinfático (Mankin 1974a; Desjardins *et al.*, 1991b; Geneser 1993; Howard *et al.*, 1994; Fawcett 1995; Hardingham *et al.*, 2002; Ochi *et al.*, 2004). El cartílago articular normal y sano es de un color blanco azulado, brillante, translúcido y con una superficie lisa (Hurtig *et al.*, 1998; Rechenberg *et al.*, 2000).

Al interactuar con el líquido sinovial, el cartílago es el responsable de dar lubricación y rigidez comprensiva a la articulación en movimiento, respondiendo visco-elásticamente a la carga mecánica (Kuettner *et al.*, 1982a; Buckwalter 1983; Desjardins *et al.*, 1991b).

Los condrocitos son las células típicas del cartílago (Jorgensen *et al.*, 2001), quienes se alojan en pequeñas cavidades o lagunas, producen su propia matriz extracelular (MEC) y reemplazan a las moléculas de la matriz degradada con el fin de mantener el tamaño correcto y las propiedades mecánicas del tejido (Mankin 1974a; Kold y Hickman 1986; Geneser 1993; Fawcett 1995; Temenoff y Mikos 2000; Schenck 2001; Hardingham *et al.*, 2002).

2.4 Matriz extracelular (MEC)

A nivel supramolecular la MEC cuenta con una porción fibrilar formada por una red de fibras de colágena tipo II, VI, IX, X y XI (Ross y Reith 1987; Geneser 1993; Gartner y Hiatt 1994; Fawcett 1995; Temenoff y Mikos 2000; Van der Kraan *et al.*, 2002).

La porción no fibrilar está formada por monómeros sulfatados de agregán (proteoglicano) unidos al ácido hialurónico por una proteína de unión, formando así los agregados proteoglicanos (Jorgensen *et al.*, 2001; Van der Kraan *et al.*, 2002). No existe ningún tipo de enlace químico entre las fibras de colágena y los proteoglicanos, por lo que la agregación de los últimos evita que se salgan de la MEC cuando se ejerce una carga articular (Temenoff y Mikos 2000; Hardingham *et al.*, 2002).

Las macromoléculas estructurales como la colágena tipo II y los proteoglicanos, representan la expresión bioquímica del fenotipo del condrocito, el cual establece un microambiente especializado denominado matriz territorial y en contraste con la mayoría de células de otros tejidos, no existe contacto directo entre célula y célula (Kuettnner *et al.*, 1982a).

La principal función del cartilago articular depende del estado de hidratación y del arreglo estructural de su MEC (Kuettnner *et al.*, 1982b).

La apariencia traslúcida como de vidrio del cartilago hialino (Temenoff y Mikos 2000), se debe principalmente a que es un tejido hiperhidratado por su alto contenido de agua (70% de su peso en cartilago maduro sano y 80% en cartilago de neonato) y a su muy fina estructura de una red de fibras de colágena. Sobre su peso en base seca, el cartilago articular contiene aproximadamente 50% de colágena, 35% de proteoglicanos, 10% de glicoproteínas (proteinasas y sus inhibidores, factores de crecimiento, lisozima, fibronectina, condronectina, proteína oligomérica de cartilago, etc.), 3% de aceite mineral, 1% de lípidos y 1-12% de condrocitos (Mankin 1974a; Geneser 1993; Fawcett 1995; Buckwalter 1997).

El líquido tisular es una parte esencial del cartilago hialino articular. Además de su contenido de agua, también contiene gases, metabolitos y una gran cantidad de cationes para balancear las cargas negativas de los glicosaminoglicanos de la matriz extracelular. Existe un intercambio de nutrientes, oxígeno y productos de desecho entre dicho líquido tisular y el líquido sinovial (Temenoff y Mikos 2000).

Microscópicamente el cartilago articular es heterogéneo con variación en microestructura entre diferentes articulaciones, áreas de carga y de no carga, así como entre animales jóvenes y adultos (Geneser, 1993).

Las interacciones entre la matriz extracelular y los condrocitos son responsables de las propiedades biológicas y mecánicas del cartilago articular (Huber *et al.*, 2000).

2.4.1 Colágena

La colágena es una escleroproteína, compuesta en un tercio por glicina y en un cuarto o más por prolina, y presenta además una estructura fibrosa. La mayoría de la colágena en el cartilago articular hialino del adulto es del tipo II (90-95% del total) y aparece en todas sus zonas (Roberts *et al.*, 2002; Van der Kraan *et al.*, 2002). Existen pequeñas cantidades de los tipos VI, IX, XI, XII, y XIV. La colágena tipo II es un homotrímero y la molécula está formada por 3 cadenas α -1 unidas covalentemente. Este tipo de colágena tiene una alta cantidad de grupos de carbohidratos unidos, lo que le permite una mayor interacción con el agua a diferencia de las otras colágenas. La colágena tipo IX y XI, junto con la del tipo II, forman fibras que se enredan entre sí para formar una malla. Esta organización provee la fuerza tensil al cartilago articular, además de que físicamente atrapa a las otras macromoléculas como son los proteoglicanos.

La colágena tipo X es detectada en células hipertróficas, o en el cartílago fisiario durante el desarrollo, además de que en el cartílago adulto se encuentra solamente cerca del área de la matriz calcificada y aparece también en el cartílago artrósico (Mankin 1974a; Geneser 1993; Fawcett 1995; Buckwalter 1997; Temenoff y Mikos 2000; Semevolos *et al.*, 2001).

2.4.2 Proteoglicanos

Los proteoglicanos del cartílago articular están formados por una serie de compuestos solubles conjugados de alto peso molecular (Mankin 1974a), siendo éstos otro de los componentes sólidos mayores de la matriz extracelular. Tales macromoléculas están formadas por cadenas de polisacáridos o glucosaminoglicanos (95%) unidos a una proteína central (5%) por enlaces covalentes (Van der Kraan *et al.*, 2002). Los glucosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos aniónicos no ramificados, hechos de disacáridos que se repiten. Uno de estos disacáridos es siempre una hexosamina, o sea un azúcar con un grupo amino (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina) que normalmente está sulfatado. El otro azúcar, típicamente es un ácido urónico (idurónico y glucurónico) con un grupo carboxilo o también puede ser una galactosa. Los grupos sulfato y carboxilo están cargados negativamente, de manera que los GAGs tienden a repelerse entre sí y con otros aniones, mientras que atraen cationes para facilitar su interacción con el agua. Algunos de los GAGs que generalmente son encontrados en el cartílago articular son: ácido hialurónico (no sulfatado), condroitín 6-sulfato, condroitín 4-sulfato, keratán sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato. El condroitín sulfato y el keratán sulfato también aparecen en el fibrocartílago pero en menor cantidad (Banks 1993; Stevens y Lowe 1995; Gartner y Hiatt 1997; Geneser 2000; Temenoff y Mikos 2000; Roberts *et al.*, 2002). El condroitín 6-sulfato es el principal de todos los GAGs, además de ser el más prevalente en el cartílago articular inmaduro. Su estructura posee un amino-azúcar (n-acetil-galactosamina) y otro azúcar (ácido glucurónico) unidos por un enlace 1-3 O-glicósido. Por otro lado, el keratán sulfato se encuentra formado por una galactosa y una n-acetil-glucosamina sulfatada, predominando éste en el cartílago maduro.

Los proteoglicanos poseen sitios de fijación para ciertas moléculas de señalamiento, como lo es el factor de crecimiento transformante beta TGF- β (Van der Kraan *et al.*, 2002). Existen además otro tipo de proteoglicanos más pequeños como: decorin, biglican y fibromodulina. Se cree que estos últimos juegan un papel importante en la función celular y en la organización de las fibras de colágena en la matriz (Mankin 1974a; Geneser 1993; Fawcett 1995; Temenoff y Mikos 2000). La concentración de proteoglicanos incrementa a medida que aumenta la profundidad del cartílago desde la superficie articular, sin embargo las fibras de colágena están más concentradas en la superficie, donde son requeridas para resistir la tensión cuando es aplicada una carga.

La concentración incrementada de proteoglicanos en el cartílago más profundo es probablemente requerida para resistir las fuerzas de compresión (Temenoff y Mikos 2000; Geneser 1993; Fawcett 1995; Hurtig *et al.*, 2001).

2.4.2.1 Agrecán

El agrecán es el proteoglicano más abundante e importante del cartílago articular (Van der Kraan *et al.*, 2002) y su molécula es la encargada de producir el estado de gel de la MEC (Jorgensen *et al.*, 2001). Dicho proteoglicano contiene a los principales GAGs como el condroitín y keratán sulfato, unidos a una proteína central (Roberts *et al.*, 2002).

Las moléculas de agrecán rellenan la mayoría de los espacios interfibrilares de la matriz extracelular y se cree que junto con el líquido tisular que atraen, son las principales responsables de la distribución de las fuerzas de compresión al cartílago, ya que le confieren su elasticidad y capacidad de recuperar su forma normal después de ser deformado (Geneser 2000; Temenoff y Mikos 2000).

2.4.2.2 Ácido hialurónico

El ácido hialurónico es el único GAG que no está sulfatado. Las moléculas de agrecán están unidas al ácido hialurónico por medio de una glicoproteína de unión, para formar la estructura del agregado proteoglicano (Van der Kraan *et al.*, 2002). Además, dicho ácido es capaz de lubricar las superficies articulares, ya que también es un componente del líquido sinovial (Buckwalter, 1983). En la MEC, el ácido hialurónico se puede unir a los condrocitos a través del receptor CD44 y a otras moléculas (Temenoff y Mikos 2000).

2.4.3 Proteínas no colágenas

La capacidad de las células para adherirse a los componentes producidos en su matriz interna se encuentra mediada por las glicoproteínas de adhesión. La glicoproteína de adhesión (condronectina) tiene sitios de fijación para la colágena tipo II, condroitín sulfato, ácido hialurónico e integrinas de condroblastos y condrocitos. Las integrinas son proteínas transmembranales que forman enlaces con sus ligandos, los cuales son miembros estructurales de la MEC como colágena, laminina y fibronectina. La principal función de las integrinas es enlazar al citoesqueleto con la MEC. La fibronectina y tenascina son encontradas en el cartílago articular al igual que en otros tejidos, y de la misma forma que las glicoproteínas de unión (ancorina CII y proteína oligomérica del cartílago), ayudan a estabilizar la interacción de la MEC con los condrocitos, los cuales son sujetados fuertemente a ella (Geneser 2000; Temenoff y Mikos 2000).

2.5 El cartílago articular como un elemento mecánico

El caballo es un animal cuadrúpedo grande que corre a altas velocidades y desarrolla fuerzas compresivas considerables en las articulaciones de sus miembros (Hurtig *et al.*, 2001).

El cartilago articular es indispensable para absorber el impacto durante la carga articular (Buckwalter, 1983). La densidad y fuerza del hueso subcondral se adaptan al estrés articular impuesto. El hueso subcondral provee la mayor amortiguación a la articulación debido a que es más abundante que el cartílago articular y además posee cierta elasticidad (Kawcak *et al.*, 2001).

El cartílago articular hialino provee a la articulación un movimiento estable con mucho menor fricción que cualquier reemplazo por medio de una prótesis. Dicho tejido se ha definido como un biomaterial responsable del movimiento libre de fricción en las articulaciones sinoviales (Buckwalter, 1983), gracias a que tiene un coeficiente de fricción extremadamente bajo, ya que es 100 veces menor que la fricción ejercida entre dos hielos. Además, el cartílago articular posee la habilidad de deformarse reversiblemente, gracias a su organización estructural, dándole la capacidad de amortiguación a las superficies de carga articular (Mankin 1974a; Temenoff y Mikos 2000).

Cuando una carga externa es aplicada a una articulación diartroïdal (sinovial), se genera una compleja distribución de fuerzas axiales de tensión y compresión dentro del cartilago articular (Howard *et al.*, 1994; Hayes *et al.*, 2001) y cuando éstas son excesivas se provoca daño al tejido (Dabareiner *et al.*, 1996).

Las propiedades mecánicas del cartilago articular se deben en gran medida a sus macromoléculas, estructura y organización de la MEC (Hardingham *et al.*, 2002). La interacción del agregado proteoglicano con el agua, proporciona al tejido rigidez a las fuerzas de compresión, capacidad de recuperación y probablemente su durabilidad (Buckwalter, 1997).

Existen dos mecanismos de lubricación en las articulaciones diartroïdales. El primero está dado por una delgada película de fluido sinovial en la superficie articular, formada por un mecanismo hidrodinámico o por un mecanismo de compresión, gracias a la elevada viscosidad del líquido sinovial. El segundo mecanismo de lubricación está dado por la fracción adsorbente de proteínas del líquido sinovial. Dicho líquido es un dializado del plasma sanguíneo que contiene GAGs y moléculas de glicoproteínas que son secretados dentro de la cavidad articular por la membrana sinovial (Buckwalter, 1997).

La conformación de los agregados de proteoglicanos atrapados dentro de una malla de fibras de colágena, proporciona al cartilago articular la capacidad de soportar peso, bajo compresión constante. Las cargas aplicadas a la superficie articular son compartidas, ya que las fibras de colágena dominan su comportamiento tensil, mientras que las propiedades osmóticas de los proteoglicanos proveen su resistencia a compresión volumétrica y desgaste. La rigidez compresiva del cartilago articular normal es proporcional al contenido de GAGs, y la fuerza tensil está correlacionada al contenido y orientación de las fibras de colágena (Howard *et al.*, 1994).

La capacidad de soporte del cartílago articular a la compresión está dada por la habilidad de los agregados de proteoglicanos, ya que al estar cargados negativamente sus GAGs, se crean fuerzas electrostáticas repulsivas intra e intermoleculares. Tales cargas negativas atraen cationes como sodio y calcio al espacio intramolecular y crean una presión osmótica tres veces mayor a la presión atmosférica que puede contribuir arriba de un 50 % en la rigidez contra la compresión (Dabareiner *et al.*, 1996).

Debido a las características hidrofílicas de las moléculas de proteoglicanos y de las fibras de colágena, una gran cantidad de agua es atrapada en los espacios intra e intermoleculares de la MEC del cartílago. La habilidad de mantener la hidratación bajo presión se debe al comportamiento químico de los componentes de los proteoglicanos. El agua es atraída hacia el cartílago por su alta densidad de cargas, recobrándose rápidamente la elasticidad del tejido. Una pérdida significativa de proteoglicanos de la MEC, disminuye la rigidez del cartílago e incrementa su permeabilidad (Buckwalter, 1997).

2.6 Histología del cartílago articular

En los cortes histológicos de cartílago articular, la matriz cartilaginosa parece carecer de estructura, porque la colágena aparece bajo la forma de finas fibrillas que tienen un índice de refracción muy similar al de la sustancia fundamental, por lo que se dice que las fibrillas están enmascaradas (Mainil-Varlet *et al.*, 2003). Para identificar histológicamente al cartílago articular es necesario evaluar la apariencia de sus células y de su MEC. Normalmente los condrocitos se encuentran bien desarrollados, con núcleos redondos u ovoides, y están dentro de sus lagunas (Banks 1993; Stevens y Lowe 1995; Breinan *et al.*, 1997; Gartner y Hiatt 1997; Geneser 2000).

La evaluación histológica del cartílago articular es un método muy confiable para determinar el grado de destrucción del tejido en una articulación con osteoartritis (Nebelung *et al.*, 2001).

En animales adultos, la MEC del cartílago articular se divide en 4 capas o zonas biológicas: superficial o tangencial, transicional, media o radial y calcificada; lo cual está basado en las diferencias de morfología de la matriz y su bioquímica (Hayes *et al.*, 2001). Cada zona posee los atributos necesarios para hacer al tejido en conjunto lo suficientemente resistente y durable. A su vez, en cada zona del cartílago existen 3 distintas regiones: pericelular, territorial e interterritorial. La región pericelular y territorial proveen los medios para la unión de los condrocitos a la MEC y su protección durante la carga articular. La región pericelular contiene casi exclusivamente a las proteínas de unión. Parte de la región territorial está compuesta de fibras de colágena que se siguen con la envoltura pericelular. La región interterritorial está marcada por un incremento en el diámetro de las fibras y su orientación en forma más paralela. Esta región es la principal responsable de las propiedades mecánicas del tejido (Ross y Reith 1987; Geneser 1993; Gartner y Hiatt 1994; Fawcett 1995; Temenoff y Mikos 2000; Hayes *et al.*, 2001; Hurtig *et al.*, 2001).

De las diferentes zonas del cartílago, la zona superficial es la más delgada y está formada por dos capas distintas. La primera es una lámina sin células denominada lamina splendens, donde predominan las fibras de colágena paralelas a la superficie articular y la segunda capa esta compuesta de condrocitos aplanados también paralelos a la superficie articular (Mainil-Varlet *et al.*, 2003). La MEC en la zona superficial, tiene más colágena y menos proteoglicanos que las otras zonas (Desjardins *et al.*, 1991a) y existen además grandes cantidades de fibronectina y agua.

La zona transicional es más grande que la superficial y contiene condrocitos esféricos, fibras de colágena más grandes pero en menor número, mas proteoglicanos y menos agua que la zona superficial.

La zona media o radial es generalmente la más grande y cuenta con fibras de colágena de mayor diámetro, la mayor cantidad de proteoglicanos y la menor cantidad de agua. En esta zona las células son más grandes, redondeadas y están arregladas en columnas alineadas perpendicularmente a la superficie articular, al igual que las fibras de colágena, las cuales se extienden hacia abajo hacia un área delgada de transición, denominada *tidemark*. A partir de dicha área divisoria, inicia la zona calcificada del cartílago. Esta última zona es una capa delgada de transición entre el hueso subcondral y el cartílago no calcificado, además de poseer condrocitos pequeños de poca actividad metabólica, rodeados por una MEC impregnada con cristales de hidroxapatita (Kold y Hickman 1986; Desjardins *et al.*, 1991b; Howard *et al.*, 1994; Breinan *et al.*, 1997; Temenoff y Mikos 2000; Kawcak *et al.*, 2001).

El hueso subcondral es rígido y está dividido en dos capas, la primera es una placa de hueso que separa al cartílago calcificado del espacio medular, y la segunda está formada por hueso trabecular. Finalmente, el hueso subcondral es soportado por el hueso esponjoso de la epífisis de los huesos largos (Desjardins *et al.*, 1991b; Kawcak *et al.*, 2001).

Existen canales vasculares que conectan al espacio medular del hueso trabecular con la capa calcificada de cartílago, los cuales nutren a las capas más profundas del mismo que no son alcanzadas por el líquido sinovial (Kawcak *et al.*, 2001).

2.7 Fibrocartílago

El fibrocartílago que se obtiene como tejido de reparación natural de un defecto osteocondral, no es igual al cartílago articular hialino desde el punto de vista histológico, ya que no cuenta con la arquitectura típica por zonas (Hayes *et al.*, 2001), no posee una capa calcificada, no presenta *tidemark* y tiene muy baja afinidad histoquímica por las tinciones especiales para proteoglicanos, como es el caso de la Safranina O (Vachon *et al.*, 1991b; Geneser 1993; Gartner y Hiatt 1994; Fawcett 1995).

El fibrocartilago es una forma de transición entre el tejido conectivo denso y el cartilago hialino, puesto que está compuesto por una combinación de fibroblastos, fibras de colágena tipo I y células cartilaginosas ubicadas en lagunas rodeadas por cantidades variables de matriz. A diferencia del cartilago hialino, el fibrocartilago no tiene pericondrio. Los condrocitos son pequeños y a menudo están ubicados en filas paralelas, entre los que se observan densos haces ondulantes de fibras de colágena (Ross y Reith 1987; Geneser 1993; Gartner y Hiatt 1994; Fawcett 1995). La poca durabilidad del fibrocartilago puede estar relacionada a la defectuosa e imperfecta composición bioquímica de su matriz, o a la incompleta remodelación de la interfase entre el cartilago viejo y el reparado (Hayes *et al.*, 2001). Además, el estrés articular anormal y la degeneración, asociados a una remodelación anormal del hueso subcondral y de la capa calcificada del cartilago, influyen también en la poca durabilidad del fibrocartilago (Vachon *et al.*, 1989; Frenkel y Di Cesare 1999).

Una vez que se ha formado un fibrocartilago como tejido de reparación osteocondral, los fibroblastos pueden sufrir metaplasia para semejar cartilago hialino sólo durante un período corto de tiempo. Sin embargo, las superficies articulares reparadas, al ser sometidas a un trabajo atlético, pueden provocar que el cartilago hialino metaplásico se revierta a tejido fibroso (Vachon *et al.*, 1992; McIlwraith y Nixon 1996).

El fibrocartilago tiene una cantidad de moléculas de proteoglicanos significativamente disminuida, en comparación con el cartilago hialino articular normal. Como resultado de esto, el fibrocartilago no produce una apropiada rigidez compresiva contra la carga mecánica y está sujeto a una excesiva deformación bajo carga fisiológica, lo que provoca la ruptura mecánica de la matriz del tejido reparado y eventualmente conduce a la recurrencia de la degeneración articular (Vachon *et al.*, 1989; Frenkel y Di Cesare 1999).

2.8 Nutrición del cartilago articular

Debido a que no existen vasos sanguíneos en el cartilago articular, su nutrición está dada por las sustancias que recibe a través del líquido sinovial, ya que dicho tejido es permeable al movimiento libre de sustancias. Los condrocitos de animales adultos obtienen sus nutrientes, estímulos químicos y hormonales, por difusión desde el plexo vascular sinovial, cruzan la membrana y llegan al líquido sinovial, siendo también el medio a través del cual los productos de desecho metabólico son removidos. Además, la compresión de la superficie articular y su movimiento, inducen un flujo bidireccional de solutos necesarios para la nutrición del cartilago. En el caso de los animales inmaduros, dicho sistema es diferente, ya que la capa basal del cartilago puede recibir algunos nutrientes por difusión desde el árbol vascular del hueso subcondral (Mankin 1997a; Hurtig *et al.*, 1988).

2.9 Metabolismo de los condrocitos

En general, el metabolismo del cartilago articular es lento (Hayes *et al.*, 2001). Los condrocitos sintetizan las macromoléculas de proteoglicanos y colágena que secretan al espacio extracelular, para formar y regular la propia matriz que los envuelve (MEC); esto se debe gracias a que cuentan con un retículo endoplásmico y aparato de Golgi prominentes (Chen *et al.*, 1999). Dichas células cartilaginosas utilizan para su metabolismo ambas vías degradativas, la aeróbica y la anaeróbica (Mankin 1974a, Temenoff y Mikos 2000).

Varios factores hormonales son importantes en la regulación de las actividades metabólicas de los condrocitos, donde participan la hormona del crecimiento, calcitonina y andrógenos. Por otro lado, algunos factores de crecimiento como son: el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), proteína morfogenética de hueso (BMP-2) y el factor de crecimiento epidermal, estimulan la proliferación de los condrocitos y la síntesis de colágena tipo II y proteoglicanos (Morris y Treadwell 1994; Frisbie y Nixon 1997; Rechenberg *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001).

El TGF- β 1, es un miembro de la gran superfamilia de los factores de crecimiento relacionados a la regulación del crecimiento celular y su diferenciación, además de que puede regular la expresión de genes de las moléculas estructurales de la matriz extracelular y controlar la proliferación celular, jugando un papel importante en la osteogénesis y condrogénesis (Jorgensen *et al.*, 2001). El IGF-1 juega también un papel importante en el metabolismo del cartilago y su crecimiento, ya que incrementa la proliferación celular y la síntesis de agregán y colágena, además de que modera los efectos mitogénicos (Semevolos *et al.*, 2001).

2.10 Recambio de la matriz extracelular (MEC) del cartilago

El cartilago normal se encuentra en un estado relativamente estable, ya que el proceso anabólico de síntesis de los componentes de la MEC del cartilago, está en equilibrio con el proceso catabólico de recambio normal de las moléculas de dicha matriz (Frisbie y Nixon 1997; Schultz *et al.*, 2000).

No se conoce en forma precisa como los condrocitos orquestan el recambio de la MEC, pero la carga dinámica y las citocinas como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que son producidos por las células de la membrana sinovial, han demostrado que aceleran dicho recambio, ya que influyen en la producción y activación de metaloproteinasas (MMP) por parte de los condrocitos, los cuales además expresan receptores para IL-1. Las MMP son capaces de degradar la matriz del cartilago, aunque su proceso degradativo está compensado por un inhibidor enzimático y la síntesis de factores de crecimiento (Morris y Treadwell 1994; Frisbie y Nixon 1997; Rechenberg *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001).

El recambio normal del agregán y otros proteoglicanos está regulado por las MMP de la matriz, principalmente por la MMP-3 o estromelisin.

En el cartilago articular adulto la vida media del agregán va de días a meses, mientras que la red de colágena tipo II es muy estable y dura mucho más tiempo, aunque su recambio es casi nulo y está dado por las colagenasas MMP-1 y MMP-13 que separan la triple hélice de la colágena. Además, existe otra enzima denominada gelatinasa, la cual también posee propiedades colagenolíticas (Morris y Treadwell 1994; Rechenberg *et al.*, 2000; Aigner 2002).

Algunos polipéptidos que naturalmente se producen como factores de crecimiento, juegan un papel importante en la homeostasis del cartilago articular. La actividad anabólica, como la síntesis de proteoglicanos y de diferenciación de la MEC, dada por el IGF-1 y el TGF- β , es importante al contrarrestar con la actividad catabólica y degradativa de las citocinas como: la IL-1 α , las proteasas de serina y las MMP neutrales. Además, el TGF- β incrementa la síntesis de inhibidores para estromelina (Frisbie y Nixon 1997; Frisbie *et al.*, 2000; Semevolos *et al.*, 2001).

2.11 Patobiología del cartilago artrósico y de la osteoartritis

Existen evidencias de que el cartilago artrósico es más activo metabólicamente que el cartilago normal, en lo que respecta a la síntesis de proteoglicanos, aunque estos no pueden retener suficiente agua y funcionalmente son inadecuados en términos de sujeción a la red de colágena (May *et al.*, 1992).

De acuerdo con los estudios de Aigner (2002), durante la osteoartritis los condrocitos pueden morir por apoptosis o necrosis y pueden proliferar para compensar su pérdida e incrementar su actividad sintética, aunque dichas células sufren una alteración en el perfil de expresión de genes, lo cual representa una razón potencial para que su actividad catabólica supere a la anabólica.

Los condrocitos incrementan la expresión de estromelina y activan a otras MMP's neutrales, por lo que la pérdida neta del contenido de proteoglicanos, es el sello distintivo de la osteoartritis (Mankin 1974b; Rechenberg *et al.*, 2000). Además, la IL-1 induce la desdiferenciación de los condrocitos a células similares a fibroblastos, los cuales detienen su expresión para genes de agregán y colágena tipo II, aunque son células muy activas expresando colágena I, III, y V. Los tipos de colágena I, III, VI y X, han sido encontrados en niveles elevados en el cartilago artrósico (Mankin 1974b; Kawcak *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2002).

La IL-1 que proviene de los sinoviocitos y condrocitos es considerada como el mediador catabólico predominante, responsable de la degradación del cartilago y es encontrada en el líquido sinovial de caballos con osteoartritis (Morris y Treadwell 1994; Frisbie *et al.*, 1997). Además, dicha citosina estimula la producción de las MMP's, proteasas de serina, colagenasa y plasminógeno activador de tejidos, además de inhibir la síntesis de colágena y proteoglicanos por parte de los condrocitos (Morris y Treadwell 1994; Frisbie y Nixon 1997).

Estudios *in vitro* han demostrado que la IL-1 β también estimula a los condrocitos y sinoviocitos para producir prostaglandina E2 (PGE-2), la cual funge como un mediador inflamatorio importante en el desarrollo de la patogénesis de la osteoartritis, encontrándose ésta en niveles elevados junto con el óxido nítrico y MMP's neutrales en el cartílago artrósico y líquido sinovial de articulaciones afectadas (May *et al.*, 1992; Rechenberg *et al.*, 2000).

Ha sido establecido que el óxido nítrico (ON), PGE-2 y las MMP's neutrales producidos por los sinoviocitos y condrocitos, juegan un papel clave en la cascada de la destrucción del cartílago articular al igual que en su homeostasis normal. El ON es capaz de inhibir la formación de un tejido de reparación en una lesión condral al bloquear la síntesis de MEC y la síntesis del receptor antagonista para la IL-1, además de que estimula la liberación del TNF- α por parte de los sinoviocitos durante la osteoartritis, que junto con la IL-1, incrementan la producción de gelatinasa (Rechenberg *et al.*, 2000).

Por otro lado, la formación de condrones o agregados de condrocitos es una característica histológica típica del cartílago artrósico, en un intento por recuperar al tejido que se ha degenerado (Desjardins *et al.*, 1991a).

2.12 Tipos de lesiones en el cartílago articular y su reparación natural

Según Buckwalter (1997) la frecuencia e intensidad de la carga sobre una superficie articular, las contracciones musculares que afectan la transmisión de las fuerzas a una articulación, la edad del paciente y algunas diferencias genéticamente determinadas en el cartílago articular, pueden influenciar en el riesgo, la severidad y el tipo de daño a una superficie articular. Además, se ha comprobado que el microambiente que rodea a una lesión condral, juega un papel importante en la reparación de la misma (Hurtig *et al.*, 1988).

Existen tres principales tipos de lesiones en el cartílago articular (Buckwalter, 1998):

- 1) Trastorno a la MEC, 2) Defectos de espesor parcial y 3) Defectos de espesor total con y sin daño al hueso subcondral.

En los trastornos de la MEC, si ésta es alterada por efectos físicos como un traumatismo de tipo directo, o si la lesión no es muy severa, los condrocitos que quedaron viables incrementan su actividad sintética en un intento para reparar al tejido (Brittberg *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1999; Temenoff y Mikos 2000).

En los defectos de espesor parcial, que presentan alteraciones en la superficie del cartílago, como fisuras o laceraciones que no se extienden hasta el hueso subcondral, los condrocitos cercanos al daño pueden iniciar un tipo de reparación intrínseca al reiniciar su división por mitosis y proliferar e incrementar la síntesis de ADN, colágena y proteoglicanos. Sin embargo, esta actividad es corta, limitada y no resulta en una reparación óptima del tejido, debido a la extensión y complejidad de la MEC y a otras razones que aún se desconocen (Mankin 1974a; Buckwalter 1997; Frenkel y Di Cesare 1999; Huber *et al.*, 2000; Fukui *et al.*, 2001).

Por último, en los defectos de espesor total se involucran todas las capas del cartílago llegando hasta el hueso subcondral, el cual queda expuesto. En caso de que el hueso subcondral sea lesionado y se provoque una hemorragia, el tipo de reparación es extrínseca, ya que el defecto depende de elementos mesenquimales del hueso subcondral que participan en la formación de tejido conectivo nuevo (generalmente fibrocartílago) que más tarde puede sufrir cambios metaplásicos para formar un cartílago similar al hialino (Hayes *et al.*, 2001). En algunos casos, el tejido de reparación persiste sin cambios y progresivamente se remodela para formar una superficie articular funcional, aunque en la mayoría de las lesiones osteocondrales de tamaño considerable, ese tejido de reparación comienza a mostrar evidencias de degeneración con una disminución en la cantidad de proteoglicanos de la matriz, fragmentación, fibrilación, incremento en el contenido de colágena tipo I y pérdida de células con la apariencia de condrocitos, por lo que dominan los fibroblastos en un tejido fibroso que generalmente se fragmenta y desintegra, dejando áreas de hueso subcondral expuesto. El tejido de reparación neoformado es histológicamente, histoquímicamente y biomecánicamente inferior al cartílago articular normal, por lo que no es capaz de soportar el uso y la carga constante (Desjardins *et al.*, 1991a; Brittberg *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1994; Buckwalter 1997; Temenoff y Mikos 2000).

Existe un tercer fenómeno conocido como “flujo de matriz”, el cual ha sido reportado como un contribuyente para la reparación del cartílago. En este caso se forman ondas de dicho tejido a manera de labios que surgen desde el perímetro de la lesión y migran hacia el centro del defecto (Hurtig *et al.*, 1988).

Varios factores pueden explicar porqué el cartílago muestra una mínima capacidad de auto-reparación después de una lesión. En primer lugar, los condrocitos no son requeridos para proliferar eficientemente y reponer al tejido dañado, además de que la estructura de la MEC impide su migración (Chen *et al.*, 1999; Temenoff y Mikos 2000; Ochi *et al.*, 2002). Otro factor a considerar es la naturaleza avascular del cartílago que funciona como una barrera natural contra el proceso de reparación tisular (Mankin 1974b; Hauselmann y Hunzinker 1997). Por otra parte, se ha demostrado que el dermatán sulfato y algunos proteoglicanos pueden impedir la adhesión celular, minando de esta forma el proceso nativo de reparación (Hunzinker y Kapfinger 1998; Hunzinker 1999a; Hunzinker 1999b; Hunzinker 2000; Temenoff y Mikos 2000). Además, se ha demostrado que el líquido sinovial tiene propiedades que inhiben la proliferación de los condrocitos *in vitro*; no obstante, aún no se ha esclarecido si sucede lo mismo en la zona de la lesión *in vivo* (Breinan *et al.*, 1997; Hunzinker 2001).

2.13 Estrategias en la reconstrucción de una superficie articular

Desde que la cirugía articular se describió por primera vez en el caballo, ésta se ha convertido en un procedimiento quirúrgico extremadamente común. En general, por medio de algunas técnicas operatorias, es posible la remoción de pequeños fragmentos de fracturas articulares y de osteofitos, la fijación de fragmentos de fracturas más grandes y la desbridación de cartílago articular degenerado (Riddle, 1970).

Un gran número de cirujanos ortopedistas han utilizado al artroscopio como una herramienta para desarrollar una variedad de procedimientos quirúrgicos intra-articulares enfocados en la reparación de las superficies articulares (Patel y Guhl 1983; Polisson 2001). La fijación artroscópica de tejidos blandos al hueso mediante la utilización de mini anclas metálicas unidas a suturas de poliéster, es una de las técnicas de reconstrucción más recientes para lesiones deportivas (Goble 1994; Pirhonen 1999; Rodgerson y Spirito 2001; Thal 2001; Barnewitz *et al.*, 2004).

Desde hace varios años, las técnicas quirúrgicas utilizadas en humanos y caballos por medio de artroscopía han estado encaminadas a remover fragmentos condrales, osteocondrales y pedazos de cartílago libres en una articulación; lo cual reduce el dolor y permite el incremento de la movilidad articular (Shapiro *et al.*, 1993; Blevins 1998; Ochi *et al.*, 2002). Sin embargo, el alivio del dolor es manejado temporalmente por dicho desbridamiento y un lavado articular artroscópico, por lo que no se trata por completo el problema ni se consigue la curación de las lesiones a largo plazo (Minas y Peterson 1997).

En el caso de las lesiones de espesor parcial en el cartilago articular, es común realizar el curetaje profundo hasta el hueso subcondral y la desbridación de lesiones focales para transformarlas en lesiones de espesor total, con la finalidad de que se estimule su reparación natural. Se sabe que este tipo de reparación está limitada en términos de forma y función y en el caso de un daño generalizado en áreas de carga articular, el pronóstico será muy pobre para que el caballo retorne a su actividad atlética original (Schneider *et al.*, 1997).

A pesar de que en las últimas cuatro décadas se ha investigado extensamente al cartílago articular y se han desarrollado innovadoras técnicas para el tratamiento de defectos condrales, aún no se tiene la respuesta definitiva para su reparación exitosa (Hurtig *et al.*, 1988; Wakitani *et al.*, 1994; Buckwalter 1998; Hayes *et al.*, 2001).

El reemplazo articular total en pacientes humanos por medio de una prótesis metálica es una alternativa clínica actual para el tratamiento de la degeneración severa del cartílago, aunque ha presentado algunos problemas como son las infecciones y la debilidad de sus componentes, lo que le da una vida media muy corta y se limita su uso a personas de más de 50 años de edad (Wakitani *et al.*, 1994).

2.13.1 Técnicas quirúrgicas basadas en la actividad de la médula ósea

Estas técnicas se basan en la destrucción parcial del hueso subcondral (Vachon *et al.*, 1986). Su mecanismo de acción está basado en el efecto que se provoca al inducir una hemorragia en dicho hueso. La formación de un hematoma con un coágulo de fibrina en el sitio del defecto desencadenan una respuesta inflamatoria (Steadman *et al.*, 1999; Steadman *et al.*, 2001). El coágulo es infiltrado por células mesenquimales y actúa como una estructura tridimensional para que esas células precursoras indiferenciadas que migran desde la médula ósea inicien una respuesta de reparación y diferenciación celular, bajo las condiciones biológicas y biomecánicas de la articulación (Vachon *et al.*, 1989; Shapiro *et al.*, 1993; Steadman *et al.*, 2001; Fortier *et al.*, 2002). En el caso de que las células mesenquimales se diferencien a condrocitos, éstos serán capaces de expresar moléculas de colágena tipo II y agregan (Fortier *et al.*, 1998a). Por otra parte, las plaquetas del sangrado se unen a las fibras de colágena para contribuir con la hemostasis y liberan mediadores vasoactivos y factores de crecimiento, incluyendo al TGF- β y al factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Mankin 1974a; Buckwalter 1997).

La matriz ósea también contiene a los mismos factores de crecimiento anteriores y a otros más como: proteína morfogenética de hueso y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) I y II. La liberación de tales factores de crecimiento juega un papel importante en la reparación de defectos osteocondrales, ya que tienen influencia sobre algunas funciones celulares como la migración de células indiferenciadas mesenquimales, proliferación, diferenciación a condrocitos y síntesis de MEC (Buckwalter 1997; Yang *et al.*, 2001; Fortier *et al.*, 2002; Goodrich *et al.*, 2003).

Posterior a la formación del hematoma, se desarrolla en el sitio de la lesión un tejido de granulación que sufre metaplasia para que el defecto sea reparado con uno o varios de los siguientes tejidos: tejido fibroso, fibrocartilago o un tejido histológicamente similar al cartilago hialino. Tanto la edad del animal, localización, tamaño y tiempo de la lesión, influyen en la formación de alguno de dichos tejidos (Riddle 1970; Mankin 1974^a; Steadman *et al.*, 2001).

Existen tres técnicas quirúrgicas que se basan en la actividad de la médula ósea: la artroplastía por abrasión, las perforaciones subcondrales y la microfractura (Temenoff y Mikos 2000; Steadman *et al.*, 2001; Goodrich *et al.*, 2003; Ochi *et al.*, 2004). Los resultados de dichas técnicas demuestran diferentes tipos de tejido de reparación que van desde la formación de un fibrocartilago hasta un tejido morfológicamente similar al cartilago hialino, aunque sus propiedades mecánicas y de durabilidad son mucho menores al tejido original (Vachon *et al.*, 1989; Temenoff y Mikos 2000; Steadman *et al.*, 2001).

La artroplastía por abrasión es una técnica artroscópica utilizada para remover cartilago dañado y hueso subcondral eburnado, exponiendo así a los vasos intracorticales en la superficie articular. Un hematoma organizado se forma sobre tal superficie y después se diferencia en fibrocartilago.

Aunque el fibrocartilago frecuentemente ofrece un alivio significativo del dolor en el paciente, se sabe que dicho tejido carece de varios componentes estructurales clave para desempeñar la función mecánica de resistencia al desgaste y a la carga articular. Con esta técnica, el hueso subcondral desbridado raramente tiende a recobrar su morfología estructural intacta. La incompleta reconstrucción del hueso subcondral puede crear un ambiente de estrés mecánico aberrante en la matriz del tejido reparado, induciendo la degeneración del mismo, por lo que la eficacia de este tratamiento a largo plazo es impredecible y controversial (Suh *et al.*, 1997).

La técnica de las perforaciones subcondrales (Vachon *et al.*, 1986) consiste en taladrar orificios en el hueso subcondral. Con ella se espera preservar alguna porción de la estructura del hueso subcondral para ayudar a restaurar un ambiente mecánico apropiado para el tejido en formación. El tejido de reparación que se obtiene con dicha técnica, es un tejido fibrocartilaginoso en los defectos de cartilago de espesor total, con una mejor cantidad y calidad que el tejido fibroso obtenido en defectos similares sin perforaciones. Desafortunadamente, la cicatrización no es satisfactoria desde el punto de vista funcional, debido a su pobre integración al cartilago nativo, degeneración, fibrilación y formación de fisuras (McIlwraith y Nixon 1996; Suh *et al.*, 1997).

Por el contrario, la microfractura (Steadman *et al.*, 2001) es una técnica menos invasiva en comparación con las perforaciones subcondrales, ya que se crean artroscópicamente múltiples microfracturas en el hueso subcondral utilizando una lezna. Con ello, se rompen algunos vasos intra-óseos, se induce la formación de un coágulo de fibrina y se liberan factores de crecimiento con la subsecuente introducción de células mesenquimales dentro del defecto osteocondral (Steadman *et al.*, 1999). La evaluación artroscópica del tejido de reparación muestra resultados alentadores en lesiones de gran tamaño, aunque en la mayoría de los casos se forma un fibrocartilago, lo cual no representa una condrogénesis verdadera (Suh *et al.*, 1997; Schenck 2001).

En un estudio realizado por medio de artroscopía, Frisbie y colaboradores (1999) realizaron en caballos la técnica de microfractura en la placa ósea subcondral, para reparar defectos condrales grandes del hueso carporadial y del cóndilo medial del fémur. Los resultados demostraron un incremento en el volumen del tejido reparado así como en el porcentaje de la colágena tipo II, al compararlos con defectos de cartilago no tratados en el mismo estudio. Además, no se encontró ningún efecto negativo con la técnica empleada, por lo que recomiendan su aplicación en pacientes con hueso subcondral expuesto.

2.13.2 Injertos osteocondrales

La reconstrucción articular utilizando tejido osteocondral fresco transplantado de cadáveres a pacientes vivos, fue reportada por Lexer en los años 30 (Hurtig *et al.*, 1998).

El objetivo que se persigue para poder llevar a cabo el reemplazo de cartílago articular mediante injertos autólogos y aloinjertos, es el de renovar la superficie articular dañada con un tejido que contenga las propiedades anatómicas, bioquímicas y funcionales del cartílago articular nativo, lo cual se presume que tendrá resultados clínicos satisfactorios (Hayes y Averett 2001).

Desde la década de los años setenta, se han realizado experimentos con trasplantes de aloinjertos osteocondrales en defectos condrales de espesor parcial (Markel, 2002). Los resultados han sido muy pobres, debido a que se ha presentado colapso subcondral y fracturas del aloinjerto que conducen a la destrucción del cartílago. El uso de los aloinjertos osteocondrales en humanos es poco recomendable debido a que en algunos casos se ha visto una respuesta inmune contra el tejido del donador, con la infiltración linfocítica de la membrana sinovial, citotoxicidad por leucocitos intra-articulares y la formación de adherencias sinoviales al sitio injertado. Además, dicho procedimiento ofrece una fuente de transmisión de enfermedades y tiene una limitante importante, ya que no existen suficientes donadores disponibles para realizar estudios clínicos (Vachon *et al.*, 1992; Suh *et al.*, 1997; Fortier *et al.*, 1998a; Temenoff y Mikos 2000; Fortier *et al.*, 2002). El uso de material osteocondral alogénico congelado es una alternativa atractiva, ya que la criopreservación reduce la inmunogenicidad de los aloinjertos, aunque tiene un efecto detrimental sobre la viabilidad de los condrocitos (Desjardins *et al.*, 1991a y 1991b).

La utilización de autoinjertos es una técnica más confiable para el paciente, ya que se maneja su propio tejido con el fin de evitar los problemas que provocan los aloinjertos (Vachon *et al.*, 1992; Schenck 2001). Hurtig (1988) reporta el uso de injertos osteocondrales autólogos en caballos para reparar defectos condrales. Algunos investigadores han utilizado injertos de hueso esponjoso autógeno compactado, en defectos de hueso subcondral del cóndilo medial del fémur del mismo caballo. Al comparar el tratamiento empleado con caballos de un grupo control (sin injertos), los resultados demostraron que la mayoría de los caballos no injertados presentaron tejido fibroso de reparación y que los caballos injertados mostraron hueso esponjoso muerto y desarrollaron además quistes óseos subcondrales secundarios, por lo que no recomiendan dicha técnica como alternativa de tratamiento en defectos de hueso subcondral (Kold y Hickman 1986; Jackson *et al.*, 2000).

La mosaicoplastia por métodos artroscópicos es una técnica en la cual se toman discos osteocondrales de zonas de no carga articular, para ser implantados en defectos osteocondrales que se localicen en zonas de carga articular del mismo paciente.

Esta técnica quirúrgica ha sido utilizada con cierto éxito en el tratamiento de defectos de cartílago en rodillas de humanos desde 1992 y se han desarrollado trabajos experimentales para evaluar el proceso de reparación en perros, conejos y borregos (Suh *et al.*, 1997; Bodó *et al.*, 2000; Schenck 2001; Hangody *et al.*, 2004). El primer tratamiento por medio de mosaicoplastia artroscópica para las lesiones quísticas subcondrales del cóndilo medial del fémur en caballos, fue reportado por Bodó y colaboradores en el año 2000. En este estudio se utilizaron injertos cilíndricos osteocondrales frescos, tomados de la tróclea femoral medial e implantados en el cóndilo femoral medial del mismo caballo. Al año siguiente, el mismo autor reporta en otro artículo, que la edad del animal influye en la transplantabilidad de la técnica, por lo que no recomienda realizarla en caballos mayores de 11 años. Sin embargo, dicho procedimiento cuenta con 2 limitantes importantes, una es la poca cantidad de material donante que se puede obtener para no alterar la función de la tróclea femoral y la otra es la dificultad para insertar perpendicularmente el autoinjerto, ya que puede quedar un poco afuera del nivel de la superficie articular y provocar mayor compresión en el punto de contacto con la superficie articular opuesta (Bodó *et al.*, 2000; Schenck 2001). En otro estudio realizado con mosaicoplastia, se transplantaron injertos osteocondrales de la tróclea femoral lateral al tercer hueso carpiano del mismo caballo (transferencia heterotópica autógena). En dicho trabajo, se observó una rápida remodelación de la porción ósea, en un intento por reestablecer el soporte subcondral. Sin embargo, la pérdida de proteoglicanos del cartílago trasplantado, indicó que los injertos pudieron haber sido dañados durante su colección o inserción y probablemente la remodelación no cubrió las demandas de un ambiente biomecánico nuevo, por lo que esta técnica se recomienda cuando no existen otras opciones para cubrir a una lesión cartilaginosa (Hurtig *et al.*, 2001).

Existe una limitante con el uso de autoinjertos osteocondrales, ya que al tomar la muestra del tejido donador de una zona de poca carga articular, se provoca una lesión articular considerable para el paciente, lo que induce morbilidad con el manejo de este método. Por otro lado, en algunos estudios se reporta que las zonas de no carga articular de conejos y humanos, han sido utilizadas exitosamente como sitios de donación (Desjardins *et al.*, 1991a; Temenoff y Mikos 2000). Sin embargo, el dilema para localizar un sitio apropiado de donación, así como la morbilidad resultante, hacen que el uso de los autoinjertos sea menos atractivo (Fortier *et al.*, 1998a).

El uso clínico y experimental de los injertos osteocondrales se ha demeritado por algunos problemas técnicos y quirúrgicos, tales como: pobre o inadecuada fijación, movimiento, inestabilidad articular, incongruencia entre el tamaño del injerto con el sitio donde será colocado, inmovilización post-quirúrgica y la limitada disponibilidad del tejido injertado para su evaluación posmortem. Además, en muchos casos el cartílago de los injertos y el de la periferia del defecto, sufren cambios degenerativos y generalmente no se integran, así como también las propiedades biomecánicas del cartílago de dichos injertos se alteran y en muchos de los casos la superficie articular adyacente es lesionada por la incongruencia de la superficie de los injertos (Ochi *et al.*, 2004).

Desjardins y colaboradores (1991b) mencionan que la supervivencia del cartílago en un caballo con un injerto osteocondral, dependerá en gran medida de que el hueso subcondral se encuentre sano estructural y mecánicamente, durante el proceso de la colocación del injerto.

A pesar de las desventajas que se han mencionado, la historia de la reconstrucción articular en caballos y humanos indica que los injertos osteocondrales autógenos frescos de origen articular, son la alternativa de tratamiento quirúrgico más exitosa para reparar defectos de cartílago (Hurtig *et al.*, 1998; Hutmacher 2000; Hurtig *et al.*, 2001).

Por otro lado, en un estudio realizado con ovinos adultos, donde las muestras osteocondrales fueron criopreservadas y posteriormente injertadas, al realizar la evaluación del tejido un año después, se encontró evidencia de repoblación de la matriz por parte de los condrocitos, lo cual puede ser un estado inicial de regeneración del cartílago (Muldrew *et al.*, 2001).

2.13.3 Injertos con tejidos de origen no articular

En algunos reportes se menciona que se han desarrollado ciertos procedimientos quirúrgicos experimentales, con la finalidad de reparar lesiones osteocondrales en caballos, mediante la perforación de la placa ósea subcondral y el trasplante de injertos xenogénicos, autoinjertos de periostio (Vachon *et al.*, 1991^a) y de cartílago esternal. Los resultados de tales estudios no fueron favorables (Riddle 1970; Convery *et al.*, 1972; Hanie 1992; Vachon *et al.*, 1991b; Vachon 1992).

El potencial condrogénico del pericondrio y del periostio han sido usados experimentalmente para restaurar defectos osteocondrales grandes en conejos y perros (Vachon *et al.*, 1992). El pericondrio y el periostio poseen una capa condrogénica de células mesenquimales indiferenciadas que cuando son puestas en un ambiente sinovial, pueden diferenciarse hacia condroblastos y formar un tejido cartilaginoso similar al hialino (Vachon *et al.*, 1989). Con base en lo anterior, se realizó un estudio en caballos, mediante la implantación de autoinjertos de periostio en forma libre en la articulación tibiotarsiana. La neocondrogénesis fue observada en algunos casos y el tejido condroide obtenido tuvo la morfología y afinidad tintorial (safranina- O), similar a la del cartílago articular hialino (Vachon *et al.*, 1989). En otro estudio realizado en la misma especie, se repararon defectos osteocondrales inducidos en el hueso carporadial, utilizando autoinjertos de periostio de la tibia, pegados con un adhesivo de fibrina hecho de una mezcla de fibrinógeno y trombina. Los resultados demostraron que los defectos fueron reparados con fibrocartílago, tejido fibroso y hueso, por lo que se concluyó que la utilización de autoinjertos de periostio no mejora la reparación de los defectos osteocondrales en caballos (Vachon *et al.*, 1991^a). Asimismo, la utilización del pericondrio de costilla como una alternativa para reparar defectos osteocondrales, es poco común debido a que el grado de regeneración que ofrece es impredecible.

El éxito con la utilización de injertos de periostio y pericondrio ha sido limitado, además de que dichos tejidos no se han utilizado ampliamente en casos clínicos (Desjardins *et al.*, 1991a; Vachon *et al.*, 1991b; Yotsuyanagi *et al.*, 1999; Temenoff y Mikos 2000; Hurtig *et al.*, 2001).

Por otro lado, la utilización de autoinjertos osteocondrales de esternón en la articulación tibiotarsiana de caballos, demostró lisis ósea, por lo que los resultados fueron poco convincentes (Desjardins *et al.*, 1991a y 1991b).

En otro estudio, se realizó la evaluación histológica a los 12 meses después de la colocación de autoinjertos con cartílago esternal en defectos osteocondrales de caballos sometidos a un régimen de entrenamiento. La afinidad por la tinción con Safranina-O fue marcadamente reducida en el tejido de reparación obtenido. Los resultados demostraron la presencia de fibrocartilago, tejido fibroso y cartílago articular en algunos casos, pero éste se encontraba separado del cartílago nativo por medio de fisuras y colgajos, por lo que los resultados a largo plazo fueron desilusionantes (Howard *et al.*, 1994). Vachon y colaboradores (1992) utilizaron autoinjertos de cartílago esternal de caballo, fijados por medio de clavos absorbibles de polidioxanon (PDS), para reparar defectos osteocondrales del carporadial por medio de artrotomía. A las 16 semanas posteriores a la implantación de dichos injertos, se observó histológicamente un tejido de reparación similar al cartílago hialino, compuesto predominantemente por colágena tipo II, pero con una superficie irregular y presencia de adherencias fibrosas al sitio de la artrotomía.

Se han llevado a cabo otros estudios en conejos y perros, mediante el uso de autoinjertos de cartílago costal y epifisiario. Los resultados demostraron que inicialmente la apariencia histológica del injerto fue típica de una placa de crecimiento, mientras que 8 semanas después, el tejido de reparación tomó una forma similar a la superficie articular reparada aunque no se realizaron evaluaciones posteriores de dicho tejido (Vachon *et al.*, 1992).

2.13.4 Implante de condrocitos

Al descubrir que los condrocitos se replicaban *in vitro* cuando eran enzimáticamente aislados de su matriz, fué posible cultivarlos con la finalidad de tener una opción más en la reparación de los defectos del cartílago articular (Suh *et al.*, 1997; Ochi *et al.*, 2004). El trasplante de condrocitos autólogos ha demostrado ventajas sobre el uso de condrocitos alogénicos, ya que se evita el rechazo inmunológico y la transmisión de enfermedades infecciosas (Brittberg., *et al* 1994). La transferencia de condrocitos a las lesiones cartilagosas de espesor total se ha estudiado extensamente en animales de experimentación (Jorgensen *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002; Goodrich *et al.*, 2003; Litzke *et al.*, 2004). Minas y Peterson (1997) señalan que el trasplante de condrocitos autólogos de humano está indicado en los daños condrales sintomáticos de una superficie de carga y en las trócleas del fémur.

El beneficio de transplantar condrocitos sin matriz extracelular que los rodee, estriba en la transferencia de un concentrado de células metabólicamente activas, que rellenan las incongruencias de una superficie articular sin los problemas de tamaño y poca adhesión que presentan los injertos osteocondrales (McIlwraith y Nixon 1996; Steinwachs *et al.*, 1999).

Los resultados de los cultivos primarios de condrocitos articulares de bovinos adultos han demostrado la síntesis de macromoléculas estructurales de la matriz, como proteoglicanos y colágena tipo II, mediante análisis morfológicos y bioquímicos (Kuettner *et al.*, 1982b). Por otra parte, la producción de colágena tipo I por parte de los condrocitos *in vitro*, es un indicador de la pérdida de estabilidad fenotípica y desdiferenciación celular, asociadas a una variedad de condiciones subóptimas de cultivo, tales como: cultivos viejos, baja densidad celular y exceso de pasajes (Kuettner *et al.*, 1982b). En general, el trasplante de condrocitos ha conducido a la formación de un tejido similar al cartílago articular, sin embargo, el proceso de reparación ha sido muy lento y el tejido obtenido no sustituye al cartílago sano (Hidaka *et al.*, 2003).

Desafortunadamente, el éxito de transplantar condrocitos en suspensión ha sido menor al 40%, debido a que el problema principal estriba en la incapacidad de mantener a las células en el defecto por un periodo prolongado de tiempo, que les permita producir su propia MEC. Sin embargo, se ha desarrollado un método quirúrgico mediante el cual un parche de periostio autógeno es suturado y pegado con fibrina sobre el defecto, en el cual previamente se inyectan condrocitos autólogos provenientes de un cultivo (Schultz *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 2001; Litzke *et al.*, 2004). Con esta técnica se intenta evitar que las células se salgan del defecto y ha demostrado resultados prometedores en estudios realizados con pacientes humanos desde hace 12 años (Temenoff y Mikos 2000; Schenck 2001). En el área veterinaria, se realizó un estudio con 8 caballos adultos en los que se repararon quirúrgicamente defectos condrales de espesor total en el talus, con la misma técnica de implantación de periostio-condrocitos autólogos. Dos años posteriores a la cirugía, se demostró histológicamente la formación de un neo-cartílago bien integrado al cartílago sano de la periferia (Litzke *et al.*, 2004). Brittberg y colaboradores (1994) realizaron dicho procedimiento por medio de artrotomía a 23 personas con defectos profundos de cartílago en la rodilla. Los resultados demostraron la restauración de la función articular y la obtención de un tejido de reparación similar al cartílago hialino, con predominio de colágena tipo II en la mayoría de los pacientes. Asimismo, dichos autores mencionan que en un estudio similar realizado en conejos, fué exitoso el tratamiento de defectos patelares focales mediante el uso de condrocitos autólogos cultivados y transplantados bajo un parche de periostio. Por otra parte, Breinan y colaboradores (1997) realizaron la misma técnica en rodillas de perros, demostrando que el tejido de reparación que predominó en el estudio fue el fibrocartilago, el cual tuvo una incompleta unión al cartílago adyacente. En algunos perros, se obtuvo un tejido histológicamente similar al cartílago hialino, que se degradó a los 12-18 meses posteriores a la cirugía.

Los problemas más comunes después del trasplante de condrocitos autólogos con dicha técnica, son la incompleta incorporación del parche de periostio al cartílago y una respuesta hipertrófica en los bordes del injerto (Minas y Peterson 1997). Otro factor importante que ha limitado su éxito, está relacionado con la dificultad para mantener a los condrocitos cultivados del huésped en el sitio de la lesión, por una deficiente colocación y unión de las células en el sitio de tratamiento. Otra limitante es el hecho de que el cartílago que se forme no sea producido por los condrocitos empleados, sino por células provenientes del periostio utilizado para sellar el lecho de implantación (Shortkroff 1996; Breinan 1997; Nehrer 1997a; Nehrer 1997b; Nehrer 1998; Nehrer *et al.*, 1999; Minas y Chiu 2000; Breinan 2000; Breinan 2001; Minas 2001). Por otra parte, Breinan y colaboradores (1997) reportan que una buena alternativa para reducir la morbilidad causada por la obtención del parche de periostio de la zona donadora del mismo paciente (tibia), es la sustitución de dicho tejido por una estructura tridimensional altamente porosa que mantenga a las células *in vitro* sin que cambien éstas su fenotipo. Dicha estructura debe servir de sostén para las células dentro del defecto, al igual que debe ser fabricada para degradarse lentamente después de su implantación, puesto que será reemplazada por tejido de neoformación (Griffith y Naughton 2002).

2.14 Ingeniería de tejidos

Existe un gran interés en la reconstrucción de las superficies articulares dañadas, al implementar una gran variedad de nuevas y evolucionadas técnicas para la neoformación de cartílago, basadas en la terapia celular y la ingeniería de tejidos, la cual se ha puesto al frente entre las técnicas de reparación de cartílago por medio de la bioregeneración (Schultz *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2001; Van der Kraan *et al.*, 2002). 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 medicina (Schachar *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2000; Temenoff y Mikos 2000; Hardingham *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2002; Athanasiou *et al.*, 2001; Van der Kraan *et al.*, 2002). 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). La reparación del cartílago basada en técnicas de ingeniería de tejidos podría beneficiar a miles de pacientes humanos cada año, así como también en medicina veterinaria (Vacanti y Langer 1999; Barnewitz *et al.*, 2003). 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 en estructuras biocompatibles y biodegradables que proporcionen la señales físicas y químicas necesarias para guiar su diferenciación y ensamble en tejidos tridimensionales (Griffith y Naughton 2002; Van der Kraan *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2003). El campo de la ingeniería de tejidos involucra al estudio de células vivas en diferentes formas, ya sea para restaurar, mantener o promover la formación o regeneración de tejidos y órganos, a través de la combinación de 3 componentes: a) células. Las más utilizadas en ortopedia son las células mesenquimales madre provenientes de la médula ósea; b) estructuras tridimensionales o matrices. Estas proveen una plantilla o vía que conduce el crecimiento del tejido, y c) moléculas bioactivas. Estas son morfógenos o factores de crecimiento, quienes estimulan la actividad celular y su diferenciación hacia factores físicos o químicos para producir hueso, cartílago o menisco (Ibarra *et al.*, 2000) entre otros (Nehrer 1997a; Nehrer 1998; Elisseeff 1999; Elisseeff 2000; Schultz *et al.*, 2000; Elisseeff 2001; Schenck 2001; Van der Kraan *et al.*, 2002). Los factores de crecimiento y las hormonas peptídicas han sido usados para estimular y mejorar la generación de cartílago. En los últimos años, han sido publicados numerosos reportes sobre el uso del IGF-1 (Fortier *et al.*, 2002), TGF β -1 y BMP para mejorar la formación de la matriz del cartílago y para 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 injertos con condrocitos 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). El implante de condrocitos autólogos ha sido utilizado como tratamiento para los defectos de cartílago en los últimos 14 años, aunque todavía existe la discusión sobre la eficacia del procedimiento (Schultz *et al.*, 2000). A nivel mundial se han realizado más de 6000 procedimientos de implantación con condrocitos autólogos, y un ejemplo de ellos es un estudio realizado con más de 200 pacientes humanos durante un periodo de 2-10 años, donde del 74-90% de ellos tuvieron excelentes resultados clínicos, pero a la fecha no existe suficiente información publicada sobre la biología y naturaleza bioquímica del cartílago reparado (Roberts *et al.*, 2002).

En el campo de la ortopedia equina, se realizó un estudio en donde se crearon lesiones condrales en el menudillo de 3 caballos, mismas que fueron reparadas con implantes de condrocitos autólogos fijados con anclas de titanio. Los resultados preliminares demostraron la formación de un tejido de reparación a los 24 meses, con características morfológicas y bioquímicas muy similares a las del cartílago articular normal (Barnewitz *et al.*, 2003).

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 mayor seguridad para que dichas células permanezcan en el defecto el tiempo suficiente para sintetizar una MEC nueva y se puedan unir al hueso subcondral.

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

Idealmente, el cartílago articular neoforado por ingeniería de tejidos deberá poseer una estructura, composición bioquímica, propiedades mecánicas y capacidad de auto-mantenimiento, iguales a las del cartilago nativo sano (Van der Kraan *et al.*, 2002).

2.14.1 Polímeros naturales

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). Una de las ventajas del uso de la colágena 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.*, 1998b; Temenoff y Mikos 2000; Hardingham *et al.*, 2002; Ochi *et al.*, 2002). La utilidad de la fibrina viene desde su aplicación como un vehículo inyectable auto-polimerizante, formado por una mezcla de fibrinógeno y trombina para formar a un coágulo de fibrina adherente (Fortier *et al.*, 2002). Se ha comprobado que el fibrinógeno autógeno posee la capacidad de mantener el metabolismo fenotípico del condrocito *in vitro* a diferencia del fibrinógeno comercialmente preparado. Además, dicho fibrinógeno autógeno en cultivo, presenta mayor cantidad de proteoglicanos que el de uso comercial (Fortier *et al.*, 1998b).

La fibrina ha sido usada en la fijación de condrocitos y células pluripotenciales, así como en la liberación de péptidos bioactivos que estimulan la reparación del cartílago (Fortier *et al.*, 2002; Van der Kraan *et al.*, 2002). En un estudio realizado artroscópicamente en la articulación fémoropatelar de caballos, se demostró que los injertos de fibrina con condrocitos alogénicos modificados genéticamente con un AdBMP-7, aceleraron el proceso de reparación de los defectos del cartílago y mejoraron las propiedades morfológicas y bioquímicas del tejido de reparación a las 4 semanas (mayor cantidad de colágena tipo II y proteoglicanos que el control), aunque a los 8 meses de la implantación de los injertos, el tejido de reparación del grupo experimental fue igual al del grupo control (Hidaka *et al.*, 2003).

En algunas pruebas clínicas en caballos, se han sembrado condrocitos autólogos en un polímero de fibrina con IGF-1, para ser inyectados en quistes subcondrales de la babilla. Los resultados demostraron que los signos de derrame articular y cojera desaparecieron, aunque la respuesta del tratamiento a largo plazo no fué evaluada (McIlwraith y Nixon 1996).

En un estudio realizado en caballos por Fortier y colaboradores (2002), se demostró que los aloinjertos compuestos por condrocitos, fibrina polimerizada y suplementados con IGF-1, indujeron neocondrogenesis incompleta en defectos condrales de espesor total a los 8 meses de haber sido reparados por artroscopía.

Por otra parte, con el uso de una malla de colágena para reparar defectos condrales de espesor total en la babilla de caballos, se demostró una moderada mejoría en la reparación del cartílago. Se obtuvieron mejores niveles de agregación y un mayor número de condrocitos, en comparación con los animales control, pero la continua disparidad entre el contenido de agregación de los defectos injertados con el cartílago articular normal, así como los bajos niveles de colágena tipo II obtenidos, demuestra que dicha técnica no puede ser recomendada para su uso clínico en caballos. En otro experimento, se sembraron en un gel de colágena tipo I células mesenquimales cultivadas en laboratorio, mismas que fueron transplantadas en defectos de espesor total en el cóndilo femoral de conejos. A los 6 meses, las pruebas mecánicas demostraron que el cartílago obtenido era mucho más suave que el cartílago articular normal (Wakitani *et al.*, 1994; McIlwraith y Nixon 1996; Fortier *et al.*, 1998b).

Por otro lado, varios autores mencionan que existe el riesgo de que se pierdan las células empleadas aún cuando hayan sido implantadas en algún tipo de soporte como esponjas de colágena, debido a un sistema inadecuado de fijación (Breinan 1997; Nehrer 1997a; Nehrer 1997b; Nehrer 1998; Nehrer *et al.*, 1999; Breinan 2000; Breinan 2001).

Los resultados *in vitro* con el uso de colágena y fibrina han sido prometedores, pero los resultados *in vivo* no han sido satisfactorios, además de que existen 2 desventajas importantes con la utilización de tales polímeros naturales. La primera es la dificultad para conseguirlos en grandes cantidades para su uso clínico y la otra es la posibilidad de que contengan algunos agentes patógenos (Van der Kraan *et al.*, 2002). En otros estudios, se han utilizado injertos de condrocitos-hialuronato en gel, los cuales han presentando dificultades en el manejo y la implantación, debido a la baja capacidad de adherencia a los defectos del cartílago (McIlwraith y Nixon 1996; Suh *et al.*, 1997; Temenoff y Mikos 2000).

2.14.2 Polímeros sintéticos

La combinación de materiales sintéticos biocompatibles y biodegradables como estructuras de sostén o transportadoras, con células aisladas de tejidos específicos, tiene la finalidad de regenerar tejidos que puedan ser empleados para reparar, reconstruir o reemplazar la estructura o función de tejidos u órganos lesionados o ausentes (Langer y Vacanti 1993; Cao 1998).

Recientemente se ha investigado sobre la interacción de los condrocitos cultivados con polímeros sintéticos biodegradables aprobados por la FDA (Federal Drug Administration) en los EUA. Tal es el caso del ácido poliglicólico PGA (Lombardero *et al.*, 2003a), el ácido poli-L-láctico (PLA), el ácido Poli-DL-láctico-Co-glicólico (PLGA) y algunos copolímeros de ellos (Schultz *et al.*, 2000; Van der Kraan *et al.*, 2002).

Estos materiales son poli- α -hidroxi-ésteres, que son degradados por hidrólisis en un ambiente biológico y sus productos de desecho son incorporados en el proceso fisiológico y bioquímico normal de las células (Ciccione *et al.*, 2001). Este tipo de polímeros se ha utilizado en estudios experimentales con animales en la reparación de superficies articulares, pero aún no se tienen resultados a largo plazo (Fortier *et al.*, 1998b; Temenoff y Mikos 2000; Schenck 2001; Griffith y Naughton 2002). La combinación PGA-PLA, forma un copolímero PGLA que brinda una buena estabilidad dimensional y rigidez al andamio formado, quien deberá resistir la deformación causada por la carga articular al ser implantado (Van der Kraan *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2003).

Otro tipo de polímeros sintéticos son: hidrogeles que pueden polimerizarse con sustancias químicas, temperatura o luz (Nehrer 1997a; Nehrer 1998; Elisseeff 1999; Elisseeff 2000; Elisseeff 2001), fibras de carbono que se han utilizado como estructuras tridimensionales para reparar defectos osteocondrales en articulaciones de ratas, conejos y humanos, con un 77% de éxito en algunos experimentos (McIlwraith y Nixon 1996).

En un estudio realizado en perros, donde se colocó un molde biodegradable de ácido poli-L-láctico sobre la cabeza femoral, se formó un tejido articular de regeneración mucho mejor que el del grupo control al inicio del experimento, aunque al final los resultados fueron negativos, posiblemente por la inadecuada duración del material utilizado. En otro estudio realizado en el cóndilo femoral de conejos, donde se implantaron células de pericondrio sembradas en una malla de PLLA, se demostró la formación de un tejido de reparación similar al cartílago hialino después de 6 semanas. Por otra parte, otro experimento demostró la formación de células morfológicamente similares a las del cartílago articular, con el uso de una estructura de ácido poliglicólico (PGA) sembrada con condrocitos de bovino *in vitro*. Ambos tipos de poli-ésteres degradables tendieron a incrementar la síntesis de proteoglicanos, al ser comparados con estructuras de colágena. Vacanti y colaboradores (1999) describieron la reparación experimental de lesiones condrales creadas experimentalmente en rodillas de conejo, mediante el empleo de condrocitos autólogos sembrados en estructuras de ácido poliglicólico. Los resultados fueron prometedores, pero no fue posible la permanencia de tales estructuras en el defecto debido a una colocación deficiente (Breinan 1997; Nehrer 1998; Nehrer 1999; Breinan 2001; Breinan *et al.*, 2001).

La densidad y edad de las células sembradas en este tipo de polímeros sintéticos es importante, ya que se ha observado que cuando hay pocas células o llevan mucho tiempo en cultivo, el tejido de reparación obtenido tiende a ser más fibroso (McIlwraith y Nixon 1996; Temenoff y Mikos 2000).

2.14.3 Uso de bioreactores en la ingeniería de tejidos

Se ha descrito la utilización de bioreactores para intentar formar por completo a un tejido *in vitro* antes de implantarlo. Los bioreactores y sistemas de perfusión asemejan las condiciones *in vivo* para un tejido, con un ambiente esencial para la matriz extracelular y con la influencia biomecánica necesaria (Schultz *et al.*, 2000). Los cultivos celulares de alta densidad pueden ser usados para prevenir la desdiferenciación de los condrocitos que ocurre con frecuencia en cultivos de 2 dimensiones. Asimismo, existen numerosas ventajas con el uso de bioreactores para la formación de grandes cantidades de tejido en forma rápida como: a) la mezcla uniforme y el control preciso sobre la tasa de transferencia de tejido, b) la facilidad de mantener niveles óptimos de nutrientes y pH y c) el control de las fuerzas mecánicas sobre el tejido en formación (Breinan 1997; Nehrer 1997a; Nehrer 1997b; Cao 1998; Hunzinker 1999a; Hunzinker 1999b; Breinan 2000; Hunzinker 2000; Temenoff y Mikos 2000).

2.15 Evaluación del cartílago articular

2.15.1 Resonancia Magnética

En los últimos años se ha despertado el interés por utilizar imágenes por resonancia magnética (IRM) como una herramienta de diagnóstico para problemas ortopédicos en los miembros del caballo. Con las IRM es posible detectar cambios patológicos que no son identificados con técnicas comunes de imagen como son la radiología (Sowers *et al.*, 2003) y el ultrasonido, las cuales ofrecen un valor diagnóstico pobre en lo que respecta a la evaluación de ciertas articulaciones en el equino (Kraft y Gavin 2001; Tucker y Farell 2001; Tucker y Sande 2001; Kasashima *et al.*, 2002).

La aplicación potencial de la resonancia magnética en lo que respecta al diagnóstico de anomalías músculo-esqueléticas en el caballo (Bindeus *et al.*, 1999), ofrece información más completa relacionada a casos con síndrome navicular (Widmer *et al.*, 2000), fracturas complejas, lesiones de tendones (Kasashima *et al.*, 2002) y ligamentos que responden pobremente al tratamiento, así como desórdenes musculares y articulares como osteoartritis.

La resonancia magnética es un método no invasivo de diagnóstico (Roberts *et al.*, 2002) que es altamente sensible en la detección de lesiones en el hueso subcondral y en la visualización de tejidos blandos como: cartílago articular (Lombardero *et al.*, 2003b), membrana sinovial, cápsula articular, bursas, periostio y médula ósea (O'Callaghan MW 1991; Martinelli *et al.*, 1996; Kleiter *et al.*, 1999; Widmer *et al.*, 1999; Widmer *et al.*, 2000; Kraft y Gavin 2001; Kasashima *et al.*, 2002).

Los estudios por imágenes obtenidas con técnicas de resonancia magnética ofrecen la capacidad de poder evaluar a los tejidos desde diferentes planos, en dos dimensiones, a diferentes cortes y sin la necesidad de reposicionar al paciente.

Esta técnica brinda a su vez un excelente contraste y detalle fisiológico entre los distintos tejidos blandos, así como con una perfecta definición anatómica, gracias a que las diferentes estructuras se observan con gran nitidez en una escala de grises, que va desde el color negro hasta el blanco (O'Callaghan MW 1991; Linklater y Potter 1997; Potter *et al.*, 1998; Widmer *et al.*, 1999; Widmer *et al.*, 2000; Kraft y Gavin 2001; Tucker y Farell 2001; Tucker y Sande 2001).

La base de los principios físicos para la formación de las imágenes por resonancia magnética está dada por la estimulación de los tejidos magnetizados por medio de ondas de radiofrecuencia (secuencias de pulso), sin el uso de radiaciones ionizantes (O'Callaghan MW 1991; Martinelli *et al.*, 1996; Kraft y Gavin 2001). Por otra parte, la obtención del contraste de los tejidos depende de la naturaleza y densidad de sus protones de hidrógeno, así como por la cantidad de agua tisular (O'Callaghan MW 1991).

Ciertos estudios bien documentados sobre resonancia magnética en humanos, mencionan que es posible detectar cambios tempranos en el cartílago articular como reblandecimiento y edema, que no son identificados mediante imágenes artroscópicas (Martinelli *et al.*, 1996; Linklater y Potter 1997); por lo que algunos autores consideran a la resonancia magnética como la modalidad más óptima para evaluar al cartílago articular (Roberts *et al.*, 2002).

Desafortunadamente, son escasos los estudios clínicos y experimentales de resonancia magnética reportados en equinos, debido a que existen a nivel mundial muy pocas instituciones de enseñanza veterinaria o centros de referencia para caballos, que cuentan con el equipo de resonancia magnética adaptado para dicha especie. Además, la baja disponibilidad de los equipos y su elevadísimo costo, hacen que el precio de un estudio de resonancia magnética para caballos no esté al alcance de todos. Por otro lado, otro factor que limita la realización de los estudios de resonancia magnética en equinos, es el tamaño de los equipos disponibles, ya que estos fueron diseñados para introducir pacientes humanos (Kleiter *et al.*, 1999; Kraft y Gavin 2001; Tucker y Sande 2001). En la mayoría de los estudios reportados en caballos, se utilizaron equipos de resonancia para humanos, donde se introdujeron especímenes anatómicos de caballos muertos (Martinelli *et al.*, 1996; Kleiter *et al.*, 1999; Kasashima *et al.*, 2002; Anastasiou *et al.*, 2003).

2.15.2 Técnicas histológico-histoquímicas

El análisis histológico-histoquímico del cartílago articular siempre jugará un papel esencial en la evaluación de la neocondrogénesis (O'Driscoll *et al.*, 2001). El elemento fundamental de los métodos histoquímicos es la utilización de acciones físicas y químicas sobre preparados histológicos, para determinar la localización de sustancias químicas en las células y los tejidos. La reacción histoquímica debe inducir la formación de un producto insoluble y visible al ser coloreado. La mayoría de las tinciones usadas en histología son hechas a base de sales hidrosolubles, descritas como tinciones ácidas o básicas.

Las propiedades de tinción del cartílago están relacionadas con los grupos sulfato y carboxilo (componentes basofílicos), así como con la naturaleza acidofílica de la colágena (Banks 1993; Stevens y Lowe 1995; Gartner y Hiatt 1997; Geneser 2000).

2.15.2.1 Tinción con hematoxilina y eosina (HyE)

La tinción con hematoxilina y eosina sirve para evaluar la morfología celular y la estructura de la matriz extracelular (MEC). La hematoxilina es una base, que da un tinte azulado o morado a los componentes ácidos de la célula como el núcleo (ADN y ARN) y ciertas regiones ácidas del citoplasma. A tales componentes celulares ácidos se les denomina basófilos o basofílicos. En el caso de la matriz del cartílago, se observa una basofilia muy marcada alrededor de cada grupo isógeno de la matriz territorial. Dicha basofilia se debe a la gran cantidad de glucosaminoglicanos sulfatados ácidos en esa zona. Por otro lado, la eosina es un colorante ácido que da una coloración rosada-roja a los componentes básicos de la célula, como el citoplasma y algunos productos extracelulares. A tales componentes celulares básicos se les denomina acidófilos, acidofílicos o eosinofílicos; un ejemplo de ellos son las fibras de colágena (Prophet *et al.*, 1991; Banks 1993; Stevens y Lowe 1995; Gartner y Hiatt 1997; Geneser 2000).

2.15.2.2 Tinción tricrómica de Masson

La tinción tricrómica de Masson sirve para demostrar la presencia de tejido fibroso (colágena) en la matriz extracelular del cartílago articular, al dar un color azul (azul de anilina) a dicha matriz. En el caso de los condrocitos, los núcleos se tiñen de color azul oscuro, mientras que el citoplasma de color rojo (Prophet *et al.*, 1991; Geneser 2000).

2.15.2.3 Tinción con azul alciano

El azul alciano es una tinción diferencial que sirve para determinar la presencia de glucosaminoglicanos (GAGs) ácidos (mucopolisacáridos) en la matriz del cartílago articular (Prophet *et al.*, 1991).

2.15.2.4 Tinción con safranina-O

La tinción con Safranina-O es aceptada como una técnica semicuantitativa, ya que por su carga catiónica y unión a los proteoglicanos aniónicos (GAGs sulfatados con carga negativa), es un indicador muy útil del contenido de proteoglicanos en la matriz extracelular del cartílago articular, que se tiñen de un color rojo-anaranjado. Con esta tinción, la región pericelular y territorial siempre se tiñen más intensamente que la región inter-territorial (Prophet *et al.*, 1991; Howard *et al.*, 1994; Breinan *et al.*, 1997).

III. HIPÓTESIS

Las características por resonancia magnética, artroscopía e histología del tejido de reparación obtenido con el uso de condrocitos autólogos expandidos *in vitro*, sembrados sobre un disco de copolímero PGA/PLLA e implantado artroscópicamente en un defecto condral, serán muy similares a las del cartílago articular normal.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar por medio de resonancia magnética, artroscopía e histología, al tejido de reparación obtenido del implante de un constructo (células + polímero), sobre una lesión condral.

4.2 Objetivos Específicos

1.-Evaluar mediante técnicas de resonancia magnética al tejido de reparación obtenido en ambas articulaciones de cada caballo (experimental y control), utilizando un sistema de calificación preestablecido.

2.-Evaluar mediante artroscopía al tejido de reparación obtenido en ambas articulaciones de cada caballo (experimental y control) utilizando un sistema de calificación preestablecido.

3.-Evaluar por medio de histología al tejido de reparación obtenido en ambas articulaciones de cada caballo (experimental y control), utilizando un sistema de calificación preestablecido.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Centro Nacional de Rehabilitación (CNR) de la Secretaría de Salud (SS) en la Ciudad de México.

Se utilizaron 6 caballos jóvenes clínicamente sanos (5 yeguas y un macho entero), entre 1 y 3 años de edad, de raza criolla y con un peso de 250 a 350 kilos. Los animales no presentaron ningún tipo de claudicación, derrame articular palpable en ambas babillas y ningún otro tipo de lesión articular, en base a su evaluación clínica y radiológica.

Los caballos se mantuvieron aislados en un corral circular (picadero) construido con concreto y madera de 40 metros de diámetro y en las caballerizas de concreto de 4x5 m, propiedad del Departamento de Medicina y Zootecnia para Equinos (MZE) de la FMVZ de la UNAM.

A cada animal se le proporcionó tres veces al día una ración de alimento (6, 12 y 18 h), la cual estuvo compuesta por heno de avena y alfalfa achicalada, así como agua a libre acceso. Las cantidades para cada caballo se calcularon con base a su peso y condición corporal para cubrir sus requerimientos de mantenimiento.

Los caballos estuvieron en cuarentena y bajo la supervisión de un equipo veterinario una semana previa al inicio del experimento. Al finalizar ese periodo, los animales fueron bañados, desparasitados y vacunados contra tétanos.

A la mitad de la fase experimental, una de las yeguas sufrió síndrome abdominal agudo que no respondió a la terapia médica, por lo que se decidió practicar la eutanasia en el animal.

En el quirófano del Hospital del departamento de MZE de la FMVZ de la UNAM, se realizaron las cirugías artroscópicas en todos los caballos del experimento. La articulación experimental fue la babilla derecha (fémoro-tibio-patelar), mientras que la articulación homóloga del miembro opuesto (izquierda), sirvió como control. La elección de las babillas fue en forma aleatoria.

5.1 Manejo individual y cuidados preoperatorios

- Ayuno sólido 12 horas previas a la cirugía artroscópica y agua a libre acceso.
- Evaluación clínica completa.
- Colocación de un catéter intravenoso periférico calibre 14 x 2 pulgadas de longitud (Equipos Médicos Vizcarra, México) con extensión (PISA, México) y tapón (BRAUN, Alemania) en la yugular izquierda.
- Rasurado completo del pelo de ambas babillas.

5.2 Protocolo de anestesia

Todos los caballos fueron operados bajo anestesia general siguiendo el mismo protocolo.

1. Sedación con xilacina (Fort Dodge, EUA) endovenosa a una dosis de 1.1 mg/kg de peso.
2. Relajación muscular con una solución de gliceril guayacol éter al 5%, administrada por vía venosa a efecto.
3. Inducción anestésica con hidrocloreuro de ketamina (Fort Dodge, EUA) endovenosa a una dosis de 2.2 mg/kg de peso.

Después de que el caballo se derribó en el cuarto de inducción anestésica, se trasladó a la mesa de cirugía donde se colocó en posición de decúbito dorsal y se intubó orotraquealmente para poder mantenerlo en un plano anestésico quirúrgico con el uso de anestesia inhalada a efecto, mediante la combinación de halotano (Halanest RIMSA, México) y oxígeno (INFRA, México).

El monitoreo anestésico consistió en la evaluación de los siguientes signos vitales: frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, pulso, llenado capilar, color de mucosas y presión arterial.

Se proporcionó soporte cardiovascular al paciente con la administración de solución de Hartmann (PISA, México) por vía endovenosa a una velocidad de 10-15 ml/kg de peso/hora.

5.3 Procedimiento quirúrgico artroscópico

Con base en las técnicas artroscópicas descritas por McIlwraith (1990), se realizaron de forma aséptica los mismos procedimientos quirúrgicos en todos los caballos del experimento, utilizando una lente artroscópica (Olympus Winter and Ibe GMBH, Hamburgo, Alemania) y una video cámara digital (Dyonics Inc. Smith & Nephew. OK, EUA). El artroscopio que se utilizó cuenta con una angulación de 30 grados y 4 mm de diámetro en la lente. Todas las cirugías fueron grabadas en cinta de video de 8 mm y se editaron en formato digital.

5.3.1 Toma de la muestra osteocondral para el cultivo de condrocitos del cartílago articular

Una vez anestesiado el caballo sobre la mesa de cirugía en posición de decúbito dorsal y con el miembro pelviano izquierdo extendido, se embrocó la babilla izquierda con yodo povidona espuma y alcohol isopropílico al 70% en forma convencional. Posteriormente, dicha articulación se cubrió con campos estériles, dejando libre el área operatoria (cara craneal de la babilla) y se mantuvo en extensión para facilitar el abordaje a la articulación fémoro-patelar.

Sobre la piel de la cara craneal de la articulación, se palparon los tres ligamentos patelares (medial, medio y lateral) y la cresta tibial. Se identificó el espacio entre los ligamentos lateral y medio, donde se ubicó el portal artroscópico a nivel del punto medio, entre la cresta tibial y el borde distal de la patela. En dicho punto, se introdujo un catéter calibre 14 x 2 pulgadas de longitud (Equipos Médicos Vizcarra, México), que se conectó a un sistema de irrigación articular, por medio de una bomba de infusión (Masterflex, Coleparmer Instrument Co. Chicago, EUA) con solución de Hartmann estéril, para distender la cápsula articular a criterio del cirujano (90-120 ml). Una vez distendida la cápsula, se retiró el catéter y sobre ese mismo sitio se realizó una incisión vertical sobre la piel de 5 mm de longitud con una hoja de bisturí estéril del número 11 (BD, México).

Posteriormente, sobre el mismo sitio y con otra hoja de bisturí igual, se perforó la cápsula articular (1 cm) y se introdujo el trócar artroscópico de punta roma con su camisa en el sitio de la incisión, atravesando la cápsula articular y quedando dentro de la articulación fémoro-patelar. 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 le conectó tanto una cámara artroscópica (Dyonics Inc., Smith & Nephew. OK, EUA), como el cable de la fuente de luz (Stryker Endoscopy, Quantum 250. Sunnyvale, CA EUA). Las imágenes intra-articulares pudieron ser observadas en un monitor a color (Sony Trinitron, Sony corporation, Japón).

Una vez que el artroscopio se introdujo en la articulación, se le conectó la línea de ingreso del sistema de irrigación con solución de Hartmann, para mantener distendida la cápsula.

Al quedar posicionado el artroscopio frente al surco troclear, se movió medial y proximalmente para localizar a la tróclea medial del fémur en su tercio proximal, la cual fue el área donadora de cartílago.

Posteriormente, bajo visión directa con la misma técnica se creó el otro portal. Se realizó una incisión vertical sobre la piel de 1 cm 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 un instrumento palpador de plástico estéril de punta roma (COR System. MA, EUA), de frente y de manera perpendicular hacia la tróclea medial del fémur, el cual sirvió para ubicar el área donadora de cartilago. Después se retiró dicho instrumento y se introdujo en su lugar un sacabocado de doble componente en forma de "T", de acero inoxidable, estéril y especial para toma de biopsias osteocondrales en forma de disco de 8 mm de diámetro (COR System. MA, EUA). Una vez colocado el sacabocado sobre el sitio donador, se puso un yunque especial (COR System. MA, EUA) en su extremo externo y se golpeó este con un martillo ortopédico convencional (FIEM, México), para hundir al sacabocado 8 mm de profundidad en el cartilago articular y hueso subcondral de la tróclea medial del fémur. Con movimientos rotatorios manuales y haciendo ligera palanca, se extrajo de forma estéril la primer muestra osteocondral en forma de cilindro.

Mediante el mismo procedimiento se tomó una segunda muestra 2 mm distal a la primera sobre el borde anteromedial de la tróclea medial. Finalmente, la articulación se lavó con el sistema de irrigación, se retiraron los instrumentos y se suturaron las incisiones en piel y cápsula articular en un mismo plano, mediante puntos simples con sutura no absorbible de polyamide calibre 1 (Braunamid, BRAUN Aesculap, Alemania).

Las dos muestras osteocondrales obtenidas se colocaron para su transporte en un tubo cónico de plástico estéril de 50 ml, que contenía 5 ml de un medio para cultivo celular M199 (Bio-Whittaker, Maryland, EUA), al cual se le adicionaron antimicrobianos al 10% (penicilina-estreptomycina 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 de Ingeniería de Tejidos y Terapia Celular del Centro Nacional de Rehabilitación (CNR) de la Secretaría de Salud (SS), donde fue procesado el cartílago articular para cultivo celular.

Los defectos osteocondrales que se crearon al extraer dichas muestras, se dejaron intactos para que teóricamente se repararan en forma natural con un fibrocartílago y sirvieran así como control.

5.4 Protocolo para el procesamiento del cartílago articular

1. La muestra osteocondral fue manejada dentro de una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA).
2. Se separó el cartílago articular del hueso subcondral. Se hicieron 2 lavados de la muestra con solución salina buferada de fosfatos "PBS" (Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA), adicionada con antibióticos/antimicóticos al 10%: penicilina, estreptomycina y anfotericina B (Gibco, EUA).
3. Se preparó una solución de colagenasa tipo II al 0.3% (Worthington. NJ, EUA) en el medio para cultivo celular M199 (Bio-Whittaker. Maryland, EUA).
4. El cartílago se fragmentó en pedazos de 1 mm³ y se pesó.
5. Se colocaron los fragmentos de cartílago en un tubo con 5 ml de medio M199, antibióticos/antimicóticos 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 incubó (Shel Lab, Oregon EUA) 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 con 5 ml de solución M199 más antibióticos/antimicóticos 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, EUA).
10. Se tomaron 10 microlitros de la solución anterior y se mezclaron con 10 microlitros de azul de tripano al 0.4 % (Gibco BRL, Life technologies. NY, EUA).

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:

$$\text{Número de células vivas} \times 2 \text{ (factor de dilución-20microl)} \times 10000 \text{ (constante)} \times \text{volumen de suspensión} = \text{Total de células vivas.}$$
14. Se sembraron las células en una caja de cultivo primario T75 con 10 ml de una solución compuesta por: medio de cultivo M199 + antibióticos/antimicóticos al 1% y suero fetal bovino (SFB).
15. Se incubó la caja de cultivo durante 3-4 semanas en un incubador de CO₂ al 5%, 37°C y 85% de humedad relativa (NUAIRE, US autoflow, EUA).
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, EUA) para desprender las células del fondo de la caja y esta se incubó con CO₂ a 37 °C durante 5 minutos.
19. Se agregaron 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. Posteriormente se recultivó durante 4 semanas (primer pase) y 4 semanas más (segundo pase).

5.5 Construcción de un andamio o matriz (copolímero) para las células

Una malla de un polímero sintético biocompatible y biodegradable de ácido poliglicólico-PGA con fibras de 15 µm de diámetro y poros de 100-200 µm (Albany International, Albany, NY), fue cortada en forma de un disco de 8 mm de diámetro x 2 mm de espesor. El disco fue sumergido en una solución al 1%, compuesta por 200 mg de otro polímero sintético biocompatible y biodegradable de ácido poli-L-láctico (PLA) [ICN Biomedicals, Inc. Ohio, EUA] en 20 ml de cloruro de metileno (solvente) al 99.6% (Sigma-Aldrich Inc. MO, EUA). De esta manera se formó un copolímero (PGLA). El manejo de los polímeros y del solvente se llevó a cabo dentro de una campana de extracción de gases (LAB CONCO Corp. Kansas city, EUA).

Se dejó evaporar el solvente durante 3 días para que se depositara el PLA sobre el PGA y se formara un andamio de PGLA. El andamio se colocó en uno de los compartimientos de una caja de cultivo de plástico de 6 pozos y se esterilizó con óxido de etileno (gas).

Dos días antes de sembrar las células sobre el andamio, fue lavado con PBS, hidratado con medio de cultivo M199 y guardado en el incubador de CO₂ a 37°C.

5.6 Siembra de las células sobre el copolímero (PGLA)-Formación del implante (constructo)

Una vez que las células llegaron a confluencia en las cajas de cultivo del segundo pase, se agregaron 8 ml de PBS + EDTA al 1 milimolar.

1. Se agregaron 5 ml de tripsina al 0.25% y se incubó (37 °C/5 minutos).
2. Se agregaron 3 ml de suero fetal bovino y se observó como se despegaron las células.
3. Se centrifugó a 1200rpm/12 min para obtener el botón celular.
4. Se resuspendió con 10 ml de PBS y se volvió a centrifugar.
5. Se resuspendió en solución M199 con 10% de SFB y antimicrobianos.
6. Se calculó el número de células a sembrar sobre el co-polímero.
7. Se sembraron las células en suspensión (150 microlitros) sobre el andamio.
8. El constructo (copolímero-células) se incubó a 37°C durante dos horas en agitación constante. Se agregó una solución compuesta por: medio de cultivo M199, 10% de SFB, antimicrobianos y ácido ascórbico (25 mg/ml; Sigma-Aldrich, EUA).
9. El constructo se incubó durante 5 días para permitir la adhesión celular a las fibras del copolímero.
10. La adhesión de las células al copolímero se valoró en el microscopio óptico de luz invertida. Al quinto día de su construcción, los constructos fueron implantados en cada caballo.

5.7 Implantación artroscópica del constructo en la babilla experimental

En cada uno de los 5 caballos se implantó un constructo de polímero/células en la babilla derecha. El sitio de implantación fue el tercio proximal de la tróclea medial del fémur. Se realizó el primer portal para el artroscopio entre los ligamentos patelares medio y lateral, siguiendo la técnica antes descrita. El segundo portal fue creado entre los ligamentos patelares medio y medial. Se localizó el sitio de implantación con el instrumento palpador de plástico de punta roma y se creó en ese sitio, un defecto condral de espesor total de 8 mm de diámetro con la ayuda del sacabocado en forma de "T", una cureta y una pinza "Rongeur" (Olympus, Alemania). Se intentó no lesionar el hueso subcondral. Únicamente se retiró el cartílago articular y se dejó a dicho hueso expuesto sin provocar sangrado. Una vez creado el defecto de cartílago, se introdujo a través de ese segundo portal una broca de acero inoxidable de 2.4 mm de diámetro (Mitek. MA, EUA), la cual sirvió para realizar un orificio de 15 mm de profundidad en el hueso subcondral y en el centro del defecto con la ayuda de un taladro eléctrico convencional (Black & Decker, EUA) y un clavo de Steimann 5/64.

Posteriormente se introdujo por el mismo portal una cánula artroscópica de acero inoxidable y de doble componente (camisa y obturador romo), la cual fué diseñada especialmente en el CNR por el Departamento de Ingeniería Biomédica para servir como guía y transporte del constructo. Utilizando la cánula como guía, se introdujo un ancla absorbible de ácido poli-L-láctico de 3.5 mm con dos cabos de sutura absorbible de polidioxanona (PDS) calibre 2 (Panalok, Mitek. MA, EUA). El ancla fue enterrada con ayuda del martillo al orificio previamente hecho. La cánula se dejó dentro de la cavidad articular con los cabos de las suturas hacia el exterior.

El constructo fue sacado de su caja y perforado a manera de un botón con las agujas de las suturas en forma estéril, asimismo fue deslizado por las suturas hacia la entrada de la cánula y los cabos de las suturas fueron introducidos a través del obturador romo de la cánula. Finalmente el autoinjerto se deslizó dentro de la camisa de la cánula con ayuda del obturador romo hasta llegar al defecto condral previamente creado y fué sujetado por medio de un amarre de las suturas con 3 nudos, utilizando un "empuja-nudos" artroscópico de acero inoxidable (Mitek. MA, EUA).

Después de evaluar con el artroscopio y el gancho palpador la estabilidad del implante se cortaron los cabos de sutura. Los instrumentos quirúrgicos fueron retirados y los portales se suturaron de manera convencional.

Al finalizar el procedimiento quirúrgico, el caballo fue oxigenado y desconectado del aparato de anestesia, para posteriormente ser trasladado al cuarto de recuperación anestésica donde fue asistido por el equipo veterinario. Una vez estable el paciente, fue trasladado a una caballeriza donde quedó bajo estricto confinamiento durante 15 días.

5.8 Cuidados y manejo posoperatorio

Se administró fenilbutazona endovenosa (Brovel, México) a una dosis de 4.4 mg/kg de peso al momento en que los caballos salieron del quirófano y se continuó con el mismo anti-inflamatorio no esteroideanalgésico durante 6 días más a una dosis de 2.2 mg/kg de peso cada 12 horas; esto con la finalidad de prevenir inflamación y dolor articular. Además se administró a cada caballo penicilina G procaínica (Loeffler, México) por vía intramuscular a una dosis de 22000 UI/kg de peso cada 12 horas y gentamicina (Shering Plough, México) endovenosa a una dosis de 6.6 mg/kg de peso cada 24 horas durante 5 días. Los animales fueron revisados 3 veces al día por el equipo veterinario a cargo durante la primer semana. Cada caballo tuvo su propio expediente clínico donde se registraron las evaluaciones clínicas y los tratamientos administrados.

Las suturas de piel fueron retiradas 14 días después de cada cirugía.

5.9 Evaluación del tejido de reparación

El tejido de reparación de ambas babillas de cada caballo, fue evaluado a las 8 semanas posteriores a la implantación de los injertos.

Se utilizaron tres métodos distintos para tal fin y en el siguiente orden: Resonancia magnética, Artroscopía e Histología.

Una vez cumplidas las 8 semanas en cada caballo, se practicó la eutanasia a cada uno de ellos en la sala de necropsias de la FMVZ-UNAM.

Bajo sedación previa con xilacina (PISA, México) endovenosa (1.1 mg/kg peso), cada caballo fue sacrificado con una pistola de émbolo oculto.

A los cadáveres les fueron amputadas ambas babillas (experimental-derecha y control-izquierda), incluyendo los músculos y la piel, con la ayuda de una segueta convencional y un cuchillo. Las babillas fueron trasladadas de inmediato al CNR para la evaluación de los tejidos de reparación.

5.9.1 Evaluación por resonancia magnética

En la Unidad de Resonancia Magnética del CNR, cada una de las babillas (experimental y control) fue evaluada con un magneto superconductor de 1.5 Tesla (General Electric, modelo Signa, Milwaukee, EUA) y una antena de radiofrecuencia en arreglo de fase de doble componente para torso de humanos, la cual se ajustó a las dimensiones de cada articulación. Se utilizaron las secuencias de pulso T2 FAT SAT con densidad protónica y T1 con TE corto para evaluar mediante un corte sagital de cada babilla, al tejido de reparación obtenido en la tróclea medial del fémur.

Se calificó el tejido de reparación en ambas babillas de cada caballo, con base en la siguiente tabla:

CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO	CALIFICACIÓN
Integridad de la superficie y contorno	1= normal o cercano a lo normal 0= anormal
Señal de cartílago en la región del injerto	1= normal o cercano a lo normal 0= anormal
Grosor del tejido	1= normal o cercano a lo normal 0= anormal
Cambios en el hueso subcondral	1= normal o cercano a lo normal 0= anormal
Total máximo posible de puntos	4

(Roberts *et al.*, 2002)

5.9.2 Evaluación artroscópica

Inmediatamente después de la evaluación por resonancia magnética, las babillas se llevaron al quirófano de experimentación del bioterio del CNR donde se realizó la evaluación artroscópica del tejido de reparación en cada articulación, con base a sus características y dándole una calificación de acuerdo a la siguiente tabla:

Parámetros	Puntuación	
Tejido de reparación	Ausencia = 0	Presencia = 1
% ocupación del tejido dentro del defecto	25% = 0	75% = 2
	50% = 1	100% = 3
Integración al tejido nativo de la periferia	Nula = 0	Buena = 2
	Regular = 1	Muy buena = 3
Nivel del tejido en relación a la superficie articular	Hundido = 0	Mismo nivel = 1
	Protuberante = 0	
Superficie	Irregular = 0	Regular = 1
Color	Otro = 0	Blanco = 1
Textura	Rugosa = 0	Lisa = 1
Consistencia	Blanda = 0	Firme = 1

Total máximo de puntos = 12

5.9.3 Evaluación histológica

Una vez concluida la evaluación artroscópica, las babillas fueron abiertas por artrotomía para exponer a la articulación fémoro-patelar.

En ambas babillas (experimental y control) de cada uno de los caballos, se utilizó un sacabocado en forma de "T" de acero inoxidable con 15 mm de diámetro (diseñado por Ingeniería Biomédica del CNR) y un martillo convencional, para extraer manualmente al tejido de reparación obtenido. Fue importante tomar parte del cartilago nativo (0.5 cm) de la periferia del tejido de reparación y un centímetro de hueso subcondral en cada uno de ellos.

Las muestras de tejido colectadas, fueron procesadas mediante técnicas de histotecnología para su evaluación histológica-histoquímica con microscopía óptica de luz, utilizando cuatro diferentes tinciones: Hematoxilina y Eosina (HyE), Tricrómica de Masson, Safranina O y Azul Alciano.

Las laminillas de cada caballo se calificaron individualmente con base en los parámetros de la siguiente tabla:

**Sistema de puntuación histológico-histoquímico,
para la evaluación del tejido de reparación**
(Roberts *et al.*, 2002)

CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO	CALIFICACIÓN
Morfología	Hialino= 3 Hialino/fibrocartilago= 2 Fibrocartilago= 1 Tejido fibroso= 0
Afinidad por la tinción	Cercana a la normal= 1 Anormal= 0
Arquitectura de la superficie	Cercana a la normal=2 Moderadamente irregular=1 Muy irregular=0
Agregados de condrocitos	Ninguno=1 Menor o igual al 25 % de las células= 0.5 Mayor al 25% de las células= 0
Integración basal	Buena= 1 Pobre= 0

Total máximo de puntos = 8

5.10 Protocolo para el procesamiento del tejido de reparación obtenido

Se procesaron las muestras obtenidas en cada uno de los caballos (experimental y control) en base a los métodos descritos en el libro del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los EUA (Prophet *et al.*, 1991) con ciertas modificaciones, ya que se tuvieron que estandarizar previamente las técnicas de tinción específicas para cartílago articular de la tórclea femoral de caballos.

1. Se fijaron las muestras en formol buferado al 10%.
2. Se descalcificaron las muestras en solución "Krajian" (CTR científico. Monterrey, México).
3. Se cortaron las muestras sagitalmente (5 mm ancho, 8 mm largo y 1 mm espesor).
4. Se lavaron los cortes con jabón neutro y agua corriente.
5. Se colocaron los cortes en cápsulas de inclusión.
6. Se fijaron los cortes en formol buferado al 10% durante 24 horas.
7. Se colocaron las cápsulas en el histoquinete.
8. Se incluyeron las muestras en parafina.
9. Se cortaron las muestras a 3 micras de espesor.

10. Se desparafinaron las muestras en la estufa a 60°C durante 24 horas.
11. Se hidrataron las muestras de tejido (laminillas).
12. Se tiñeron las laminillas.
13. En el caso de la tinción H y E, se deshidrataron las muestras de tejido (laminillas).
14. Se montaron las laminillas en un medio de resina sintética.
15. Se observaron las preparaciones al microscopio óptico de luz.

5.10.1 Tinción con hematoxilina y eosina (HyE)

1. Se colocaron las laminillas en una canastilla de metal y se sumergieron en una solución de hematoxilina de Harris (Merck, Alemania) durante 3 minutos.
2. Se lavaron en un recipiente con agua corriente (30 baños).
3. Se sumergieron las laminillas en una solución acuosa de hidróxido de amonio al 1% (15 segundos), para diferenciar el tejido.
4. Se lavaron las laminillas en agua corriente (30 baños).
5. Se limpió con una gasa el exceso de hematoxilina de las laminillas.
6. Se sumergieron las laminillas en alcohol al 96% (30 baños).
7. Se tiñeron las laminillas con eosina amarillenta (Merck, Alemania), durante 3 minutos.

5.10.2 Tinción con safranina-O

1. Se tiñeron las laminillas en una solución de "Fast Green" (Merck, Alemania) al 0.001%, durante 5 minutos.
2. Se sumergieron las laminillas en una solución de ácido acético al 1%, durante 10 segundos para fijar el color verde.
3. Se tiñeron las laminillas en una solución de Safranina O (Merck, Alemania) al 0.1%, durante 1 hora con 30 minutos.
4. Se dejaron secar al aire las laminillas.
5. Se sumergieron las laminillas durante 10 minutos en xilol.
6. Se montaron las laminillas en un medio resinoso.

5.10.3 Tinción tricrómica de Masson

1. Se metieron las laminillas en una solución fijadora de "Bowins" durante 24 horas a temperatura ambiente.
2. Se lavaron las laminillas con agua corriente y después con agua destilada.
3. Se tiñeron las laminillas con una solución de fucsina ácida 1% - escarlata de Biebrich (Merck, Alemania) 1%, durante 10 minutos.
4. Se enjuagaron con agua destilada.
5. Se diferenciaron las laminillas en una solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (Merck, Alemania) durante 15 minutos.

6. Se contrastaron con una solución de azul de anilina (Merck, Alemania) durante 10 minutos.
7. Se enjuagaron las laminillas con agua corriente.
8. Se dejaron secar al aire las laminillas.
9. Se metieron las laminillas al xilol durante 10 minutos.
10. Se montaron las laminillas en un medio resinoso.

5.10.4 Tinción con azul alciano, pH 1.0

1. Se metieron las laminillas en una solución de azul alciano (Merck, Alemania) 8GX (1 g) en una solución de 100 ml de ácido clorhídrico al 0.1 N, durante 24 horas.
2. Se secaron las laminillas con papel filtro.
3. Se sumergieron las laminillas durante 5 segundos en: alcohol etílico al 96% (2 veces), alcohol etílico absoluto al 100% (2 veces) y alcohol-xilol.
4. Se dejaron sumergidas las laminillas durante 20 minutos en xilol.
5. Se montaron las laminillas en un medio resinoso.

5.11 Análisis estadístico

En el presente trabajo se aplicaron los siguientes estadísticos no paramétricos: Chi cuadrada o en su caso, la prueba exacta de Fisher, U de Mann-Whitney y el coeficiente de correlación rho de Spearman.

Las diferencias entre experimental y control se consideraron significativas cuando la probabilidad de error alfa fue menor a 0.05.

Los datos fueron analizados en el programa de cómputo SPSS versión 11.

VI. RESULTADOS

No se presentaron complicaciones posoperatorias en ninguno de los caballos ni tampoco rechazo a los injertos, ya que no hubo inflamación articular ni claudicación.

Al observar macroscópicamente el tejido de reparación en las babillas implantadas, éste presentó una superficie lisa, brillante, grisácea y con buena integración al cartílago sano que lo rodeaba; sin embargo no relleno por completo la lesión.

Babilla derecha = Experimental.

Babilla izquierda = Control.

6.1 Evaluación por resonancia magnética del tejido de reparación

Interpretación:

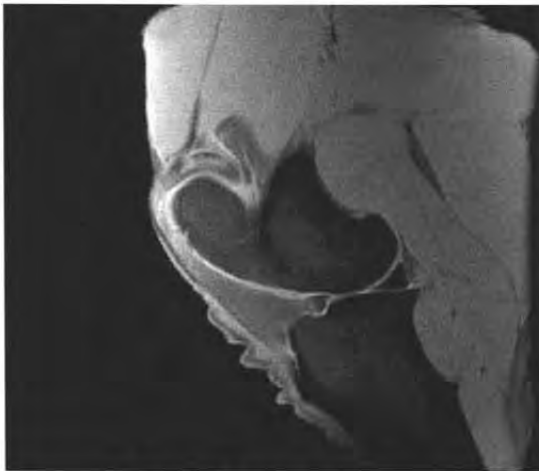
1 = normal o cercano a lo normal.

0 = anormal.

Total máximo posible de puntos = 4.

Caso 1 “Tordilla”

CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO	CALIFICACIÓN	
	CONTROL	EXPERIMENTAL
Integridad de la superficie y contorno	0	1
Señal de cartílago en la región del injerto	0	1
Grosor del tejido	0	0
Cambios en el hueso subcondral	0	0
Total	0	2



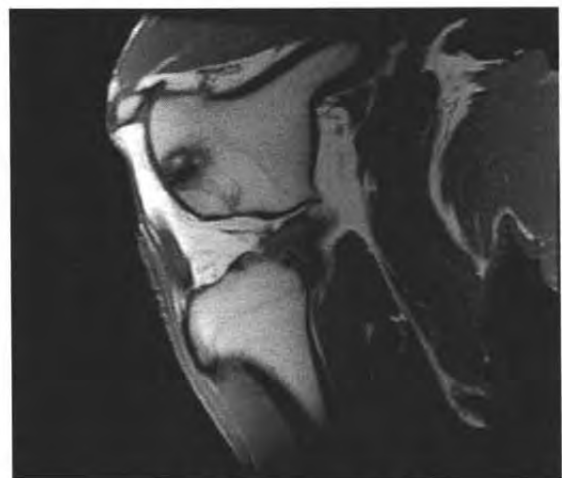
T2 FAT SAT Control



T2 FAT SAT Experimental



T1 Control



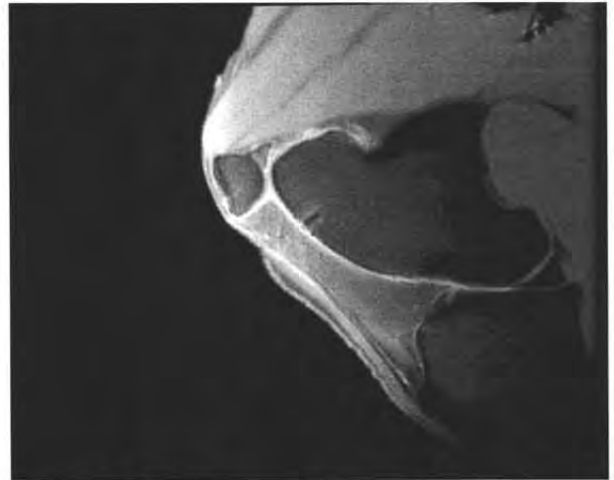
T1 Experimental

Caso 2 “Alazana”

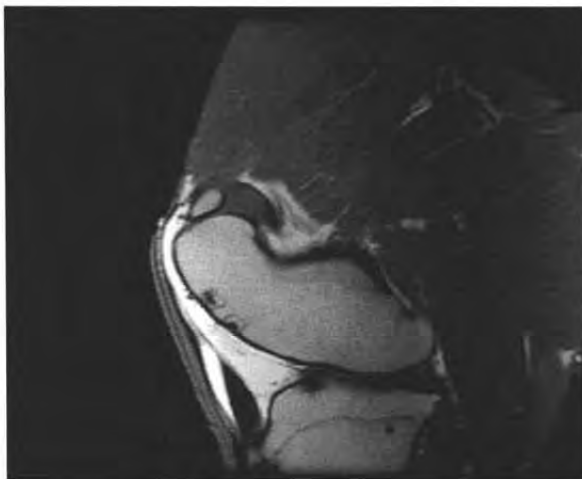
CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO	CALIFICACIÓN	
	CONTROL	EXPERIMENTAL
Integridad de la superficie y contorno	0	0
Señal de cartílago en la región del injerto	0	1
Grosor del tejido	0	0
Cambios en el hueso subcondral	0	0
Total	0	1



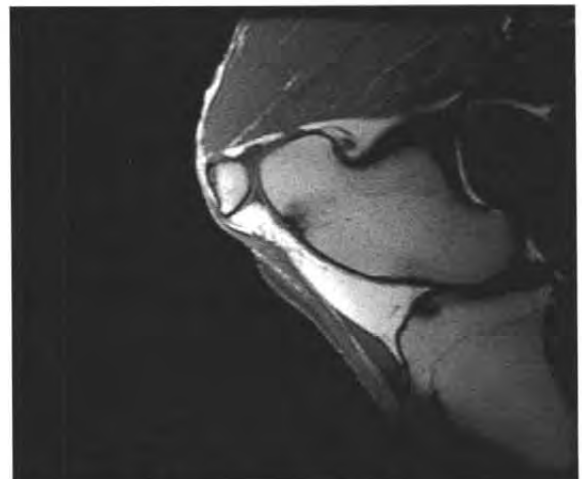
T2 FAT SAT Control



T2 FAT SAT Experimental



T1 Control



T1 Experimental

Caso 3 “Colorada I”

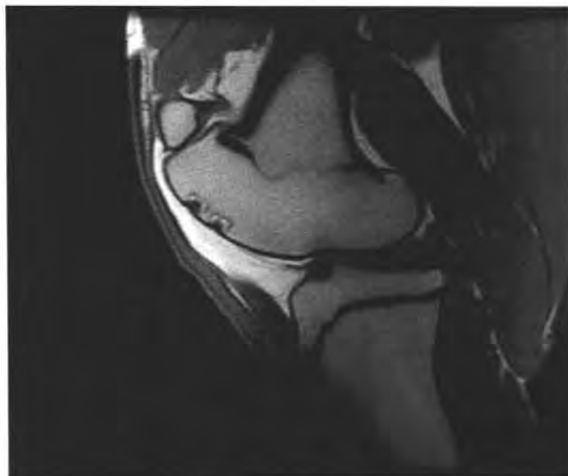
CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO	CALIFICACIÓN	
	CONTROL	EXPERIMENTAL
Integridad de la superficie y contorno	0	1
Señal de cartílago en la región del injerto	0	1
Grosor del tejido	0	0
Cambios en el hueso subcondral	0	0
Total	0	2



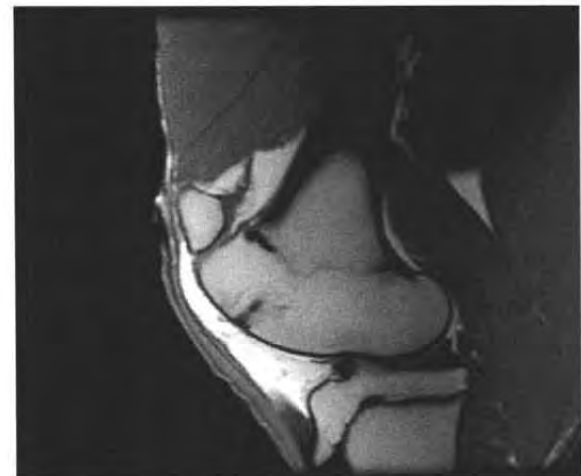
T2 FAT SAT Control



T2 FAT SAT Experimental



T1 Control



T1 Experimental

Caso 4 "Colorada II"

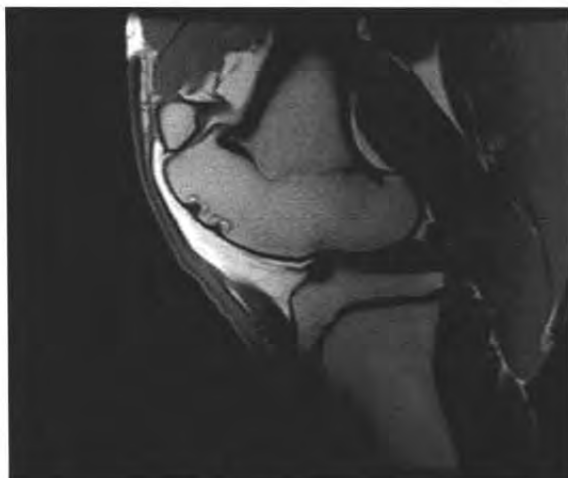
CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO	CALIFICACIÓN	
	CONTROL	EXPERIMENTAL
Integridad de la superficie y contorno	1	1
Señal de cartílago en la región del injerto	0	1
Grosor del tejido	0	1
Cambios en el hueso subcondral	0	0
Total	1	3



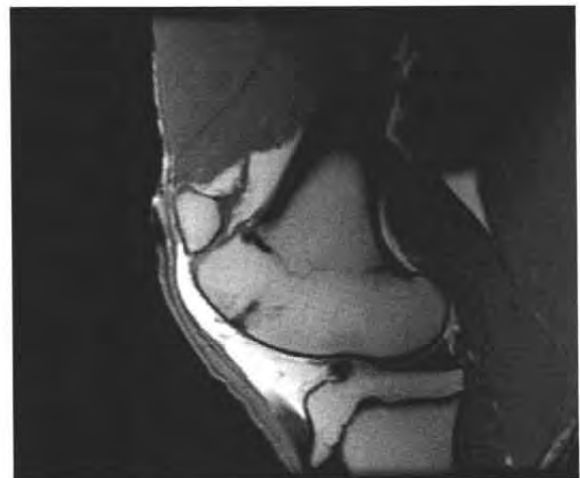
T2 FAT SAT Control



T2 FAT SAT Experimental



T1 Control



T1 Experimental

Caso 5 “Rosillo”

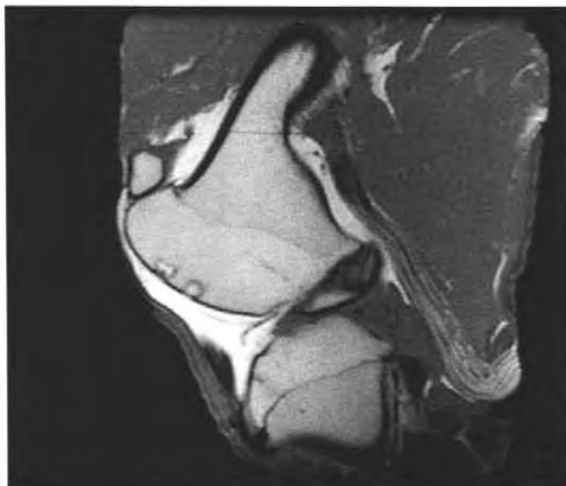
CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO	CALIFICACIÓN	
	CONTROL	EXPERIMENTAL
Integridad de la superficie y contorno	0	0
Señal de cartílago en la región del injerto	0	1
Grosor del tejido	1	1
Cambios en el hueso subcondral	0	0
Total	1	2



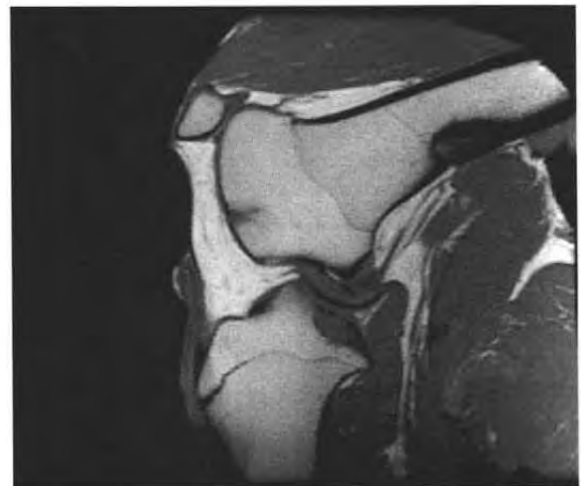
T2 FAT SAT Control



T2 FAT SAT Experimental



T1 Control

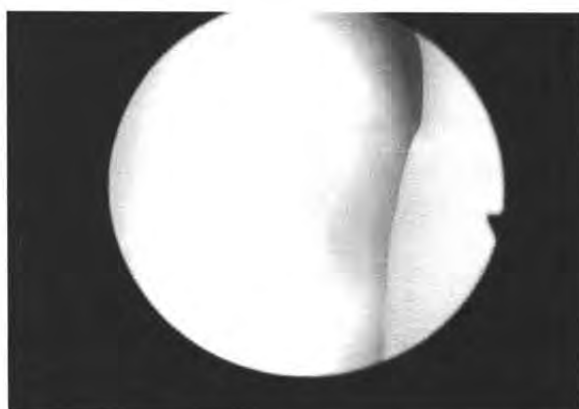


T1 Experimental

Caso 2. Alazana



Control



Experimental

Parámetros	Control	Exp.
Tejido de reparación	1	1
% ocupación del tejido dentro del defecto	3	3
Integración al tejido nativo de la periferia	1	3
Nivel del tejido en relación a la superficie articular	0	0
Superficie	0	1
Color	0	0
Textura	0	1
Consistencia	0	1
Total	5	10

6.1.2 Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación por resonancia magnética del tejido de reparación

CASOS	CONTROL	EXPERIMENTAL
1. Tordilla	0	2
2. Alazana	0	1
3. Colorada I	0	2
4. Colorada II	1	3
5. Rosillo	1	2
Total	2	10

Comentario: El grupo experimental superó con 8 puntos al grupo control.

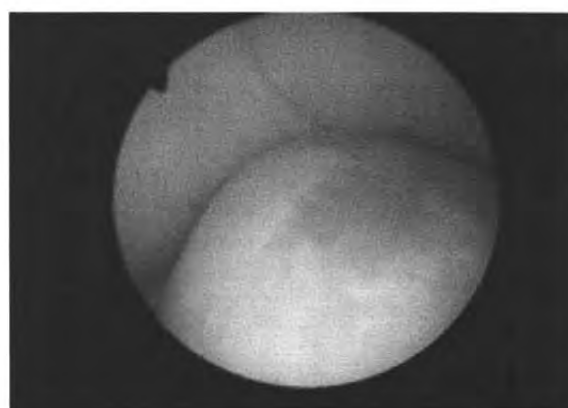
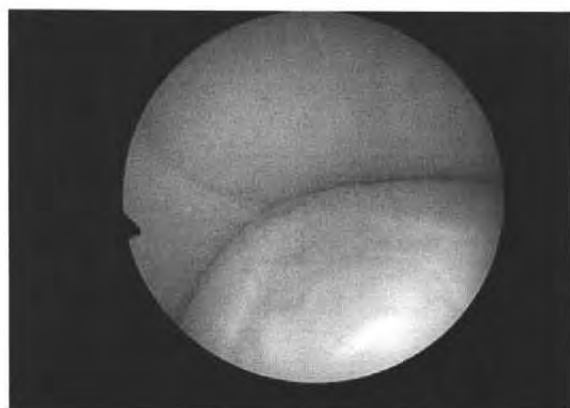
6.2 Evaluación por artroscopía del tejido de reparación

El tejido de reparación obtenido en ambas babillas (experimental-derecha y control-izquierda) de cada uno de los caballos, fue calificado con base a los parámetros de la siguiente tabla:

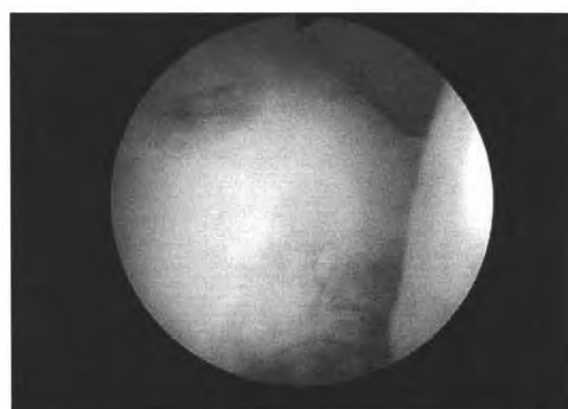
Parámetros	Puntuación	
Tejido de reparación	Ausencia = 0	Presencia = 1
% ocupación del tejido dentro del defecto	25% = 0 50% = 1	75% = 2 100% = 3
Integración al tejido nativo de la periferia	Nula = 0 Regular = 1	Buena = 2 Muy buena = 3
Nivel del tejido en relación a la superficie articular	Hundido = 0 Protuberante = 0	Mismo nivel = 1
Superficie	Irregular = 0	Regular = 1
Color	Otro = 0	Blanco = 1
Textura	Rugosa = 0	Lisa = 1
Consistencia	Blanda = 0	Firme = 1

Total máximo de puntos = 12

Caso 1. Tordilla



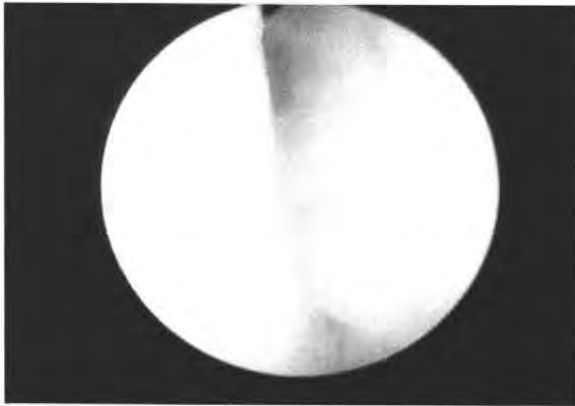
Control



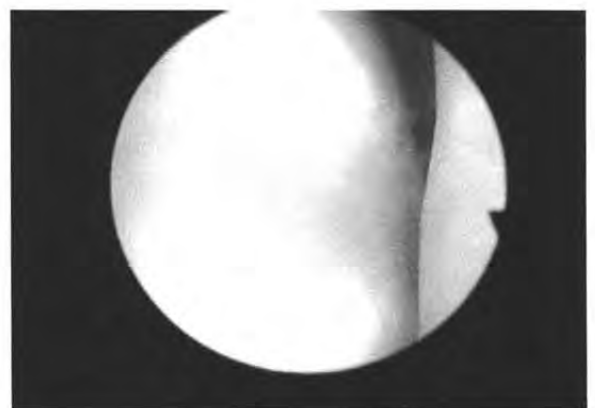
Experimental

Parámetros	Control	Exp.
Tejido de reparación	1	1
% ocupación del tejido dentro del defecto	2	2
Integración al tejido nativo de la periferia	1	1
Nivel del tejido en relación a la superficie articular	0	0
Superficie	0	0
Color	0	0
Textura	0	0
Consistencia	0	1
Total	4	5

Caso 2. Alazana



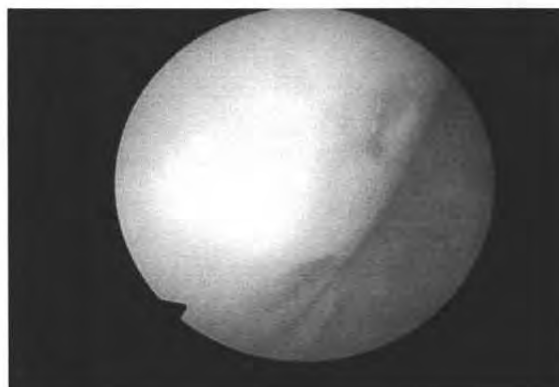
Control



Experimental

Parámetros	Control	Exp.
Tejido de reparación	1	1
% ocupación del tejido dentro del defecto	3	3
Integración al tejido nativo de la periferia	1	3
Nivel del tejido en relación a la superficie articular	0	0
Superficie	0	1
Color	0	0
Textura	0	1
Consistencia	0	1
Total	5	10

Caso 3. Colorada I



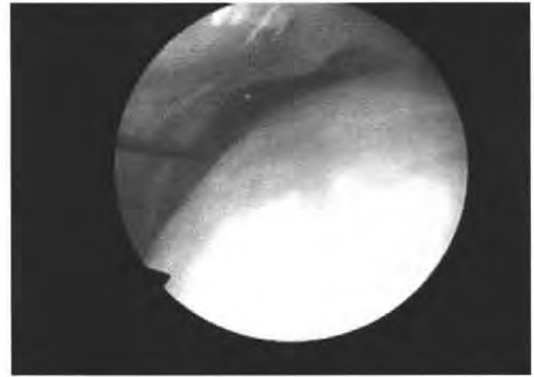
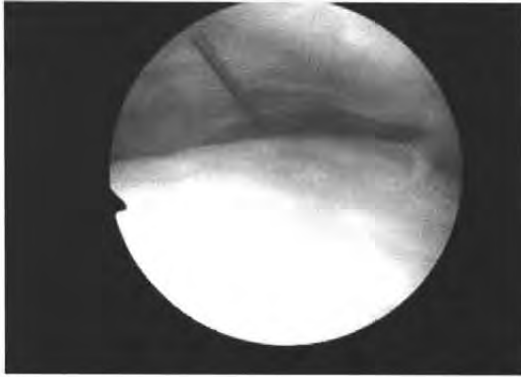
Control



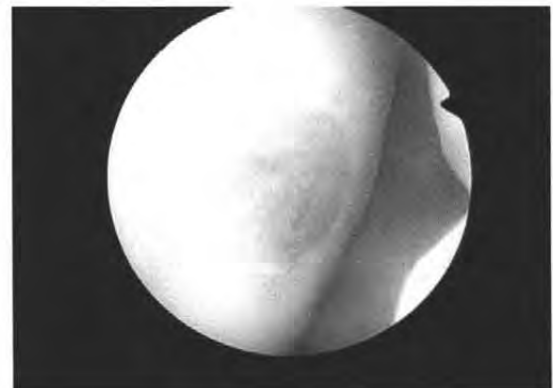
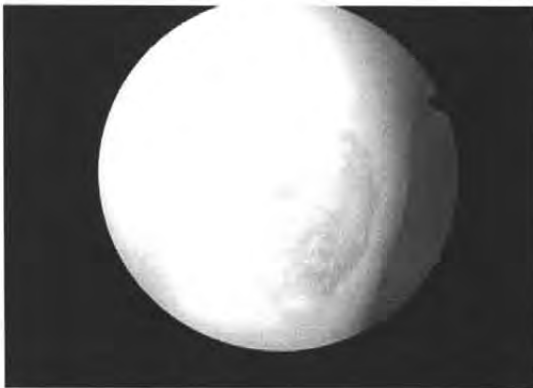
Experimental

Parámetros	Control	Exp.
Tejido de reparación	1	1
% ocupación del tejido dentro del defecto	1	2
Integración al tejido nativo de la periferia	1	2
Nivel del tejido en relación a la superficie articular	0	0
Superficie	0	0
Color	0	0
Textura	0	0
Consistencia	1	1
Total	4	6

Caso 4. Colorada II



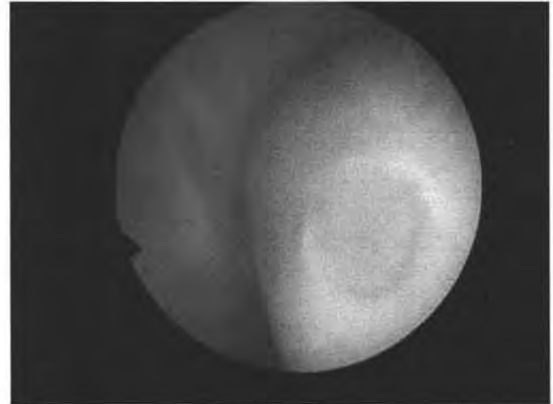
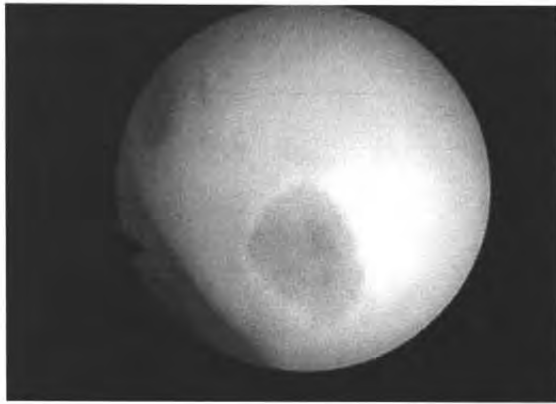
Control



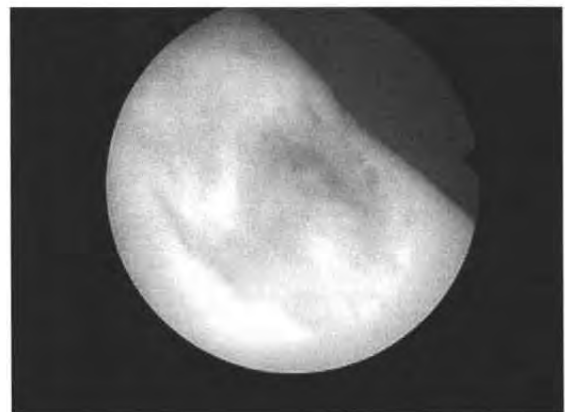
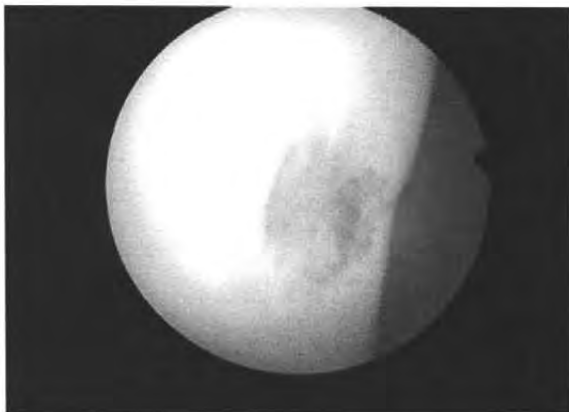
Experimental

Parámetros	Control	Exp.
Tejido de reparación	1	1
% ocupación del tejido dentro del defecto	2	2
Integración al tejido nativo de la periferia	1	2
Nivel del tejido en relación a la superficie articular	0	0
Superficie	0	0
Color	0	0
Textura	0	1
Consistencia	0	1
Total	4	7

Caso 5. Rosillo



Control



Experimental

Parámetros	Control	Exp.
Tejido de reparación	1	1
% ocupación del tejido dentro del defecto	1	2
Integración al tejido nativo de la periferia	1	2
Nivel del tejido en relación a la superficie articular	0	0
Superficie	0	0
Color	0	0
Textura	0	1
Consistencia	1	1
Total	4	7

6.2.1 Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación artroscópica del tejido de reparación

CASOS	CONTROL	EXPERIMENTAL
1. Tordilla	4	5
2. Alazana	5	10
3. Colorada I	4	6
4. Colorada II	4	7
5. Rosillo	4	7
Total	21	35

Comentario: El grupo experimental superó con 14 puntos al grupo control.

6.3 Evaluación histológica del tejido de reparación

El tejido de reparación obtenido en ambas babillas (experimental-derecha y control-izquierda) de cada uno de los caballos, fue calificado con base a los parámetros de la siguiente tabla:

CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO	CALIFICACIÓN
1. Morfología	Hialino= 3 Hialino/fibrocartilago= 2 Fibrocartilago= 1 Tejido fibroso= 0
2. Afinidad por la tinción	Cercana a la normal= 1 Anormal= 0
3. Arquitectura de la superficie	Cercana a la normal=2 Moderadamente irregular=1 Muy irregular=0
4. Agregados de condrocitos	Ninguno=1 Menor o igual al 25 % de las células= 0.5 Mayor al 25% de las células= 0
5. Integración basal	Buena= 1 Pobre= 0

Total máximo de puntos = 8

Caso 1. Tordilla

Tinción Hematoxilina y Eosina	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	2	1	1	5
Experimental	0.5	1	1	1	1	4.5

Tinción Tricrómica de Masson	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0.5	1	2	0.5	1	5
Experimental	0	1	1	1	1	4

Tinción Safranina O	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	0	1	1	3
Experimental	0	1	0	1	1	3

Tinción Azul alciano	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	0	1	1	1	3
Experimental	0	0	0	1	0	1

Caso 2. Alazana

Tinción Hematoxilina y Eosina	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	0	1	1	3
Experimental	0	1	2	1	1	5

Tinción Tricrómica de Masson	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	1	1	1	4
Experimental	1	1	1	1	1	5

Tinción Safranina O	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	1	1	1	4
Experimental	0	1	1	1	1	4

Tinción Azul alciano	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	0	0	1	1	2
Experimental	0	0	1	1	1	3

Caso 3. Colorada I

Tinción Hematoxilina y Eosina	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	2	1	0	4
Experimental	1	1	2	0.5	1	5.5

Tinción Tricrómica de Masson	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	2	1	0	4
Experimental	0	1	2	1	1	5

Tinción Safranina O	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	1	1	1	4
Experimental	0	1	1	1	1	4

Tinción Azul alciano	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	0	2	1	0	3
Experimental	0	0	1	1	1	3

Caso 4. Colorada II

Tinción Hematoxilina y Eosina	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	2	1	1	5
Experimental	0	1	2	1	1	5

Tinción Tricrómica de Masson	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	2	1	1	5
Experimental	0	1	2	1	0	4

Tinción Safranina O	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	2	1	1	5
Experimental	0	1	1	1	0	3

Tinción Azul alciano	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	0	1	1	1	3
Experimental	0	0	2	1	1	4

Caso 5. Rosillo

Tinción Hematoxilina y Eosina	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	2	1	0	4
Experimental	0	1	2	1	1	5

Tinción Tricrómica de Masson	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	2	1	1	5
Experimental	0	1	1	1	1	4

Tinción Safranina O	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	1	2	1	1	5
Experimental	0	1	1	1	1	4

Tinción Azul alciano	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Control	0	0	1	1	1	3
Experimental	0	0	2	1	1	4

6.3.1 Resultados por tinciones

Hematoxilina y Eosina

Casos	Grupo control	Grupo experimental
1. Tordilla	5	4.5
2. Alazana	3	5
3. Colorada I	4	5.5
4. Colorada II	5	5
5. Rosillo	4	5
Total	21	25

Tricrómica de Masson

Casos	Grupo control	Grupo experimental
1. Tordilla	5	4
2. Alazana	4	5
3. Colorada I	4	5
4. Colorada II	5	4
5. Rosillo	5	4
Total	23	22

Safranina O

Casos	Grupo control	Grupo experimental
1. Tordilla	3	3
2. Alazana	4	4
3. Colorada I	4	4
4. Colorada II	5	3
5. Rosillo	5	4
Total	21	18

Azul alciano

Casos	Grupo control	Grupo experimental
1. Tordilla	3	1
2. Alazana	2	3
3. Colorada I	3	3
4. Colorada II	3	4
5. Rosillo	3	4
Total	14	15

6.3.2 Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación histológica del tejido de reparación

Tinción	Grupo control	Grupo experimental
Hematoxilina y Eosina	21	25
Tricrómica de Masson	23	22
Safranina O	21	18
Azul alciano	14	15
Total	79	80

El grupo experimental superó con un punto al grupo control.

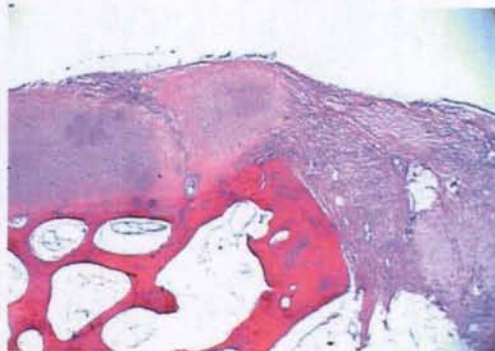
6.4 Resultados de los tres diferentes tipos de evaluación del tejido de reparación

Evaluación	Grupo control	Grupo experimental
Resonancia magnética	2	10
Artroscópica	21	35
Histológica	79	80
Total	102	125

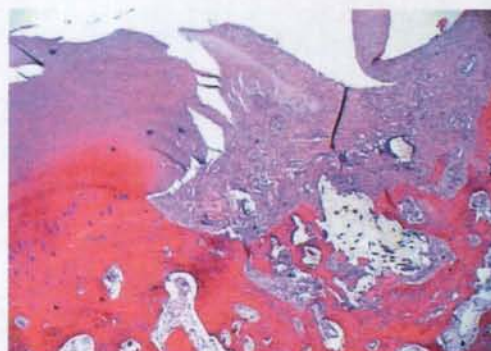
El grupo experimental superó con 23 puntos al grupo control.

A continuación se muestran las fotografías de los cortes histológicos del tejido de reparación obtenido en ambos grupos, con las diferentes tinciones que se utilizaron para su evaluación.

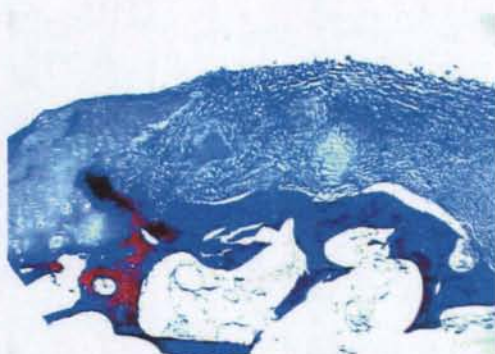
Caso 1. Tordilla



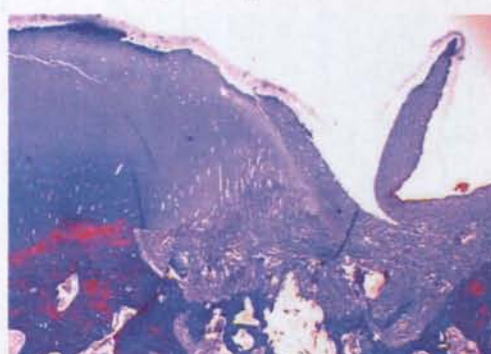
H y E Control 5x



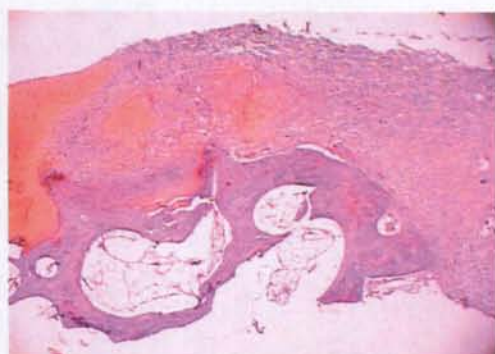
H y E Implante 5x



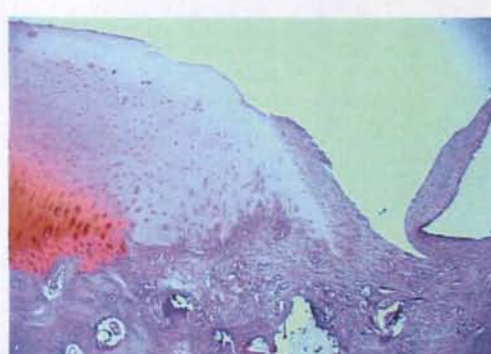
Masson Control 5x



Masson Implante 5x



Safranina Control 5x



Safranina Implante 5x

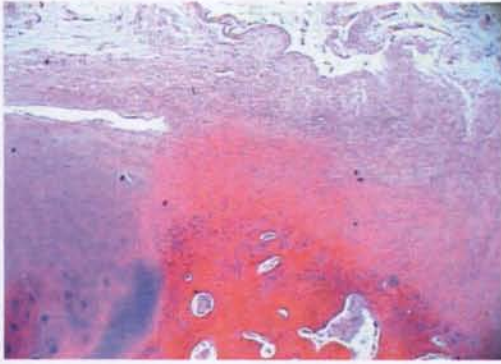


Azul alciano Control 5x

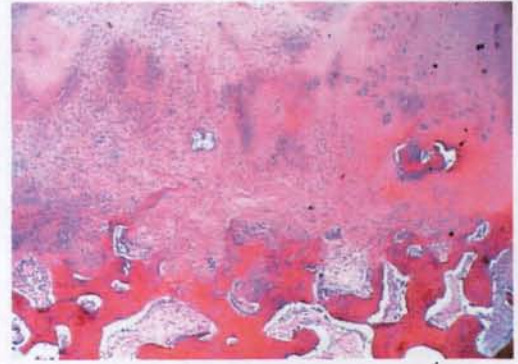


Azul alciano Implante 5x

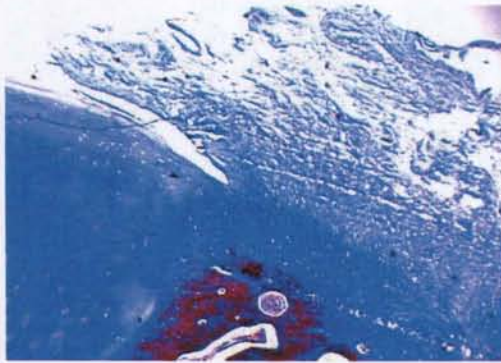
Caso 2. Alazana



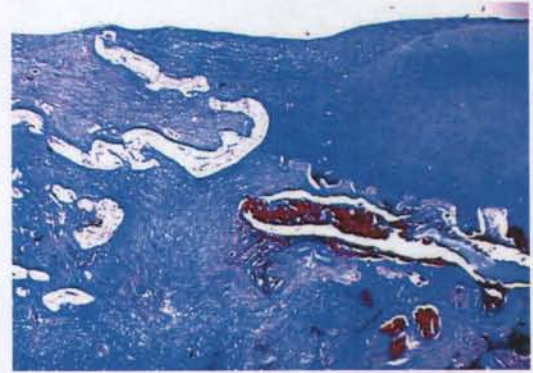
H y E Control 5x



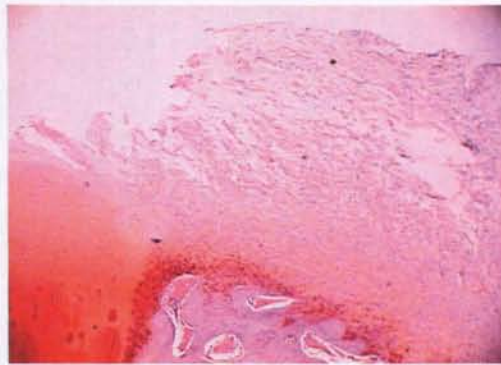
H y E Implante 5x



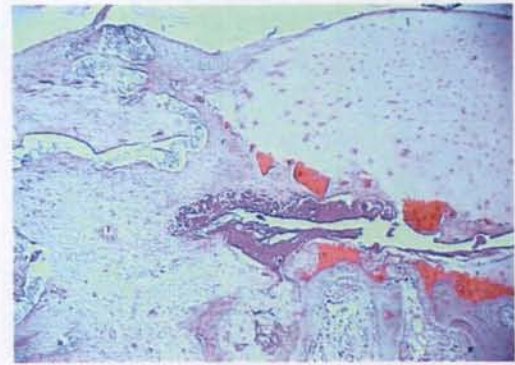
Masson Control 5x



Masson Implante 5x



Safranina Control 5x



Safranina Implante 5x

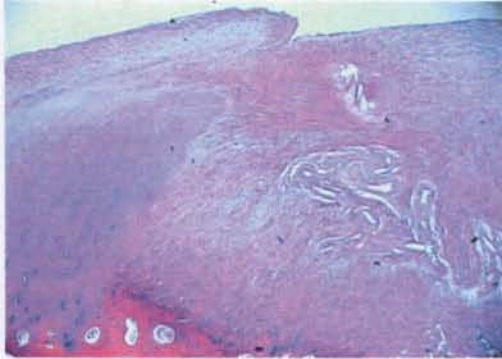


Azul alciano Control 5x

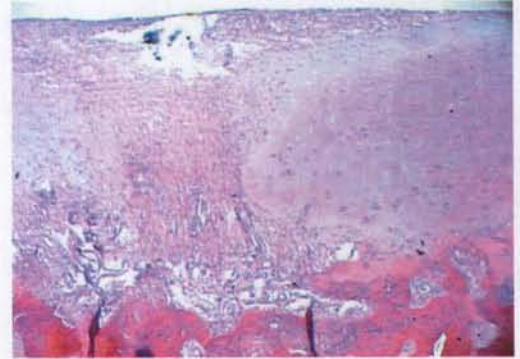


Azul alciano Implante 5x

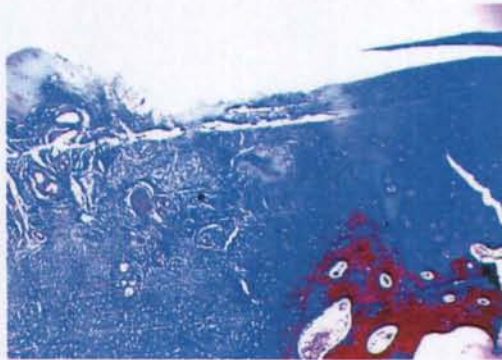
Caso 3. Colorada I



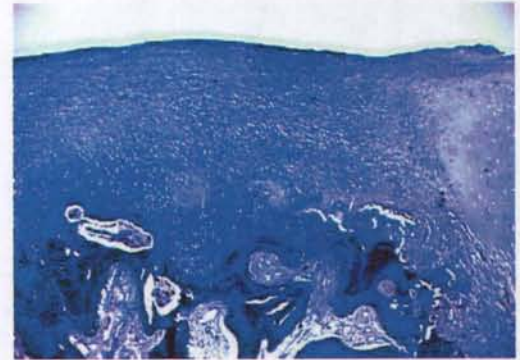
H y E Control 5x



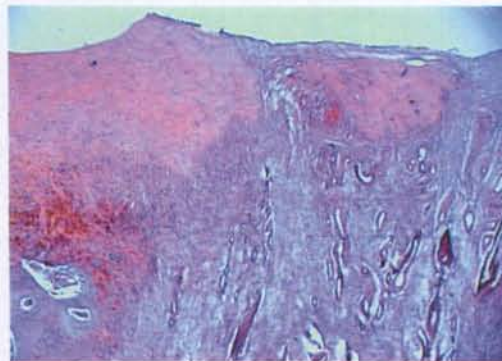
H y E Implante 5x



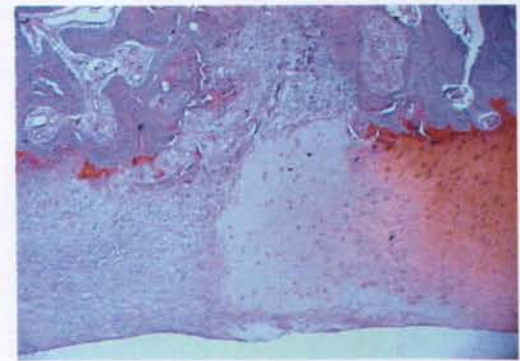
Masson Control 5x



Masson Implante 5x



Safranina Control 5x



Safranina Implante 5x

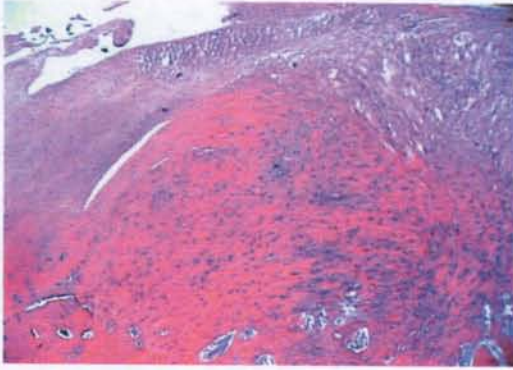


Azul alciano Control 5x

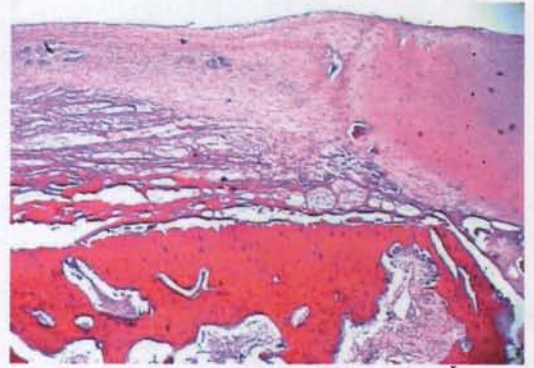


Azul alciano Implante 5x

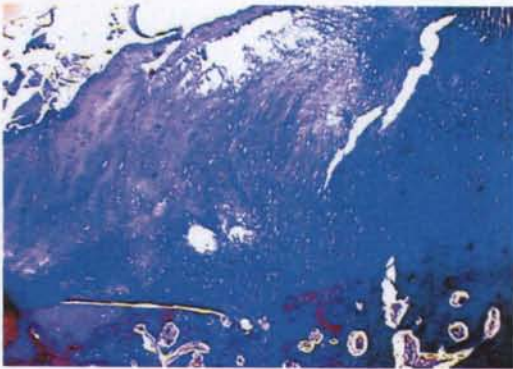
Caso 4. Colorada II



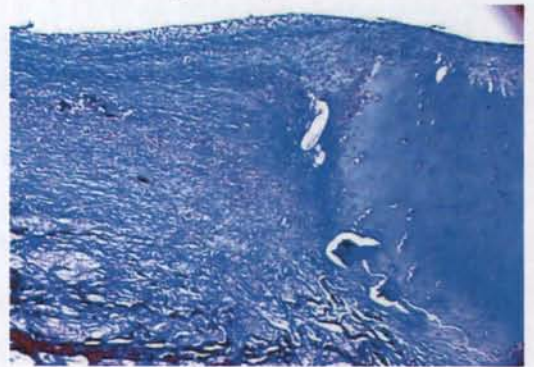
H y E Control 5x



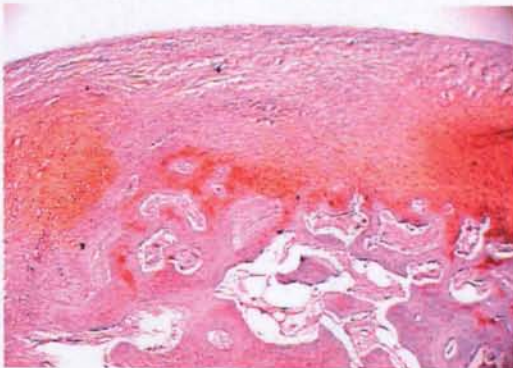
H y E Implante 5x



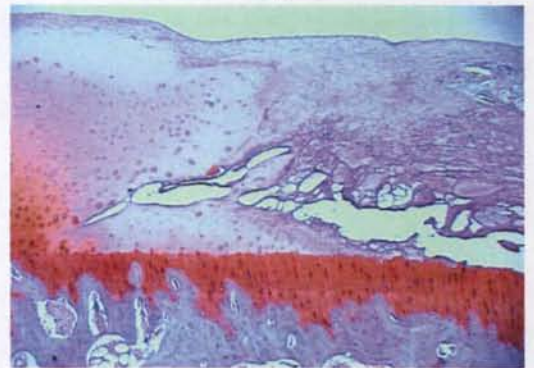
Masson Control 5x



Masson Implante 5x



Safranina Control 5x



Safranina Implante 5x

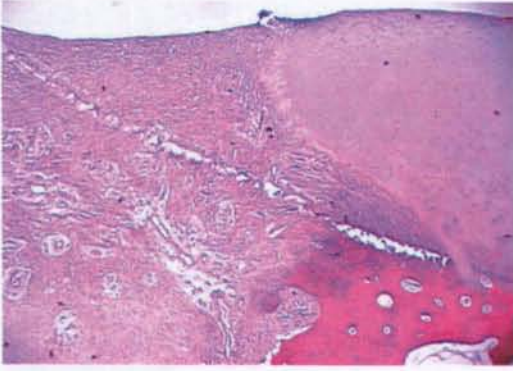


Azul alciano Control 5x

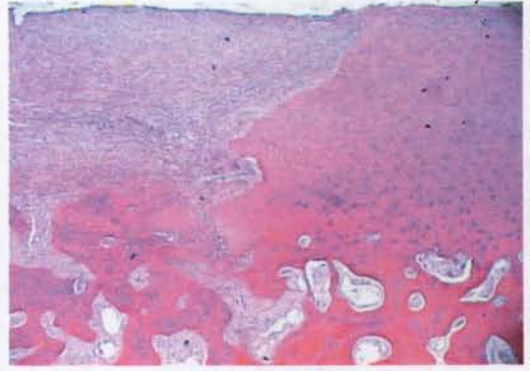


Azul alciano Implante 5x

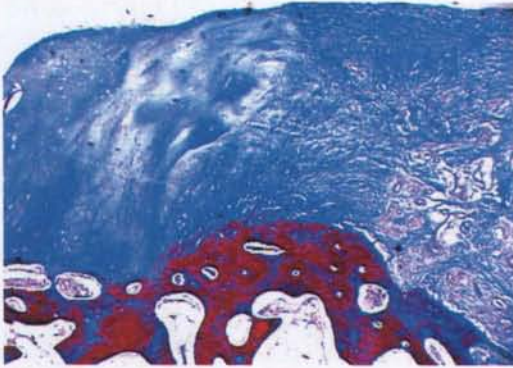
Caso 5. Rosillo



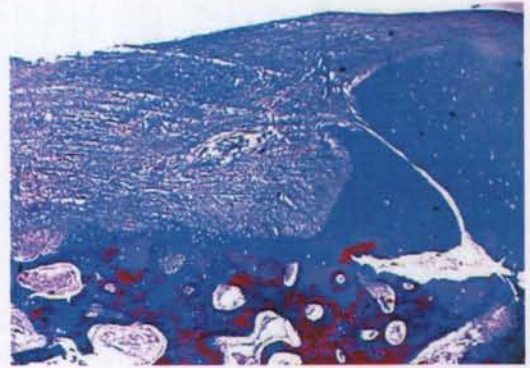
H y E Control 5x



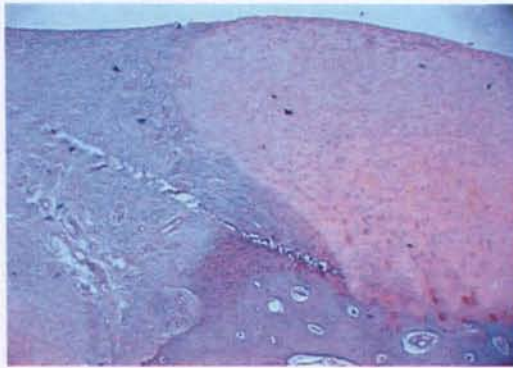
H y E Implante 5x



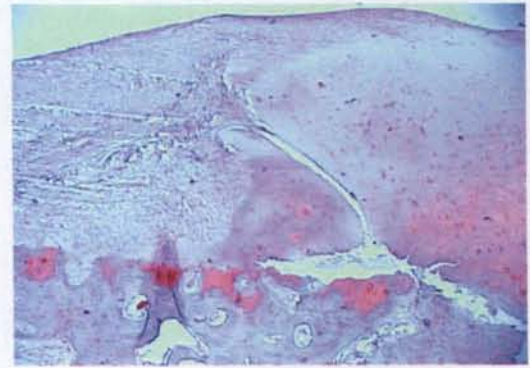
Masson Control 5x



Masson Implante 5x



Safranina Control 5x



Safranina Implante 5x



Azul alciano Control 5x



Azul alciano Implante 5x

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con la prueba exacta de Fisher se hicieron los siguientes cálculos:

Tabla 1. Características del tejido evaluadas por resonancia magnética (RM)

Características	Nivel de medición	Experimental (n = 5)	Control (n = 5)	Valor de p
Integridad de la superficie y contorno	Normal/Cercano normal	3	1	0.220
Señal de cartilago en la región del injerto	Normal/Cercano normal	5	0	0.004
Grosor del tejido	Normal/Cercano normal	2	1	0.500
Cambios en el hueso subcondral	Normal/Cercano normal	0	0	----

(p = 0.004) Con el parámetro “señal de cartilago en la región del injerto” si hubo diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y el control.

Tabla 2. Resultado total de la evaluación por RM.

Nivel/Puntaje	Experimental	Control	Total
Bueno/regular (2-3)	4	0	4
Malo/muy malo (0-1)	1	5	6
Total	5	5	10

(p = 0.032) Si hubo diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y el control.

Tabla 3. Características del tejido evaluadas por artroscopía.

Características	Nivel de medición	Experimental (n = 5)	Control (n = 5)	Valor de p
Tejido de reparación	Presencia	5	5	----
% de ocupación del tejido dentro del defecto	75 -100 %	5	3	0.26
Integración al tejido nativo de la periferia	Muy buena/ buena	4	0	0.03
Nivel del tejido en relación a la superficie articular	Mismo nivel	0	0	----
Superficie	Regular	1	0	0.50
Color	Blanco	0	0	----
Textura	Lisa	3	0	0.08
Consistencia	Firme	5	2	0.08

(p = 0.03) Con el parámetro “Integración al tejido nativo de la periferia” si hubo diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y el control.

Tabla 4. Resultado total de la evaluación por artroscopia.

Nivel/Puntaje	Experimental	Control	Total
Muy Bueno (9-12)	1	0	1
Bueno (6-8)	3	0	3
Regular (3-5)	1	5	6
Malo (0-2)	0	0	0
Total	5	5	10

($p = 0.036$) Si hubo diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y el control.

Tabla 5. Características del tejido evaluadas por histología: Hematoxilina y Eosina (HE).

Características	Nivel de medición	Experimental (n = 5)	Control (n = 5)	Valor de p
Morfología	Tejido fibroso	3	5	0.28
Afinidad por la tinción	Cercana a la normal	5	5	-----
Arquitectura de la superficie	Cercana a la normal	4	4	0.36
Agregados de condrocitos	Ninguno	4	5	0.50
Integración basal	Buena	5	3	0.22

($p > 0.05$) No hubo diferencia estadística significativa entre ambos grupos.

Tabla 6. Características del tejido evaluadas por histología: Tricrómica de Masson (TM).

Características	Nivel de medición	Experimental (n = 5)	Control (n = 5)	Valor de p
Morfología	Tejido fibroso	4	4	0.36
Afinidad por la tinción	Cercana a la normal	5	5	-----
Arquitectura de la superficie	Cercana a la normal	2	4	0.26
Agregados de condrocitos	Ninguno	5	4	0.50
Integración basal	Buena	4	4	0.77

($p > 0.05$) No hubo diferencia estadística significativa entre ambos grupos.

Tabla 7. Características del tejido evaluadas por histología: Safranina O (SO).

Características	Nivel de medición	Experimental (n = 5)	Control (n = 5)	Valor de p
Morfología	Tejido fibroso	5	5	-----
Afinidad por la tinción	Cercana a la normal	5	5	-----
Arquitectura de la superficie	Cercana a la normal	4	2	0.26
Agregados de condrocitos	Ninguno	5	5	-----
Integración basal	Buena	4	5	0.50

(p > 0.05) No hubo diferencia estadística significativa entre ambos grupos.

Tabla 8. Características del tejido evaluadas por histología: azul alciano (AA).

Características	Nivel de medición	Experimental (n = 5)	Control (n = 5)	Valor de p
Morfología	Tejido fibroso	5	5	-----
Afinidad por la tinción	Cercana a la normal	5	5	-----
Arquitectura de la superficie	Cercana a la normal	2	3	0.76
Agregados de condrocitos	Ninguno	5	5	-----
Integración basal	Buena	4	4	0.77

(p > 0.05) No hubo diferencia estadística significativa entre ambos grupos.

Sección I. Evaluación por RM.
Puntos

Normal o cercano a lo normal Anormal

1

0

1. Integridad de la superficie y contorno
2. Señal de cartilago en la región del injerto
3. Grosor del tejido
4. Cambios en el hueso subcondral

Subtotal I: Máximo 4

Mínimo 0

Sección II. Evaluación por Artroscopía.

5. Tejido de reparación
6. % de ocupación del tejido dentro del defecto
7. Integración al tejido nativo de la periferia
8. Nivel del tejido en relación a la superficie articular
9. Superficie
- 10 Color
11. Textura
12. Consistencia

Subtotal II: Máximo 12

Mínimo 0

Sección III. Evaluación por histología.

Tinciones:	HE	TM	SO	AA	
13. Morfología					
14. Afinidad por la tinción					
15. Arquitectura de la superficie					
16. Agregados de condrocitos					
17. Integración Basal					

Subtotal III. Máximo	8	8	8	8	32
Mínimo	0	0	0	0	0

Total: Máximo 48 puntos

Mínimo 0 puntos

Escala:

Muy Bueno	48-37
Bueno	36-25
Regular	24-13
Malo	12 – 0

Tabla 9. Resultados globales de la evaluación del tejido de reparación con las 3 técnicas.

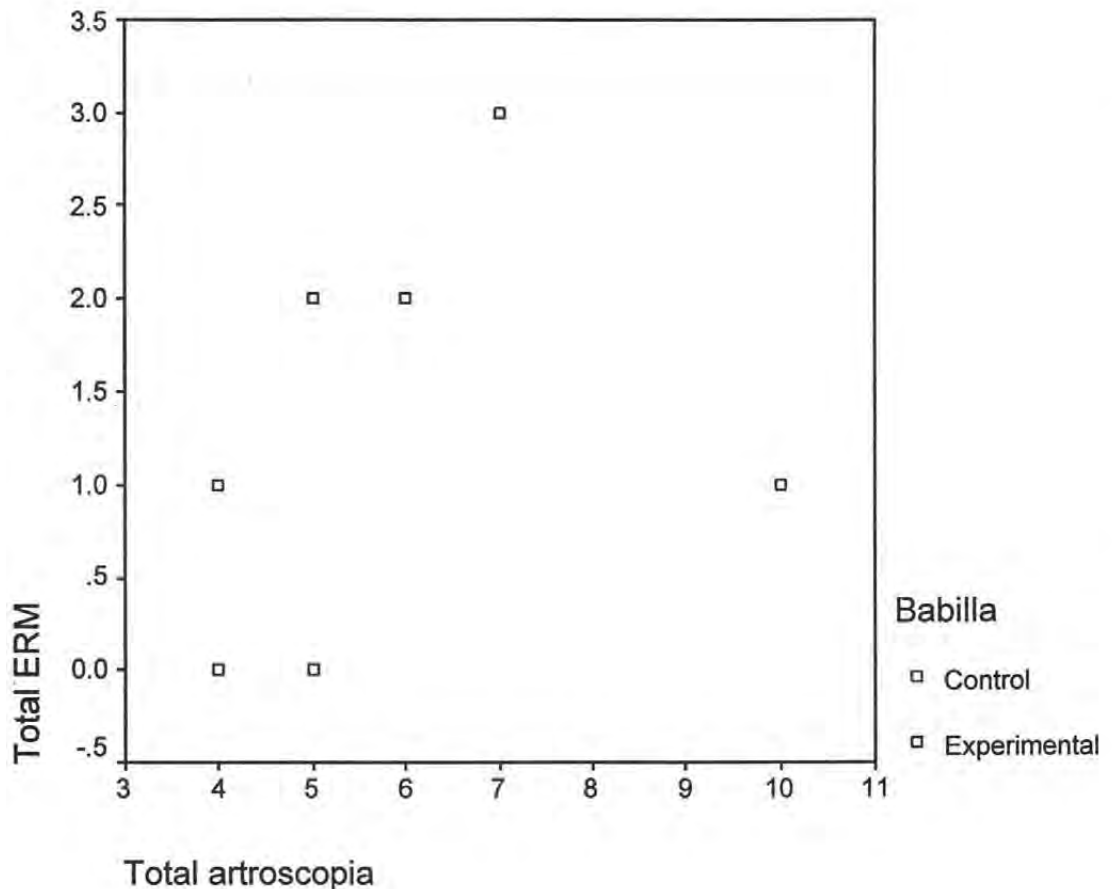
Nivel/Puntaje	Experimental	Control	Total
Muy Bueno (37-48)	0	0	0
Bueno (25-36)	4	0	4
Regular (13-24)	1	5	6
Malo (0-12)	0	0	0
Total	5	5	10

(p = 0.02) Si hubo diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y el control.

En términos globales, las babillas experimentales tuvieron resultados mucho mejores que las controles a expensas de las evaluaciones en los parámetros de resonancia magnética y artroscopía, no así con los histológicos.

**ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA**

Conviene destacar que los puntajes totales obtenidos por resonancia magnética (RM) correlacionan significativamente con los respectivos de artroscopía (ρ de Spearman = 0.633, $p = 0.04$) y que los 12 parámetros en conjunto (4 de RM y 8 de artroscopía) arrojan un coeficiente alfa de Cronbach de 0.75 (IC del 95 % de 0.41 a 0.92, $p = 0.0005$) lo que indica un muy buen nivel de consistencia del instrumento de evaluación combinado. Además, ambos instrumentos (RM y artroscopía) poseen la virtud de discriminar de manera adecuada a las babillas experimentales de las controles. Véase el siguiente gráfico de dispersión en el que se observa claramente que las babillas controles alcanzan un máximo de 5 puntos en la evaluación artroscópica y correlativamente un máximo de 1.0 punto en la de RM; discriminando categóricamente a las babillas experimentales que alcanzan un máximo de 10.0 y de 3.0 puntos, respectivamente.



VII. DISCUSIÓN

La enfermedad articular es común en la especie equina. La vida atlética o de trabajo en muchos caballos se ve afectada o eliminada prematuramente como consecuencia de claudicación debida a lesiones en el cartílago articular (McIlwraith, 1996).

La osteoartritis es una entidad patológica que se caracteriza por la degeneración progresiva y pérdida del cartílago articular, que provoca dolor crónico y disfunción articular. Desafortunadamente, la capacidad de regeneración espontánea del cartílago articular es muy limitada (Todhunter *et al.*, 1993; Buckwalter y Mankin 1998; Riggs, 2004). La osteoartritis tiene una gran importancia desde el punto de vista clínico y económico, ya que se encuentra entre las principales causas de desecho en los caballos, lo cual da la pauta para buscar nuevas opciones de tratamiento médico y quirúrgico (Frisbie, 2004).

Desde hace varios años, se han empleado diversas técnicas quirúrgicas (Frisbie *et al.*, 1999; Hurtig *et al.*, 2001; Frisbie, 2004) encaminadas a restaurar una superficie articular dañada en caballos. Sin embargo, los resultados clínicos no han sido del todo satisfactorios, principalmente a largo plazo. Dichas técnicas incluyen: artroplastía por abrasión, microfractura, mosaicoplastía, así como auto y aloinjertos osteocondrales entre otras. Asimismo, en algunos experimentos recientemente publicados (Ochi *et al.*, 2004; Litzke *et al.*, 2004), los autores concluyen que aún no se cuenta con una técnica de restauración de una superficie articular, que induzca la formación de un tejido de reparación con características bioquímicas y biomecánicas iguales a las del cartílago articular normal.

Por otra parte, la artroscopía es considerada como el "estándar de oro" para la evaluación clínica del cartílago articular. Esta técnica quirúrgica, a diferencia de la artrotomía, tiene varias ventajas, ya que es menos invasiva, suele producir menor dolor en el periodo posoperatorio, se asocia a un menor riesgo de complicaciones posoperatorias (infección) y el periodo de recuperación del paciente es más corto (McIlwraith y Martin 1985).

En la década actual, algunos grupos de investigadores que trabajan con caballos han utilizado tanto técnicas artroscópicas como artrotomía en sus experimentos sobre neocondrogénesis. Sin embargo, la artroscopia ha demostrado menos complicaciones posoperatorias con excelentes periodos de recuperación. Tal es el caso del estudio de Goodrich y colaboradores (2003), donde utilizaron técnicas artroscópicas para crear defectos condrales en la articulación fémoro-patelar de 16 caballos, que fueron tratados con condrocitos modificados genéticamente con un AdIGF-1 (Adenovirus insulín-like growth factor-1). 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 a consecuencia de artritis séptica. En otro experimento similar, Barnewitz y colaboradores (2003), implantaron por artrotomía en lesiones condrales de menudillo, un constructo de poliglactin / polidioxanon + condrocitos autólogos, ocasionando dolor posoperatorio intenso y en 1 de 3 caballos se produjo claudicación crónica.

Fortier y colaboradores (2002) implantaron artroscópicamente en la articulación fémoro-patelar de 8 caballos, un constructo (condrocitos alogénicos + fibrina polimerizada + IGF-1), utilizando una tachuela biodegradable de ácido poliláctico como método de fijación al hueso subcondral. En general, se considera que el uso de las anclas biodegradables para fijar a un implante dentro de una articulación es excelente, ya que tanto el cuerpo del ancla como su material de sutura se desintegrarán por completo. En el presente estudio, 8 semanas fueron suficientes para que las suturas biodegradables se desintegraran. Sin embargo, Barnewitz y colaboradores (2003) reportaron buenos resultados con el uso de un ancla no degradable de titanio, con sutura biodegradable para fijar a sus implantes.

Con la técnica artroscópica empleada en el presente estudio, no se pudo comprobar que las células hayan permanecido adheridas al copolímero en el momento de su implantación, ya que por el efecto de la turbulencia y presión generadas al ingresar líquido a la articulación, es posible que las células se hayan desprendido del implante. En ese sentido, se considera que las células estarían más seguras al colocar el implante mediante artrotomía como se ha hecho en otros estudios, tomando en cuenta las desventajas de dicha técnica. Sin embargo, existe otra alternativa artroscópica para implantación de un constructo sin el uso de un medio líquido. Tal es el caso del estudio de Fortier y colaboradores (2002) que utilizaron gas helio para distender la articulación. Sin embargo, se desconoce si dicho gas pudo haber tenido algún efecto tóxico para las células, o que haya desprendido algunas. Debido a lo anterior, se sugiere otra alternativa para proteger a las células de la influencia de los fluidos (líquido o gas) durante la cirugía artroscópica. Se trata de cambiar la estructura del constructo, de manera que las células queden cubiertas por su matriz o por otro polímero. Se considera que por haber utilizado células autólogas sobre un material biocompatible, no se presentó rechazo inmunológico en ninguno de los caballos del estudio.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación artroscópica del grupo experimental, se observó un tejido de reparación con características similares a las del cartílago articular normal, bien integrado al tejido nativo adyacente. De igual manera, en un experimento similar con caballos (Frisbie, 2004), donde implantaron un constructo (condrocitos + malla de colágena) sobre una lesión condral, las características artroscópicas del tejido de reparación a los 12 meses, eran superiores a las del grupo control.

Con la evaluación artroscópica a las 8 semanas en el presente estudio, fue posible encontrar diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y las lesiones consideradas como control.

El diagnóstico de lesiones condrales con imágenes de resonancia magnética se realiza rutinariamente en humanos, ya que es una técnica no invasiva y altamente sensible para evaluar al cartílago articular.

La resonancia magnética también es útil en el seguimiento del proceso de reparación de ese tipo de lesiones (Tapprest *et al.*, 2001). Por el contrario, en el campo de la ortopedia equina todavía existen muchas limitaciones para el uso de resonancia magnética, ya que hay poca disponibilidad de equipos por su elevado costo, además de que su uso está limitado para evaluar ciertas regiones del caballo, ya que fueron diseñados para la especie humana.

En el presente estudio pudimos evaluar el tejido de reparación con un equipo de resonancia magnética para humanos y se considera que los resultados obtenidos pueden justificar la utilización de esta tecnología, ya que las imágenes demostraron diferencias significativas entre el tejido neoformado del grupo experimental con el del sitio donador no tratado y usado como control, así como con el cartílago sano. Otros investigadores también han utilizado la resonancia magnética en experimentos similares, con diferentes secuencias de pulso. Tal es el ejemplo del estudio realizado en caballos por Hidaka y colaboradores (2003), donde se evaluó el tejido de reparación por resonancia magnética y fue posible encontrar diferencias entre el grupo experimental y su control. Con base en lo anterior, se confirma lo que Potter y colaboradores (1998) mencionan: "no existe una secuencia de pulso que por sí sola evalúe por completo al cartílago articular". Por este motivo, se recomienda emplear más de una secuencia de pulso para obtener mayor información sobre el tejido.

En este estudio, las babillas del grupo experimental presentaban mejores características que las usadas como control en la evaluación artroscópica y por resonancia magnética; además, los puntajes totales obtenidos por resonancia magnética se correlacionan significativamente con aquellos obtenidos con la evaluación artroscópica. Por lo tanto, podemos considerar que la artroscopía y la resonancia magnética se complementan entre sí en la evaluación de la reparación del cartílago articular, ya que cada una de ellas proporciona diferente información sobre el tejido neoformado y son técnicas aceptadas en este tipo de estudios (Martinelli *et al.*, 1996).

Por otra parte, con respecto a las características macroscópicas del tejido de reparación obtenido en este estudio, en las lesiones no reparadas usadas como control, se obtuvo un tejido que no parecía cartilago articular, ya que tenía una superficie irregular, parcialmente fibrilada y de consistencia blanda. Tales características sugieren cierto grado de degeneración tisular, por lo que posiblemente ese tejido no es capaz de soportar eficientemente el trabajo articular. Por el contrario, el tejido de reparación obtenido en el grupo experimental, macroscópicamente era más parecido al cartilago articular, ya que era más liso, brillante y rígido. Tales resultados coinciden con lo que otros investigadores también han observado en sus experimentos con caballos (Hidaka *et al.*, 2003; Litzke *et al.*, 2004).

De acuerdo con los resultados obtenidos con la evaluación histológica en el presente estudio, el tejido de reparación de ambos grupos (experimental y control) mostraba características de cartilago fibroso. En las lesiones usadas como control, el tejido rellenó parcialmente al defecto osteocondral en un periodo de 6 meses. En este caso y de acuerdo con Spector (2001) se cree que las células provenientes de la médula ósea fueron las responsables de la reparación del defecto, sin embargo, histológicamente no se observó una base ósea adecuada para soportar carga articular, lo cual coincide con lo que Hunziker (1999a) señala: "todo tejido de reparación intrínseca en lesiones osteocondrales, no persiste de manera definitiva". Por el contrario, se considera que el fibrocartilago del grupo experimental era más resistente a la carga articular, ya que se encontraba sobre el hueso subcondral intacto. Para comprobar lo antes expuesto, hubiese sido necesario realizar pruebas biomecánicas a los tejidos de reparación de ambos grupos.

Convery y colaboradores (1972) demostraron que los defectos condrales mayores a 7 mm de diámetro no se reparan por sí solos, por lo que teóricamente el fibrocartilago del grupo experimental fue formado a las 8 semanas en el defecto condral por el efecto del implante (constructo), probablemente con menor participación de las células de la médula ósea.

Además, dicho tejido rellenó casi en su totalidad los defectos y en la mayoría de los casos se integró al hueso subcondral y al cartílago nativo de la periferia. Lo anterior coincide con lo que Litzke y colaboradores (2004) obtuvieron en sus experimentos con el método de Carticel® en caballos, aunque ellos reportaron que al evaluar el tejido a los 2 años, éste era bioquímicamente más parecido al cartílago articular. En este caso, donde el tiempo de evaluación fue prolongado, se considera importante lo señalado por Ghadially (1975): “la influencia de un ambiente sinovial sobre un defecto condral, es importante para que éste sea reparado con una matriz cartilaginosa”.

En el presente estudio, no se determinó el estado de diferenciación de los condrocitos sembrados sobre el copolímero para fabricar el constructo, además, las células se cultivaron en monocapa (dos dimensiones) durante un rango de 19 a 24 semanas. A pesar de que algunos investigadores (Kuettner *et al.*, 1982b; Vacanti y Langer 1999; Hardingham *et al.*, 2002) han sugerido que los condrocitos sembrados en monocapa por más de 6 semanas con cultivos de alta densidad se desdiferenciarán en fibroblastos, otros autores (Nixon *et al.*, 1992; Paige *et al.*, 1996; Hunziker *et al.*, 2001a; Fortier *et al.*, 2002a) mencionan que éstas células al ser recultivadas en 3 dimensiones (agarosa o alginato), se rediferenciarán en condrocitos nuevamente.

Con base en las experiencias de otros autores y tomando en cuenta la técnica de cultivo celular en dos dimensiones que fue empleada en este estudio, es posible suponer que las células que fueron sembradas sobre el copolímero eran condrocitos desdiferenciados que probablemente se rediferenciaron parcialmente al ser sembrados en el polímero, dando finalmente lugar a la formación del tejido fibrocartilaginoso de reparación en el grupo experimental.

Los resultados de la evaluación histológica del tejido de reparación en este estudio demostraron que no hubo diferencias estadísticas significativas en la evaluación histológica del tejido obtenido en el grupo experimental y en el grupo considerado como control.

Esto hace suponer que posiblemente los parámetros evaluados en el tejido de reparación no fueron lo suficientemente específicos para poder establecer pequeñas diferencias entre ambos grupos, o que el tiempo para la evaluación del tejido fue muy corto. Sin embargo, en el estudio de Hidaka y colaboradores (2003), tampoco se encontraron diferencias histológicas en el tejido de reparación de los grupos experimental y control a los 8 meses. En contraste con lo anterior, en el estudio de Frisbie (2004) sí se encontraron diferencias histológicas notables entre ambos grupos a los 12 meses. De acuerdo con los resultados de los diferentes reportes, se considera que el tiempo de evaluación es tan importante como la técnica de reparación condral utilizada, para determinar las características histológicas del tejido de reparación.

Una de las 4 tinciones para el tejido de reparación en este estudio, fue la tinción tricrómica de Masson, con la cual fue posible determinar la presencia de colágena, pero no su tipo. Suponemos que la colágena tipo I fue la que predominó en el tejido de ambos grupos, ya que ésta es más abundante en el tejido conectivo fibroso. En estudios subsecuentes realizaremos pruebas bioquímicas y moleculares para determinar la presencia y cantidad de colágena tipo II y agregán en el tejido de reparación. Otra característica histoquímica del tejido fibroso de reparación que se obtuvo en ambos grupos, fue que dicho tejido no presentó una matriz hialina rica en proteoglicanos, ya que su afinidad por las tinciones safranina O y azul alciano a las 8 semanas, no fue tan intensa como la del cartílago articular normal. Asimismo, en el experimento de Barnewitz y colaboradores (2003) se menciona que al evaluar el tejido de reparación con azul alciano a los 3 meses, la afinidad por dicha tinción también fue realmente baja. Sin embargo, cuando hicieron esa misma evaluación a los 24 meses, la afinidad por la tinción fue mucho mayor. Esto confirma nuestra suposición sobre la importancia del tiempo de evaluación del tejido de reparación. A mayor tiempo, mejores serán sus características bioquímicas y por lo tanto, será más parecido al cartílago articular.

Con base a los resultados obtenidos en la presente investigación y a lo que otros investigadores han logrado en estudios similares con caballos, se puede decir que en este estudio hubo dos factores que influyeron de manera decisiva en la obtención del tejido fibrocartilaginoso de reparación en los caballos experimentales. El primero fue el corto tiempo para la evaluación de dicho tejido (8 semanas) y el segundo fue la técnica de cultivo en dos dimensiones durante tiempo prolongado (hasta 6 meses).

Sin embargo, podemos concluir que con las técnicas de ingeniería de tejidos e implantación artroscópica empleadas en el presente estudio, se indujo la formación de un tejido de reparación en lesiones condrales de caballos, sin que necesariamente pudiéramos demostrar la obtención de cartílago articular de características normales.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Aigner T and McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002; 59: 5-18.
2. Anastasiou A, Skioldebrand E, Ekman S, Hall L. Ex vivo magnetic resonance imaging of the distal row of equine carpal bones: assessment of bone sclerosis and cartilage damage. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 2003; 44 (5): 501-512.
3. Athanasiou KA, Shah AR, Hernández RJ, LeBaron RG. Basic science of articular cartilage repair. *Clinics and Sports Medicine* 2001; 20 (2): 223-247.
4. Banks WJ. *Applied veterinary histology*. 3rd ed. USA: Mosby Year Book, 1993.
5. 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.
6. Bindeus T, Rand T, Alton K, Imhof H, Stanek C. Magnetic resonance imaging and ultrasonography of the lumbricale muscles in the horse. *Australian Veterinary Journal* 1999; 77(2):82-84.
7. Blevins FT. Treatment of articular cartilage defects in athletes: an analysis of functional outcome and lesion appearance. *Orthopedics* 1998; 21 (7): 761-768.
8. Blunk T. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Engineering* 2002; 8(1): 73-84.
9. Bodo G, Hangody L, Szabó Z, Peham Ch, Schinzel M, Girtler D, Sótonyi P. Arthroscopic autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of subchondral cystic lesion in the medial femoral condyle in a horse. *Acta Veterinaria Hungarica* 2000; 48 (3): 343-354.

10. Bodo G, Kaposi AD, Hangody L, Tóth J, Bakos Z, Lukács Z, Péntek G. The surgical technique and the age of the horse both influence the outcome of mosaicplasty in a cadaver equine stifle model. *Acta Veterinaria Hungarica* 2001; 49 (1): 111-116.
11. Breinan HA, Hsu HP, Spector M. Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; (391 Suppl): 219-230.
12. Breinan HA. Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *Journal of Orthopaedic Research* 2001; 19 (3): 482-492.
13. Breinan HA, Minas T, Hsu H, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *The Journal of Bone and Joint Surgery—American Volume* 1997; 79 (10): 1439-1451.
14. Breinan HA. Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research* 2000; 18 (5): 781-789.
15. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England Journal of Medicine* 1994; 331(14): 889-895.
16. Buckwalter JA. Articular cartilage. *Instr Course Lectures* 1983; 32: 349-370.
17. Buckwalter JA. Chondral and osteochondral injuries: mechanisms of injury and repair responses. *Operative Techniques in Orthopaedics* 1997; 7 (4): 263-269.
18. Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *Journal of Orthopaedics and Sports Physical Therapy* 1998; 28 (4): 192-202.
19. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr. Course Lect.* 1998; 47: 487-504.

20. Cao YL. Comparative study of the use of polyglycolic acid, calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *Journal of Biomaterials in Science Polymers* 1998; 9 (5): 475-487.
21. Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. Repair of articular cartilage defects: part I. Basic science of cartilage healing. *American Journal of Orthopaedics* 1999; 28 (1): 31-33.
22. Ciccone WJ, Motz C, Bentley C, Tasto JP. Bioabsorbable implants in orthopaedics: new developments and clinical applications. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2001; 9: 280-288.
23. 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.
24. Dabareiner RM, White NA, Sullins KE. Radiographic and arthroscopic findings associated with subchondral lucency of the distal radial carpal bone in 71 horses. *Equine Veterinary Journal* 1996; 28 (2): 93-97.
25. Desjardins MR, Hurtig MB, Palmer NC. Heterotopic transfer of fresh and cryopreserved autogenous articular cartilage in the horse. *Veterinary Surgery* 1991a; 20 (6): 434-445.
26. Desjardins MR, Hurtig MB, Palmer NC. Incorporation of fresh and cryopreserved bone in osteochondral autografts in the horse. *Veterinary Surgery* 1991b; 20 (6): 446-452.
27. 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.
28. Elisseeff J. Photoencapsulation of chondrocytes in polyethylene oxide-based semi-interpenetrating networks. *Journal of Biomedical Material Research* 2000; 51 (2):164-171.
29. Elisseeff J. Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proceedings of the National Academy of Science* 1999; 96 (6): 3104-3107.

30. Fawcett DW. Cartílago. En: Tratado de Histología. 12^a ed. Madrid: Ed. Interamericana McGraw-Hill, 1995: 203-215.
31. Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, Cable CS. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. American Journal of Veterinary Research 1998a; 59 (9): 1182 – 1187.
32. 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 1998b; 59 (4): 514-520.
33. 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.
34. 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.
35. Frenkel SR, Di Cesare PE. Degradation and repair of articular cartilage. Frontiers in Bioscience 1999; 4: 671-685.
36. Frisbie DD, Nixon AJ. Insulin-like growth factor 1 and corticosteroid modulation of chondrocyte metabolic and mitogenic activities in interleukin 1-conditioned equine cartilage. American Journal of Veterinary Research 1997; 58 (5): 524-530.
37. Frisbie DD, Kawcak CE, Trotter GW, Powers BE, Walton RM, McIlwraith CW. Effects of triamcinolone acetonide on an *in vivo* equine osteochondral fragment exercise model. Equine Veterinary Journal 1997; 29 (5): 349 – 359.
38. 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.

39. Frisbie DD, Sandler EA, Trotter GW, McIlwraith CW. Metabolic and mitogenic activities of insulin-like growth factor-1 in interleukin-1 conditioned equine cartilage. *American Journal of Veterinary Research* 2000 ; 61 (4) : 436-441.
40. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, McIlwraith CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by *in vivo* delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Therapy* 2002; 9: 12-20.
41. 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.
42. Fubini SL, Erb HN, Freeman KP, Todhunter RJ. Prognostic factors affecting survival of 507 horses with joint disease : (1988 to 1990). *Canadian Journal of Veterinary Research* 1998 ; 63 : 253-260.
43. Fukui N, Purple CR, Sandell LJ. Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Current Rheumatology Reports* 2001; 3 (6):496-505.
44. Gartner LP and Hiatt JL. *Color atlas of histology*. 2nd ed. Baltimore USA: Williams & Wilkins, 1994.
45. Gartner LP y Hiatt JL. *Histología texto y atlas*. 1^a ed. México: McGraw-Hill, Interamericana, 1997.
46. Geneser F. Tejido esquelético. En: *Histología*. 2a ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 1993: 200-205.
47. Geneser F. *Histología sobre bases moleculares*. 3^a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2000.
48. Ghadially JA, Ghadially FN. Evidence of cartilage flow in deep defects in articular cartilage. *Virchows Arch. B Cell. Pathol.* 1975; 18: 193-204.
49. Goble EM. The development of suture anchors for use in soft tissue fixation to bone. *American Journal of Sports Medicine* 1994; 22 (2): 236-239.

50. 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.
51. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295: 1009-1016.
52. Hangody L, Rathonyi GK, Duska Z, Vasarhelyi G, Fules P, Modis L. Autologous osteochondral mosaicplasty. *Surgical Technique. Journal of Bone and Joint surgery (American)* 2004; 86-A Supplement 1: 65-72.
53. Hanie EA. Healing of full-thickness cartilage compared with full-thickness cartilage and subchondral bone defects in the equine third carpal bone. *Equine Veterinary Journal* 1992; 24 (5): 382-386.
54. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Research* 2002; 4 (suppl 3): 63-68.
55. Hauselmann HJ and Hunziker EB. Lesions of articular cartilage and their treatment. *Schweiz Med Wochenschr* 1997; 127 (46): 1911-1924.
56. Hayes DW Jr, Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury and repair. *Clinics in Podiatry Medicine & Surgery* 2001; 18 (1): 35-53.
57. Hayes DW Jr, Averett RK. Articular cartilage transplantation. Current and future limitations and solutions. *Clinics in Podiatry Medicine & Surgery* 2001; 18 (1): 161-176.
58. Hidaka Ch, Goodrich LR, Chen Ch-T, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *Journal of Orthopaedic Research* 2003; 21: 573-583.
59. Howard RD, McIlwraith CW, Trotter GW, Powers BE, McFadden PR, Harwood FL, Amiel D. Long-term fate and effects of exercise on sternal cartilage autografts used for repair of large osteochondral defects in horses. *American Journal of Veterinary Research* 1994; 55 (8): 1158-1167.

60. Huber M, Trattig S, Lintner F. Anatomy, biochemistry and physiology of articular cartilage. *Investigative Radiology* 2000; 35 (10): 573-580.
61. 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.
62. Hunziker EB and Kapfinger E. Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *Journal of Bone and Joint Surgery, British* 1998; 80 (1): 144-150.
63. Hunziker EB. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining process insuperable? *Osteoarthritis and Cartilage* 1999a; 7: 15-28.
64. Hunziker EB. Articular cartilage repair: problems and perspectives. *Biorheology* 2000; 37 (1): 163-164.
65. Hunziker EB. Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1999b; (367 Suppl): 135-146.
66. Hunziker EB. Growth factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9 (1): 22-32.
67. 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.
68. Hurtig MB, Fretz PB, Doige CE, Schnurr DL. Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1988; 52: 137-146.
69. 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.

70. 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.
71. Hutmacher D. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21 (24): 2529-2543.
72. Ibarra C, Koski JA, Warren RF. Tissue engineering meniscus : cells and matrix. *Orthopaedics Clinics of North America* 2000 ; 31 : 411-418.
73. Jackson WA, Stick JA, Arnoczky SP, Nickels FA. The effect of compacted cancellous bone grafting on the healing of subchondral bone defects of the medial femoral condyle in horses. *Veterinary Surgery* 2000; 29: 8-16.
74. Jobb KVF, Kennedy PC. Bones and Joints. In : *Pathology of Domestic Animals Vol.1. 3th ed.* USA: Nigal Palmer Academic Press, inc., 1985 : 91-100.
75. 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.
76. Kasashima Y, Kuwano A, Katayama Y, Taura Y, Yoshihara T. Magnetic resonance imaging application to live horse for diagnosis of tendinitis. *Journal of the Veterinary Medical Science*; 64(7): 577-582, 2002.
77. Kawcak CE, McIlwraith CW, Norrdin RW, Park RD, James SP. The role of subchondral bone in joint disease: a review. *Equine Veterinary Journal* 2001; 33 (2): 120-126.
78. Kleiter M, Kneissl S, Stanek Ch, Mayrofer E, Baulain U, Deegen E. Evaluation of magnetic resonance imaging techniques in the equine digit. *Veterinary Radiology & Ultrasound*; 40(1): 15-22,1999.
79. 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.

80. Kraft SL, Gavin P. Physical principles and technical considerations for equine computed tomography and magnetic resonance imaging. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*; 17(1): 115-130, 2001.
81. Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro* I. Isolation, culture characteristics and morphology. *The Journal of Cell Biology* 1982a; 93: 743-750.
82. 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.
83. Langer R and Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260 (5110): 920-926.
84. Linklater JM, Potter HG. Imaging of chondral defects. *Operative Techniques in Orthopaedics*; 7(4): 279-288, 1997.
85. 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.
86. Lombardero GG, Masri DM, Ibarra C, Velasquillo MC, Martínez LV. Ingeniería de tejidos: construcción de autoinjertos *in vitro*, para la reparación de defectos osteocondrales en caballos. *Memorias del XXV Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Equinos (AMMVEE)*; 2003 Octubre 8-11; México, D.F. México: Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Equinos (AMMVEE), 2003a (25): 119-125.

87. Lombardero GG, Ibarra C, Téliz MM, Reyes MB, Masri DM, Velasquillo MC, Martínez LV. Experimental evaluation of articular cartilage by magnetic resonance imaging of the equine stifle. Proceedings of the 8th Annual Congress of the World Equine Veterinary Association (WEVA); 2003b October 15-17; Buenos Aires, Argentina.
88. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, Kandel R, Nehrer S, Pritzker K, Roberts S, Stauffer E. Histological assessment of cartilage repair. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 2003; 85-A (supplement 2): 45-57.
89. Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts). *The New England Journal of Medicine* 1974a; 291(24): 1285-1292.
90. Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (second of two parts). *The New England Journal of Medicine* 1974b; 291(25): 1335-1340.
91. Markel MD. Cartilage degeneration: current research evaluating stabilization versus resurfacing. Proceedings of the 48th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP); 2002 December 4-8; Orlando, Florida USA. USA: American Association of Equine Practitioners (AAEP), 2002 (48): 170-174.
92. Martinelli MJ, Baker GJ, Clarkson RB, Eurell JC, Pijanowski GJ, Kuriashkin IV. Magnetic resonance imaging of degenerative joint disease in a horse: a comparison to other diagnostic techniques. *Equine Veterinary Journal* 1996; 28(5): 410-415.
93. May SA, Hooke RE, Lees P. Equine chondrocyte activation by a variety of stimuli. *British Veterinary Journal* 1992; 148 (5): 389 – 396.
94. McIlwraith CW. Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse. 2d ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990.

95. McIlwraith CW. General pathobiology of the joint and response to injury. In: McIlwraith CW, Trotter GW, editors. Joint disease in the horse. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996: 40 – 69.
96. McIlwraith CW, Martin GS. Arthroscopic surgery for the treatment of osteochondritis dissecans in the equine femoropatellar joint. *Veterinary Surgery* 1985; 14: 105-116.
97. McIlwraith CW, Nixon AJ. Joint resurfacing: attempts at repairing articular cartilage defects. In: McIlwraith CW, Trotter GW, editors. Joint disease in the horse. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996: 317 -334.
98. Minas T and Chiu R. Autologous chondrocyte implantation. *American Journal of Knee Surgery* 2000; 13 (1): 41-50.
99. Minas T. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; (391 Suppl): 349-361.
100. Minas T, Peterson L. Chondrocyte transplantation. *Operative Techniques in Orthopaedics* 1997; 7 (4): 323-333.
101. Moran JM, Pazzano D, Bonassar LJ. Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering* 2003; 9 (1): 63-70.
102. Morris EA, Treadwell BV. Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *American Journal of Veterinary Research* 1994; 55 (1): 138-146.
103. Muldrew K, Chung M, Novak K, Schachar NS, Zernicke RF, Mc Gann LE, Rattner JB, Matyas JR. Evidence of chondrocyte repopulation in adult ovine articular cartilage following cryoinjury and long-term transplantation. *Osteoarthritis & Cartilage* 2001; 9 (5): 432-439.
104. Nebelung W, Pap G, Machner A, Eberhardt R, Wolfram H, Roessner A. Evaluation of arthroscopic articular cartilage biopsy for osteoarthritis of the knee. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2001; 17 (3): 286-289.

105. Nehrer S, Spector M, Minas T. Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1999; (365): 149-162.
106. 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.
107. Nehrer S. Chondrocytes seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 1998; 19 (24): 2313-2328.
108. Nehrer S. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials* 1997b; 18 (11): 769-776.
109. 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.
110. 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.
111. 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
112. Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2000; (379 Suppl): 201-213.
113. O'Callaghan MW, Future diagnostic method: a brief look at new technologies and their potential application to equine diagnosis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*; 7(2): 467-479, 1991.
114. 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.

115. 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.
116. O'Driscoll SW and Fitzsimmons JS. The role of periosteum in cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; (391 Suppl): 190-207.
117. O'Driscoll SW. Preclinical cartilage repair: current status and future perspectives. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; (391 Suppl): 397-401.
118. O'Driscoll SW, Marx RG, Beaton DE, Miura Y, Gallay SH, Fitzsimmons JS. Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system. *Tissue Engineering* 2001; 7 (3): 313 - 320.
119. 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.
120. Patel D and Guhl JF. The use of bovine knees in operative arthroscopy. *Orthopedics* 1983; 6 (9): 1119-1124.
121. Pirhonen E. Development of a bioabsorbable suture anchor. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 48 (6): 875-880.
122. Polisson R. Innovative therapies in osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports* 2001; 3 (6): 489-495.
123. Poole AR. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4: 662-70.
124. Potter HG, Linklater JM, Allen AA, Hannafin JA, Haas SB. Magnetic resonance imaging of articular cartilage in the knee. An evaluation with use of fast-spin-echo imaging. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1998; 80: 1276-1284.
125. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editors. *Laboratory methods in histotechnology*. 4th ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1991.

126. Rechenberg BV, McIlwraith CW, Akens MK, Frisbie DD, Leutenegger C, Auer JA. Spontaneous production of nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE₂) and neutral metalloproteinases (NMPs) in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Equine Veterinary Journal* 2000; 32 (2): 140-150.
127. Riddle WE, Jr. Healing of articular cartilage in the horse. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 1970; 157 (11): 1471-1479.
128. 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* 2002; 5 (1): 60-73.
129. Rodgerson DH. and Spirito MA. Repair of collateral ligament instability in 2 foals by using suture anchors. *Canadian Veterinary Journal* 2001; 42 : 557-560.
130. Ross MH y Reith EJ. Atlas de histología. Barcelona: Ediciones Doyma, 1987.
131. 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.
132. Schenck RC. Strategies in contemporary tissue engineering. Proceedings of the 68th Annual Meeting; 2001 March 1; USA. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2001.
133. Schneider 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). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1997; 210 (11): 1649 - 1652.
134. Schultz O, Sittinger M, Haeupl T, Burmester GR. Emerging strategies of bone and joint repair. *Arthritis Research* 2000; 2: 433-436.

135. Semevolos SA, Nixon AJ, Brower-Toland BD. Changes in molecular expression of aggrecan and collagen types I, II and X, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor- β 1 in articular cartilage obtained from horses with naturally acquired osteochondrosis. *American Journal of Veterinary Research* 2001; 62 (7): 1088 - 1094.
136. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery, American* 1993; 75 (4): 532 - 553.
137. Shortkroff S. Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 1996; 17 (2): 147-154.
138. Sowers M, Hayes C, Jamadar D, Capul D, Lachance L, Jannausch M, Welch G. Magnetic resonance-detected subchondral bone marrow and cartilage defect characteristics associated with pain and X-ray-defined knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2003; 11: 387-393.
139. Spector M. Articular cartilage repair for chondral defects: lessons from an animal model. *Orthop. J. Harvard Med. Sch. Online* 2001; 3: 51-57.
140. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. The microfracture technique in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopade* 1999; 28 (1): 26-32.
141. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clinical Orthopaedics* 2001; (391 Supplement): 362-369.
142. Steinwachs MR, Erggelet C, Lahm A, Gohlke-Steinwachs U. Clinical and cell biology aspects of autologous chondrocytes transplantation. *Unfallchirurg* 1999; 102 (11): 855 - 860.
143. Stevens A y Lowe JS. *Texto y atlas de histología*. 1ª reimpression. España: Mosby/Doyma libros, 1995.

144. Suh J, Arøen A, Muzzonigro T, Disilvestro M, Fu F. Injury and repair of articular cartilage: related scientific issues. *Operative Techniques in Orthopaedics* 1997; 7 (4): 270-278.
145. Sulzbacher I. Arthrosis-histology and pathogenetic approaches. *Radiology* 2000; 40 (12): 1126 - 1133.
146. Sun Y, Chen H, Kandel R, Hurtig M. Characterisation of reconstituted equine cartilage formed in vitro. *Equine Veterinary Journal* 2002; 34 (4): 373-377.
147. Tapprest J, Radier C, Audigié F, Coudry V, Rieu F, Mathieu D, Denoix JM. Principes et applications de l'imagerie par résonance magnétique chez le cheval. *Pratique Vétérinaire Équine* 2002; 34 (133): 49-55.
148. Temenoff JS and Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(5): 431- 440.
149. Thal R. A knotless suture anchor. Design, function, and biomechanical testing. *American Journal of Sports Medicine* 2001; 29 (5): 646 - 649.
150. Todhunter RJ, Minor RR, Wootton JAM, Krook L, Burton-Wurster N, Lust G. Effects of exercise and polysulfated glycosaminoglycan on repair of articular cartilage defects in the equine carpus. *Journal of Orthopaedics Research* 1993; 11: 782-795.
151. Tucker RL, Farrell E. Computed tomography and magnetic resonance imaging of the equine head. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*; 17(1): 131-144, 2001.
152. Tucker RL, Sande RD. Computed tomography and magnetic resonance imaging in equine musculoskeletal conditions. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*; 17(1): 145-157, 2001.
153. 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: I32-134.

154. Vachon A, Bramlage LR, Gabel AA, Weisbrode S. Evaluation of the repair process of cartilage defects of the equine third carpal bone with and without subchondral bone perforation. *American Journal of Veterinary Research* 1986; 47 (12): 2637-2645.
155. Vachon AM, Mcllwraith CW, Trotter GW, Norrdin RW, Powers BE. Neochondrogenesis in free intra-articular, periosteal, and perichondrial autografts in horses. *American Journal of Veterinary Research* 1989; 50 (10): 1787 - 1794.
156. Vachon AM, Mcllwraith CW, Trotter GW, Norrdin RW, Powers BE. Morphologic study of repair of induced osteochondral defects of the distal portion of the radial carpal bone in horses by use of glued periosteal autografts. *American Journal of Veterinary Research* 1991a; 52 (2): 317-327.
157. Vachon AM, Mcllwraith CW, and Keeley FW. Biochemical study of repair of induced osteochondral defects of the distal portion of the radial carpal bone in horses by use of periosteal autografts. *American Journal of Veterinary Research* 1991b; 52 (2): 328 - 332.
158. Vachon AM, Mcllwraith 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.
159. Van den Berg WB. Growth factors and cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; (391 Suppl): 244 - 250.
160. 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.
161. 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.

162. Widmer WR, Buckwalter KA, Hill MA, Fessler JF, Ivancevich S. A technique for magnetic resonance imaging of equine cadaver specimens. *Veterinary Radiology & Ultrasound*; 40(1): 10-14, 1999.
163. Widmer WR, Buckwalter KA, Fessler JF, Hill MA, VanSickle DC, Ivancevich S. Use of radiography, computed tomography and magnetic resonance imaging for evaluation of navicular syndrome in the horse. *Veterinary Radiology & Ultrasound*; 41(2): 108-116, 2000.
164. 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.
165. Yotsuyanagi T, Urushidate S, Watanabe M, Sawada Y. Reconstruction of a three-dimensional structure using cartilage regenerated from the perichondrium of rabbits. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1999; 103 (4): 1120 - 1123.