

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
POSGRADO CONJUNTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EFFECTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y DE CÉLULAS MADRE  
DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO EN UN MODELO ANIMAL DE  
OSTEOARTROSIS QUÍMICA

Por

**M.V.Z. NELSON OBREGÓN MACÍAS**

Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

Noviembre 2014

EFFECTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y DE CÉLULAS MADRE  
DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSITO EN UN MODELO ANIMAL DE  
OSTEOARTROSIS QUÍMICA

Comité de Tesis



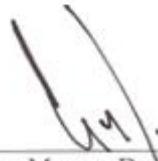
Dr. Juan José Zarate Ramos  
Asesor



Dr. Jorge Lara Arias  
Co-Asesor



Dra. Diana Elisa Zamora Ávila  
Vocal 1



M.C. Gustavo Moreno Degollado  
Vocal 2



Dr. Gustavo Hernández Vidal  
Vocal 3

**El presente trabajo fue desarrollado en el Bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UANL, en el Banco de Hueso del Departamento de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario y en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección del Dr. Juan J. Zarate Ramos y el Dr. Jorge Lara Arias.**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	iv
NOMENCLATURA.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Osteoartrosis.....	2
2.2 Clasificación de la Osteoartrosis.....	5
2.3 Tratamiento.....	6
2.4 Modelo de Osteoartrosis en Animales.....	7
2.5 Plasma Rico en Plaquetas.....	8
2.6 Células Madre Derivadas del Tejido Adiposo.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	11
4. HIPÓTESIS.....	12
5. OBJETIVOS.....	13
5.1 Objetivo General.....	13
5.2 Objetivos Particulares.....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6.1 Modelo Animal.....	14

6.2 Lugar del Estudio.....	14
6.3 Grupos de Estudio.....	14
6.4 Preparación del PRP.....	15
6.5 Extracción de Células Madre de Tejido Adiposo.....	15
6.6 Aplicación de los Tratamientos.....	16
6.7 Eutanasia de los Conejos.....	16
6.8 Análisis Morfológico e Histológico.....	16
6.9 Análisis Estadístico.....	19
7. RESULTADOS.....	20
7.1 Análisis Macroscópico.....	20
7.2 Análisis Histológico.....	21
8. DISCUSION.....	25
9. CONCLUSIÓN.....	29
10. LITERATURA CITADA.....	30

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por ayudarme siempre en todo y llevarme de la mano por un camino adecuado. A la Virgen María por escucharme a cada momento y brindarme fuerza para realizar mi posgrado.

A mis padres y hermanos por haber recibido de ellos el apoyo y brindarme palabras de aliento para motivarme y llevar a cabo mis estudios de maestría. A ti Yaris por tu apoyo de todas formas y en cada momento.

Dr. Juan José Zarate Ramos director de tesis por su apoyo y confianza en todo este tiempo de investigación.

Dr. Jorge Lara Arias co-asesor de tesis, por darme la oportunidad y espacio para realizar el trabajo de investigación en el laboratorio y compartir conmigo tus conocimientos.

Banco de Hueso y Tejidos del H.U. y su personal por abrirme las puertas y colaborar conmigo para el procesamiento de muestras en este estudio.

Dr. Gilberto Arévalo y personal del Bioterio del Depto. De Fisiología del H.U., por brindarme su amistad y ayuda en la realización del experimento.

Maestros del Posgrado Conjunto Agronomía-Veterinaria, por alentarme a ser mejor y por compartir sus experiencias y conocimientos.

Lic. Claudia López y Lic. Lucy Hernández de la Biblioteca de Ciencias Agropecuarias por sus cursos y apoyo en la búsqueda de información para esta tesis.

Mis compañeros de grupo por su ayuda en todo y su amistad. Doña Tere, Cintia y Mary por brindarme alimento, cobijo y sobre todo amistad y confianza.

Al CONACYT por el apoyo económico para llevar a cabo esta investigación.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Rubén Obregón Hdz. y Ma. Del Rosario Macías Hdz. Porque a lo largo de mi vida han sido un ejemplo a seguir, me han dado lo mejor y me han brindado siempre confianza y fuerza para realizar mis proyectos. He aprendido de ustedes a superar cualquier reto por duro que sea y levantarme de mis tropiezos.

Para mis hermanos Claudia, Rubén y Charo por estar en todo momento a mi lado y ayudarme en todo dándome palabras que me ayudaron a salir adelante. Han sido participes en todas formas para llevar a término esta investigación; No dejaron que me diera por vencido y me motivaron a seguir adelante.

A mis familiares y amigos por estar siempre conmigo; Para ustedes de quien recibí muchas palabras de aliento durante esta investigación.

A Humberto Isaías Macías Hdz. (†) Vitivinicultor, Enólogo, Investigador y Catedrático de la U.A.A.A.N. Por ser inspiración en este trabajo.

## LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Hallazgos macroscópicos en la superficie articular de las rodillas sujetas a estudio.....	20
<b>Figura 2.</b> Microfotografías de cortes histológicos de rodillas izquierdas de los diferentes grupos.....	21
<b>Figura 3.</b> Tinciones con Tricrómico de Masson.....	22
<b>Figura 4.</b> Cortes teñidos con Safranina O y Verde rápido.....	24

## LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Grupos sujetos a estudio.....	15
<b>Tabla 2.</b> Escala de O'Driscoll para evaluar la integridad celular.....	18
<b>Tabla 3.</b> Escala de Yoshioka para la evaluación morfológica del cartílago articular.....	19
<b>Tabla 4.</b> Resultados valoración macroscópica a través de la escala de Yoshioka.....	21

## NOMENCLATURA

ADAMs	Una desintegrina y una metaloproteinasa
AINES	Antiinflamatorio no esteroideo
BMPs	Proteínas morfogenéticas
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CMDTA	Células madre de tejido adiposo
EGF	Factor de crecimiento endotelial
GAGs	Glicosaminoglicanos
IGF-I	Factor de crecimiento de insulina tipo I
IL-1	Interleucina 1
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
mg/kg	Miligramos por kilogramos
ml	Militros
MMP-3	Estromelisina
MMP-8	Colagenasa-2
MMP-13	Colagenasa-3
OA	Osteoartrosis
PAR-4	Receptor activado por proteasas
PBS	Amortiguador salino fosfato
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PRP	Plasma rico en plaquetas
rpm	Revoluciones por minuto

TIMP-1	Inhibidor de metaloproteinasas de tejido 1
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ m	Micrómetro
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

## RESUMEN

**Introducción.** La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular degenerativa de origen multifactorial que afecta tanto a tejidos blandos como a los huesos de las articulaciones involucradas, afectando la calidad de vida de los pacientes. Existen diferentes tratamientos que no han resuelto el problema ocasionado por la enfermedad. Las células madre de tejido adiposo (CMDTA) y el plasma rico en plaquetas (PRP) surgen como nuevos tratamientos debido a la capacidad regenerativa que poseen. **Objetivo.** En el presente trabajo se evaluaron los cambios morfológicos inducidos por el PRP, CMDTA y/o PRP/CMDTA, en un modelo animal de OA química. **Materiales y Métodos.** Se utilizaron 21 conejos de la raza Nueva Zelanda y se dividieron en tres grupos. Se utilizó colagenasa tipo II en ambas rodillas y se dejó evolucionar durante 3 semanas para provocar la OA. Una vez establecida la enfermedad, se infiltró en las rodillas derechas PRP, CMDTA y PRP/CMDTA, siendo las rodillas izquierdas los grupos control de las lesiones. A los tres meses post-infiltración, se tomaron biopsias y se realizaron cortes histológicos para hacer las tinciones de Tricrómico de Masson y Safranina O/Verde rápido. Se hizo un análisis macroscópico y microscópico mediante las escalas de Yoshioka y O'Driscoll respectivamente. **Resultados.** Se observaron cambios macroscópicos favorables al aplicar los diferentes tratamientos en comparación con las rodillas que no recibieron tratamiento. Las rodillas izquierdas de todos los grupos, mostraron hendiduras profundas, fibrilación, hiper celularidad que es un indicador de una atrofia, así como pérdida de la congruencia entre las diferentes zonas del cartílago articular. Hubo una diferencia significativa en la presencia de matriz extracelular entre el grupo de CMDTA y PRP/CMDTA en comparación con los que solo recibieron PRP. **Conclusión.** Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden representar el fundamento para estudios prospectivos clínicos en la práctica veterinaria con un período de mayor vigilancia para determinar si el efecto del estímulo proporcionado por el PRP, CMDTA y PRP/CMDTA, es capaz de mantener su eficacia a largo plazo.

**Palabras Claves:** Células Madre, Factores de Crecimiento, Osteoartritis, Plasma Rico en Plaquetas, Regeneración de Tejidos.

## ABSTRACT

**Introduction.** Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease of multifactorial origin that affects both soft tissue and bones of the joints involved, affecting the quality of life of patients. There are different treatments that have not solved the problem caused by the disease. Adipose tissue stem cells (ATSC) and platelet rich plasma (PRP) as new treatments arise because the regenerative capacity that possessed. **Objective.** In this paper the morphological changes induced by the PRP, ATSC and/or PRP/ATSC in an animal model of OA chemistry were evaluated. **Materials and methods.** 21 rabbits of New Zealand race were used and divided into three groups. Was used collagenase type II in both knees and was allowed to proceed for 3 weeks to induce OA. Once established the disease, infiltrated right knees with PRP, ATSC and PRP/ATSC, being the left knee the injury control groups. At three months post-infiltration, biopsies were taken and histological sections were performed to make Masson Trichrome staining and Safranin O/Fast Green. One macroscopic and microscopic analysis was made using scales Yoshioka and O'Driscoll respectively. **Results.** Favorable macroscopic changes were observed to apply different treatments compared with knees that received no treatment. The left knees of all groups, showed deep grooves, fibrillation, hypercellularity which is an indicator of atrophy and loss of consistency between different areas of articular cartilage. There was a significant difference in the presence of extracellular matrix between ATSC group and PRP/ATSC compared with those who received only PRP. **Conclusion.** The results obtained in this study may represent the basis for clinical prospective studies in veterinary practice with a longer period of monitoring to determine whether the effect of the stimulus provided by the PRP, ATSC and PRP/ATSC, is able to maintain its effectiveness long haul.

**Keywords:** Stem Cells, Growth Factors, Osteoarthritis, Platelet Rich Plasma, Tissue Regeneration.

## 1. INTRODUCCIÓN

La OA es el resultado de factores mecánicos y biológicos que desestabilizan el acoplamiento normal entre la degradación y la síntesis por los condrocitos de la matriz extracelular del cartílago articular y del hueso subcondral. La artrosis puede ser iniciada por múltiples factores entre los que se incluyen factores genéticos, ambientales, metabólicos y traumáticos. Es un grupo heterogéneo de patologías con manifestaciones clínicas similares, cambios patológicos y radiológicos comunes. Provoca dolor y disminuye la flexibilidad en las articulaciones afectadas (Egloff *et al.* 2012). Dependiendo de la articulación afectada, los factores que la causan son distintos y se pueden diferenciar entre una susceptibilidad generalizada, como la edad, peso, densidad mineral ósea, factores nutricionales, herencia, sexo, y los factores locales de la articulación, como traumatismos, alteraciones anatómicas de la articulación y la actividad física que tenga el paciente (Lang *et al.* 2000).

El PRP es un concentrado de plaquetas autólogas en donde se aprovechan las altas concentraciones de los factores de crecimiento y se utilizan en la reparación quirúrgica y como tratamiento local mediante inyecciones para tendones, ligamentos, cartílagos y lesiones en lesiones musculares (Akeda *et al.* 2006). Para desarrollar una preparación de PRP, la sangre primero debe ser extraída del paciente. Las plaquetas se separan a partir de otras células sanguíneas y su concentración se incrementa durante la centrifugación. El tratamiento con PRP es una gran promesa. En la actualidad se realizan estudios de investigación para probar la eficacia en otras condiciones (Harrison 1993).

Las células madre son células con el potencial de convertirse en muchos tipos distintos de células en el organismo. En la actualidad las CMDTA se emplean en tratamientos de regeneración (Aust *et al.* 2006). Debido a que los tratamientos actuales para la OA son ineficaces para la regeneración del cartílago articular, consideramos que el empleo de herramientas de la medicina regenerativa como el PRP y las CMDTA, que pueden ayudar a combatir el proceso inflamatorio y a remodelar la estructura del cartílago articular en un modelo de OA de conejo mediante la Colagenasa II (Billinghurst *et al.* 2011).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Osteoartrosis

La OA o artrosis es una enfermedad articular degenerativa de origen multifactorial que afecta a los tejidos blandos, así como a los huesos de las articulaciones involucradas, provocando dolor y disminución de la funcionalidad (Felson *et al.* 2000). Cualquier articulación puede manifestar esta enfermedad, pero las que resultan afectadas con mayor frecuencia son las de la rodilla, el codo, la muñeca, la columna y la cadera (Blanco *et al.* 2003).

La artrosis es el resultado de factores mecánicos y biológicos que desestabilizan el acoplamiento normal entre la degradación y la síntesis por los condrocitos de la matriz extracelular del cartílago articular y del hueso subcondral. La artrosis puede ser iniciada por múltiples factores entre los que se incluyen factores genéticos, ambientales, metabólicos y traumáticos (Ajadi *et al.* 2012).

Dependiendo de la articulación afectada, los factores son distintos y se puede diferenciar entre una susceptibilidad generalizada, como la edad, peso, densidad mineral ósea, factores nutricionales, herencia, sexo y los factores locales de la articulación, como traumatismos, alteraciones anatómicas de la articulación y la actividad física del paciente (Aigner y McKenna 2012).

Este proceso se considera irreversible y actualmente no existe un tratamiento que pueda curar completamente esta patología. Cada paciente debe ser evaluado para poder brindarle un buen tratamiento y una mejor calidad de vida. Hay varios factores que se deben tener en cuenta, como el peso, la edad, el grado de artrosis, la actividad física del paciente, la dieta, etc. Los objetivos se basan en la reducción del dolor, control de la inflamación, disminución de la sobre carga de la articulación y mantener el movimiento adecuado de la misma (Fenwick *et al.* 2010).

Las bases moleculares y celulares del inicio y progresión de la OA aún son desconocidas. Existen enzimas de degradación asociadas a la presentación de OA y citocinas como posibles mediadores de inflamación. El cartílago articular

normalmente es resistente a la invasión vascular. Sin embargo, durante la OA, el cartílago articular pierde esta resistencia. La vascularización promueve la formación de osteofitos, desarrollo de fibrocartílago y la invasión de hueso subcondral (Smith *et al.* 2003; LeBaron *et al.* 2000).

Diferentes autores hacen referencia a dos fases que caracterizan la degeneración del cartílago durante la presentación de OA: Una fase biosintética, durante la cual los condrocitos intentan reparar la zona afectada y una fase de degradación, en la cual enzimas producidas por los mismos condrocitos digieren la matriz, por lo la síntesis de esta se inhibe y se acelera la erosión al cartílago articular (Meachim y Brooke 2000).

En el cartílago normal adulto, los condrocitos sintetizan sus componentes de manera lenta. Sin embargo, durante el desarrollo, la biosíntesis es estimulada por citocinas y factores de crecimiento como proteínas morfogenéticas (BMPs), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1) (Fortier *et al.* 2002; Brandl *et al.* 2010). Durante la osteoartritis, estos factores y otros como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 1 (IL-1) son producidas en la membrana sinovial y en los condrocitos. En el cartílago articular normal existe un balance muy estricto en la regulación entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular. En la OA este balance se ve alterado, las citocinas inflamatorias IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-17 y la IL-18, actúan aumentando la producción del metaloproteinasas de matriz (MMPs), disminuyendo a los inhibidores de estas enzimas y la síntesis de matriz extracelular. Por otro lado, las citocinas anabólicas IGF-I, TGF- $\beta$ 1, 2, y 3, el factor de crecimiento de fibroblastos 2, 4, y 8, así como las BMPs estimulan la producción de matriz extracelular (Goldring 2000).

Existen otras moléculas que participan en la degradación del cartílago, tales como los fragmentos de fibronectina que pueden inducir las expresión de metaloproteinasas y la degradación de la matriz en los condrocitos (Eyre *et al.* 2011). Cuando ocurre un daño al cartílago articular, los condrocitos intentan reparar la zona afectada aumentando su actividad anabólica a pesar de ello, la pérdida de proteoglicanos es uno de los factores principales en la degeneración del cartílago

osteoartrósico. La respuesta celular durante el proceso osteoartrósico ocurre en cinco etapas (Ryu et al. 2004):

1. Proliferación y muerte celular (apoptosis)
2. Cambios en la actividad sintética
3. Cambios en la degradación
4. Modulación fenotípica de los condrocitos articulares
5. Formación de osteofitos

Diversos estudios indican que hay muy baja actividad de proliferación en los condrocitos osteoartróticos. Esta condición se debe a que los condrocitos tienen más acceso al líquido sinovial debido a que se ha perdido la barrera protectora de colágeno (Aigner *et al.* 2009).

Los condrocitos del cartílago articular sintetizan enzimas de degradación como las MMPs 1, 2, 3, 7, 8, 13 y 14. Durante la OA las MMP-3 (estromelina), MMP-8 (colagenasa-2) y MMP-13 (colagenasa-3) se encuentran elevadas. Muchas de estas MMPs son estimuladas por la exposición de las células a citocinas inflamatorias (Fuki *et al.* 2001; Lippiello *et al.* 2001). Para potenciar estos efectos, los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP)-1 se encuentran reducidos en la OA (Dean *et al.* 2000). MMP-13 juega un papel importante en la degradación del colágeno tipo II. Fukui y Sandell reportaron que este tipo de colágeno también puede ser digerido por las MMPs 7, 9, 13 y 14. De igual forma, diversos estudios indican que mutaciones en los genes encargados de la expresión de colágeno tipo II derivan a una síntesis proteica inestable que conduce a la aparición prematura de OA (Naito *et al.* 2010).

Otras enzimas de degradación detectadas en la OA son las ADAMs (A Disintegrin-like And Metalloproteinase-Like), particularmente la ADAM-10 ha sido reportada en las áreas de mayor fibrosis en el cartílago osteoartrósico. A ellos se han sumado las agregasas 1 y 2 las cuales son capaces de unirse al condroitín sulfato (Tortorella *et al.* 2000). Se han encontrado asociaciones entre peptidasas cisteínicas como las catepsinas L, K y B en zonas subcondrales y osteofitos, particularmente en áreas de remodelación ósea y sitios de inflamación, estas catepsinas juegan un papel

importante en la cascada de los eventos de degradación, debido a que al inhibirlas, se observó una disminución en la destrucción del cartílago (Newman 2007).

## 2.2 Clasificación de la OA

Existen diversos sistemas de clasificación para la osteoartrosis y puede ser en base de hallazgos artroscópicos o radiográficos. Entre los sistemas de clasificación se encuentra la de Outerbrigde (O' Driscoll 2000) basada en hallazgos artroscópicos:

<b>Grado</b>	<b>Descripción</b>
0	Cartílago articular normal
I	Cartílago reblandecido
II	Fisuras de diámetro menor a 12 mm sin exponer hueso subcondral
III	Fisuras de diámetro menor a 12 mm con exposición de hueso subcondral
IV	Hueso subcondral expuesto de cualquier diámetro

Dado que los cambios radiológicos no siempre están acompañados de síntomas como dolor, rigidez o pérdida de la función, el solo uso de los criterios radiológicos como métodos diagnósticos aumentan la epidemiología de la enfermedad, por lo que la forma ideal para un diagnóstico preciso debe de incluir al menos criterios radiológicos y clínicos. La clasificación radiológica más comúnmente utilizada es la establecida por Kellegren-Lawrence en el 1957:

<b>Grado</b>	<b>Descripción</b>
0	Normal.
1	Dudosa disminución del espacio articular, posibles Osteofitos pequeños.
2	Osteofitos definitivos, espacio articular normal o disminución del espacio articular dudoso.
3	Osteofitos moderados; disminución del espacio articular, esclerosis y posible deformidad articular

- 4           Grandes osteofitos; marcada disminución del espacio articular, esclerosis importante del hueso subcondral y deformidad articular.

### **2.3 Tratamiento**

El tratamiento se basa en la administración de medicamentos antiinflamatorios, dependiendo del grado de afectación de la artrosis, siendo los más comunes los corticoides o AINES. Según se ha demostrado en estudios recientes los mucopolisacaridos o glicosaminoglicanos desarrollan un papel importante en la constitución del cartílago, mostrando resultados favorables. En casos más graves se puede realizar una intervención quirúrgica en donde se retiran los osteofitos con el objetivo de contribuir a desbloquear la articulación y disminuir el dolor. Otra alternativa de tratamiento, es implantar una prótesis total. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas técnicas no pueden aplicarse en todas las articulaciones, que no todos los pacientes responden de igual manera y que no siempre resultan viables (Juni *et al.* 2006).

Actualmente la farmacoterapia en la artrosis es de tipo paliativo; no se ha demostrado que algún medicamento prevenga la enfermedad, retrase su avance o revierta los cambios patológicos de la artrosis. En el tratamiento del dolor por artrosis, los medicamentos se deben utilizar como auxiliares de las medidas no farmacológicas. Estas últimas constituyen la piedra angular del tratamiento de esta enfermedad (Rychel 2010). El tratamiento oral o parenteral de corticoesteroides debe ser limitado en la OA, ya que los beneficios suelen ser de corta duración, se requiere ir aumentando la dosis y la toxicidad es elevada con el uso crónico. La glucosamina y el sulfato de condroitina han recibido gran atención recientemente para el tratamiento de la artrosis (Uitterlinden *et al.* 2005).

El ejercicio, la pérdida de peso, los AINES y las inyecciones intraarticulares con esteroides son métodos comúnmente usados para aliviar el dolor y mejorar la función en pacientes con OA. Sin embargo estas medidas no siempre son bien toleradas o efectivas. En ausencia de un tratamiento mejor para las etapas tempranas de la enfermedad se han abierto diferentes líneas de investigación con objeto de mejorar los tratamientos antes descritos, y una de tantas líneas de investigación es el uso de ácido hialurónico. La inyección intraarticular de ácido hialurónico ha sido

aprobada para el tratamiento de los pacientes con artrosis de rodilla en los cuales ha fracasado el programa de tratamiento no farmacológico y de analgésicos simples (Mankin 2003).

#### **2.4 Modelo de OA Animal**

Los modelos animales son una herramienta importante para estudiar la etiología y patogenia en muchas enfermedades. Permiten realizar estudios experimentales que no es posible llevarlos a cabo en los seres humanos por razones éticas y metodológicas (Malek *et al.* 2012). Los conocimientos que se tienen respecto a la fisiopatología de la OA humana se basan en gran parte en la experimentación previa en modelos animales. Además, estos forman la primera fase de los ensayos de fármacos *in vivo* (Stewart *et al.* 2007; Kikuchi *et al.* 1998). Los modelos animales son especialmente relevantes en el estudio de la osteoartritis. Actualmente, existen modelos bastante homologados y estandarizados para el estudio de esta enfermedad. Es importante tener en cuenta que cada modelo tiene sus propias ventajas y limitaciones y la interpretación de los resultados tampoco debe ir más allá de las limitaciones impuestas por el propio modelo en estudio (Ajadi 2012).

Los modelos experimentales de osteoartritis ofrecen claras ventajas sobre la investigación en humanos. En ellos puede determinarse con precisión el comienzo y la duración de la enfermedad, así como su gravedad y progresión en el tiempo. Estas cualidades permiten hacer estudios secuenciales de la enfermedad, cuantificar y calificar con rigor los cambios patológicos encontrados (Kuroki *et al.* 2011). Para ello es imprescindible que cualquier modelo experimental de osteoartritis reproduzca razonablemente la enfermedad como se desarrollaría en el paciente; además de tener características como disponibilidad del espécimen, bajo costo y facilidad de manejo para el estudio (Goranov 2012). Actualmente se han descrito diversos modelos de artrosis en animales, dentro de los cuales existen modelos de artrosis experimental por agresión química, la cual se basa en la inyección intraarticular de sustancias irritantes, la administración intraarticular de enzimas proteolíticas, como papaína, tripsina o colagenasa, desencadenando una artrosis por degradación química de las proteínas de la matriz extracelular (Eyre *et al.* 2011).

## 2.5 Plasma Rico en Plaquetas

Las primeras descripciones de la elaboración y el uso de PRP fueron en la década de 1990, cuando la ciencia estaba enfocada en el desarrollo de nuevos "pegamentos biológicos". El PRP era un adhesivo potente debido a la alta proporción de fibrina y fue utilizado principalmente en cirugías maxilofaciales. Los cirujanos y científicos observaron que estas preparaciones tenían una capacidad para formar hueso, así como propiedades anti-inflamatorias y anti-bacterianas (Bielecki *et al.* 2007). Los efectos se atribuyeron principalmente a las plaquetas que contienen gránulos alfa con varias moléculas que son secretadas tras la activación. Además, se descubrió que las plaquetas tienen propiedades analgésicas por la liberación de un receptor activado por proteasas (PAR-4). La fibrina actúa como un andamio provisional para migración y la diferenciación celular (Anitua *et al.* 2004; Nurden *et al.* 2008).

El concentrado rico en plaquetas o plasma rico en plaquetas PRP se define como la porción de una fracción del plasma autólogo, el cual contiene altas concentraciones de plaquetas y proteínas secretoras. Las plaquetas son el producto final de los megacariocitos que son formados en la médula ósea. No tienen núcleo y no pueden replicarse. La vida promedio son 5 a 9 días, originalmente se creía que las plaquetas solo creaban el coágulo durante la hemostasia (Anitua *et al.* 2009).

Este coágulo es creado después de la lesión en el tejido. Posteriormente las plaquetas son agregadas al sitio lesionado, proceso conocido con el nombre de activación plaquetaria. Durante la activación los granulocitos alfa se unen junto con las plaquetas y liberan proteínas (degranulación) (Anitua *et al.* 2004).

El PRP es una fuente abundante de factores de crecimiento como: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factor de crecimiento endotelial (EGF), entre otros (Grageda 2004). Para que estos factores de crecimiento sean liberados, las plaquetas necesitan ser activadas por detonadores como el cloruro de calcio, gluconato de calcio, etc. Después de ser activadas, secretan los factores de crecimiento, alcanzando el pico máximo de concentración a los 10 minutos. Se sabe que los factores de crecimiento PDGF, TGF- $\beta$ , IGF-1 estimulan la condrogénesis (Cugat 2009; Marx 2004).

## 2.6 Células Madre Derivadas del Tejido Adiposo

La terapia celular regenerativa busca propiciar en el organismo de manera sistémica o local, un microambiente adecuado que permita el proceso de regeneración tisular disminuyendo el proceso inflamatorio, en donde en el mejor de los casos, este sea inhibido totalmente (Bacou *et al.* 2004).

Las células madre mejor conocidas son aquellas denominadas hematopoyéticas y que están a cargo de la fabricación del tejido sanguíneo. Esta herramienta terapéutica celular ha demostrado por más de 50 años su efectividad en el tratamiento de enfermedades hematológicas, incluyendo las leucemias y otras enfermedades congénitas de la sangre. Otro subtipo de células madre derivadas de tejidos adultos son células madre mesenquimales también conocida con el nombre de células estromales mesenquimales o derivada del tejido adiposo (Aust *et al.* 2004).

Las células madre mesenquimales tiene la capacidad de diferenciarse a varios linajes celulares que constituyen células fisiológicamente activas en diferentes órganos o sistemas, así pues, estas células madre obtenidas del tejido graso, pueden diferenciarse en una célula muscular, cardíaca, neuronal, pancreática, hepática, neuronal entre otras (Puissant *et al.* 2005).

Estas células, son capaces de detectar moléculas que han sido secretadas por los tejidos dañados o moribundos, fenómeno que se conoce como “homing”. Una vez que están en la proximidad del tejido dañado, las células se adhieren a la superficie del órgano a través de receptores moleculares que son expresados en la superficie de la membrana celular (Agung *et al.* 2006). Esto da inicio a una serie de eventos que permiten a la célula madre integrarse al órgano dañado y comenzar a secretar factores de crecimiento que estimulan localmente a las células madre residentes del propio órgano afectado, además de cambiar el microambiente bioquímico inflamatorio, para dar origen a un microambiente permisible a la regeneración celular, donde comienza un proceso de fusión o diferenciación celular, convirtiéndose entonces en una célula fisiológicamente madura, además de propiciar la formación de nuevos vasos sanguíneos (Tsvee *et al.* 2005).

Otra propiedad que solo poseen las células madre mesenquimales es la inmunomodulación. Esto se refiere a la capacidad que tienen estas células de interactuar con células del sistema inmunológico para controlar una respuesta inmunológica, que en el caso de las enfermedades autoinmunes, son las responsables de la destrucción de diferentes tejidos o células específicas provocando el deterioro observado en diversas patologías específicas como la artrosis (Jackson *et al.* 2011). Su capacidad inmunomoduladora no solo tiene importancia en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, sino que también estas se perfilan como un elemento de tratamiento indispensable para propiciar la tolerancia hacia órganos sólidos como el corazón, pulmón y riñón (Jones y Pei 2012; Timmins *et al.* 2012).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que los tratamientos actuales para la osteoartrosis son ineficaces para la regeneración del cartílago articular, consideramos que el empleo de herramientas de la medicina regenerativa como el PRP y las células madre derivadas de tejido adiposo, pueden ayudar a combatir el proceso inflamatorio y a remodelar la estructura del cartílago articular en un modelo de OA animal. De tal manera, que nos permita observar los cambios ocurridos por efecto de la infiltración de estos tratamientos administrados en conjunto o separados. Estudiar los cambios histológicos ayudará y complementará los conocimientos ya obtenidos acerca de los resultados clínicos y establecerá una base científica en la que se sustente la utilización de dichos tratamientos.

#### **4. HIPÓTESIS**

El tratamiento con PRP y CMDTA, es una alternativa como tratamiento para la regeneración de lesiones del cartílago articular.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Evaluar los cambios morfológicos inducidos por el PRP y/o CMDTA, en un modelo animal de OA química.

### **5.2 Objetivos Particulares**

1. Reproducir el modelo de OA química en conejos Nueva Zelanda.
2. Realizar el método para la preparación del PRP.
3. Realizar la técnica para la extracción de CMDTA.
4. Evaluar por medio de diferentes escalas los cambios ocurridos en el cartílago articular posterior a la aplicación de los diferentes tratamientos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Modelo Animal

Se utilizaron 21 conejos hembras de la raza Nueva Zelanda de talla mediana de aproximadamente 6 meses de edad. Durante el desarrollo del experimento los animales tuvieron alimento y agua a libre acceso. Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales elevadas con un área de piso de 0.26 m<sup>2</sup> y 36 cm de altura. Estos recibieron los cuidados por médicos veterinarios y estuvieron confinados en el bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina UANL, según la NOM 062-ZOO-1999.

### 6.2 Lugar del Estudio

La extracción celular y preparación de las dosis a infiltrar se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Tisular del Banco de Hueso y Tejidos del Hospital Universitario "Dr. José E. González". Los ensayos histológicos se llevaron a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la UANL.

### 6.3 Grupos de Estudio

Se utilizaron tres grupos experimentales con 7 conejos cada uno (Tabla 1). A todos los conejos se les provocó una osteoartrosis química mediante la aplicación de colagenasa tipo II de *Clostridium histolyticum* (Thermo Fisher Scientific Inc., MA USA) en ambas rodillas. Para obtener el modelo de lesión, los animales de experimentación fueron anestesiados con una inyección intramuscular de Xilacina al 2% a una dosis de 1.9 mg/Kg y 46 mg/Kg de Ketamina. Se les realizó a todas las rodillas una inyección intraarticular de colagenasa tipo II, de acuerdo al método estandarizado por Kikuchi *et al.* en el 2000. La dosis consistió en 4mg/ml de colagenasa tipo II en PBS. La primera infiltración se realizó el día 1 y se repitió el procedimiento el día 4. Los conejos se mantuvieron durante 3 semanas en el bioterio de Fisiología de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León hasta obtener los modelos de osteoartrosis leve.

Los grupos se dividieron de la siguiente manera: un grupo con plasma rico en plaquetas PRP, otro grupo con células madre de tejido adiposo CMDTA y por último el grupo con ambos tratamientos PRP/CMDTA. Los tratamientos se aplicaron

en las rodillas derechas, siendo las izquierdas el grupo control de lesión, en los cuales se dejó progresar la enfermedad ya que no recibieron tratamiento.

**Tabla 1.** Grupos sujetos a estudio.

<b>Grupos Experimentales</b>	<b>N</b>	<b>Tratamientos</b>
<b>Grupo 1</b>	<b>7</b>	<b>PRP</b>
<b>Grupo 2</b>	<b>7</b>	<b>CMDTA</b>
<b>Grupo 3</b>	<b>7</b>	<b>PRP y CMDTA</b>

#### **6.4 Preparación del PRP**

La extracción del concentrado plaquetario se realizó sujetando manualmente a los conejos, llevando a cabo asepsia en el sitio y con jeringas de 5 ml se obtuvo un volumen de 5 ml de sangre de la vena central de la oreja. Esta sangre se colocó en tubos Vacutainer™ (Becton, Dickinson and Company., NJ USA) de 5ml con citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante. Posteriormente se centrifugó a 2,400 rpm por 15 minutos en una centrífuga Eppendorf 5702 (Eppendorf AG., Hamburgo Germany). Se extrajeron 500 µl de plasma de cada tubo con una pipeta automática de 1000 µl (Eppendorf AG., Ham Germany) y se volvieron a centrifugar por 10 minutos a una velocidad de 2,000 rpm obteniendo dos fracciones, plasma pobre en plaquetas en la parte superior y el plasma rico en plaquetas en la parte inferior. Para la activación y preparación del gel plaquetario, se utilizaron 0.050 µl de CaCl<sub>2</sub> por cada mililitro de plasma.

#### **6.5 Extracción de Células Madre de Tejido Adiposo**

Para realizar las lipectomías se utilizó Xilacina al 2% (0.1 mg/kg) IM y Ketamina al 5% (25 mg/kg) IM para llevar a un plano anestésico a los conejos. Una vez anestesiados, se les afeitó y se les realizó asepsia y antisepsia en el área inguinal. Se les realizó una incisión de 3 centímetros y se extrajo aproximadamente 5 gramos de tejido adiposo, posteriormente, se procedió a suturar la incisión. Como antibiótico se les administró Cefalosporina vía IM a una dosis de 10 mg/kg cada 12 horas y Clorhidrato de Tramadol IM a una dosis de 4 mg/kg durante tres días. Posteriormente la muestra se pasó a un frasco estéril (pomadera) y se le añadió Colagenasa Tipo I al 0.075% (Thermo Fisher Scientific Inc., MA USA). Se separó la grasa de la fracción

líquida y esta última porción, se colocó en un tubo Falcon de 50 ml. Se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 minutos para obtener el botón celular de la fracción vascular del estroma. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en solución fisiológica estéril. Posteriormente, se prepararon las dosis celulares contando  $5 \times 10^5$  células en una cámara de Neubauer y fueron resuspendidas en 500  $\mu$ l de solución fisiológica estéril.

## **6.6 Aplicación de los Tratamientos**

Una vez que se prepararon los tratamientos autólogos (PRP y CMDTA), se anestesiaron a los conejos con Xilacina al 2% (0.1 mg/kg) IM y Ketamina al 5% (25 mg/kg) IM. Una vez anestesiados, se les realizó asepsia y antisepsia en el área de las rodillas y se les aplicaron los tratamientos a través de una infiltración intraarticular según los grupos de estudio. Posterior al manejo terapéutico se les administró la antibioticoterapia descrita anteriormente.

## **6.7 Eutanasia de los Conejos**

A 32 días post la infiltración, se realizó la eutanasia de los conejos sujetos a estudio. La eutanasia se llevó a cabo siguiendo la NOM-62-ZOO-1999 mediante el uso de barbitúricos. Se sujetaron manualmente, se tranquilizaron con Xilacina al 2% (0.1 mg/kg) IM y se les aplicó Pentobarbital Sódico IV (90 a 210 mg/kg). Se aseguró que no hubiese laditos cardiacos ni frecuencia respiratoria antes de realizar los protocolos para la toma de biopsia.

## **6.8 Análisis Morfológico e Histológico**

Para el análisis histológico después de concluir los 32 días post-tratamiento, las muestras fueron fijadas en solución de Bouin por 14 horas, posteriormente se deshidrataron gradualmente con acetonas y se embebieron en parafina para realizar cortes de 5  $\mu$ m. Finalmente los cortes se desparafinaron y se realizaron las tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar la morfología celular, valorar la estructura e integridad del "tidemark".

La solución de Bouin como fijador se preparó con ácido pícrico (J.T. Baker), formaldehído (J.T. Baker) y ácido acético glacial (CTR), las muestras se deshidrataron con acetona (CTR Scientific. Monterrey, México), se incluyeron en

parafina (Mc Cormick Scientific Paraplast) y se utilizaron cuchillas de bajo perfil para microtomo (TBS Inc. Carolina del Norte). Para las tinciones se utilizó hematoxilina monohidratada (MERCK), escarlata Biebrich (Analytika), fuscina ácida (Analytika), ácido fosfomolibdico (CTR Scientific), ácido fosfotúngstico (CTR Scientific), azul de anilina (J.T. Baker), ácido acético glacial (CTR), verde rápido (SIGMA), safranina O (SIGMA), xilol (CTR), alcohol absoluto (CTR) y alcohol de 96 % (CTR).

El área de la lesión se seccionó tomando tejido sano adyacente y hueso subcondral para realizar una comparación y la evaluación del cartílago. Este tejido se empleó para realizar una evaluación histoquímica que consistió en diferentes técnicas. En una muestra de cartílago sano la técnica de Tricrómico de Masson permite apreciar en color azul brillante la matriz cartilaginosa compuesta de colágenos y mucinas. En rojo evidencia a la matriz ósea. Permite también identificar morfología celular.

La técnica de azul de toluidina es ampliamente utilizada para el análisis de cartílago ya que presenta un efecto de metacromasia debida a los grupos sulfatos que se encuentran en los proteoglicanos del tejido, dando una coloración violeta. En nuestro caso se empleó para realizar una evaluación a través de la escala O'Driscoll (Tabla 2).

El análisis morfológico se realizó mediante la escala publicada por Yoshioka *et al.*. En la cual el grado 1 indica superficie articular intacta; grado 2, mínima fibrilación; grado 3, fibrilación evidente y grado 4, erosión con exposición de hueso. (Tabla 3). La técnica que emplea safranina O y verde rápido permite identificar la producción de GAGs mediante una coloración roja y en color verde pálido a los colágenos, sin distinguir entre tipos de colágenos.

**Tabla 2.** Escala de O’Driscoll para evaluar la integridad celular.

<b>Categorías</b>	<b>Características</b>	<b>Puntaje</b>
<b>Morfología Celular</b>	Cartílago Articular Hialino	2
	Mesénquima no Diferenciado	1
	Tejido Fibroso o Hueso	0
<b>Tinción Safranina O</b>	Normal o Casi Nada	3
	Moderada	2
	Ligera	1
	Ninguna	0
<b>Superficie</b>	Intacta	2
	Fisuras	1
	Interrupción Severa con Fibrilación	0
<b>Integridad Estructural</b>	Normal	2
	Ligeramente Interrumpida con Quistes	1
	Desintegración Severa	0
<b>Grosor de Cartílago</b>	100% o Similar a Cartílago Adyacente	2
	50-100% de Cartílago Normal	1
	0-50% de Cartílago Normal	0
<b>Hipocelularidad</b>	Celularidad Normal	3
	Ligera Hipocelularidad	2
	Hipocelularidad Moderada	1
	Severa Hipocelularidad	0
<b>Grupos de Condrocitos</b>	Sin grupos	3
	Algunos grupos	2
	Presencia moderada	1
	Abundantes	0
<b>Degeneración Cartílago Adyacente</b>	Celularidad normal, sin grupos de condrocitos, tinción normal	3
	Celularidad normal, pocos grupos de condrocitos, tinción moderada	2
	Hipocelularidad moderada, tinción ligera	1
	Hipocelularidad severa, poca o nula tinción	0

**Tabla 3.** Escala de Yoshioka para la evaluación morfológica del cartílago articular.

<b>Grado</b>	<b>Descripción</b>
1	Superficie Articular Intacta
2	Mínima Fibrilación
3	Fibrilación Evidente
4	Erosión con Exposición de Hueso

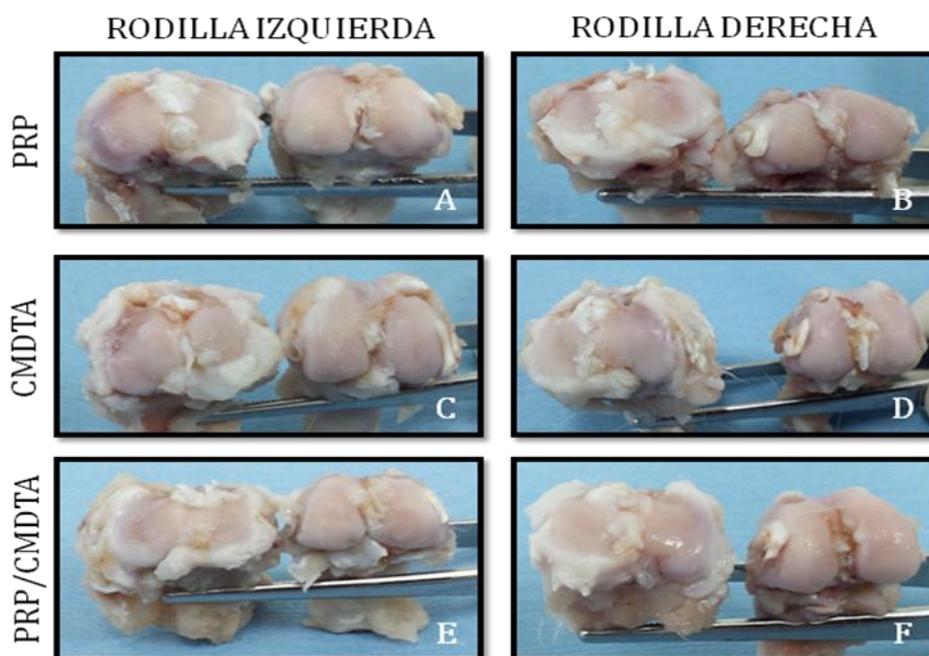
### **6.9 Análisis Estadístico**

Todos los cálculos estadísticos fueron realizados con el programa SPSS 17 (IBM). Los datos de la evaluación histológica fueron analizados mediante una prueba de U de Mann-Whitney para variables no paramétricas. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ . La significancia se determinó en 0.05 y se utilizaron intervalos de confianza de 95%.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis Macroscópico

Las muestras fueron evaluadas de manera macroscópica y microscópica. Las rodillas izquierdas fueron el grupo control de lesión, mientras que las rodillas derechas fueron sometidas a los diferentes tratamientos (PRP, CMDTA y PRP/CMDTA). Las rodillas izquierdas de los tres grupos, en las cuales se dejó progresar la lesión, se observaron erosiones evidentes con datos de fibrilación y en algunos casos se pudo observar el hueso subcondral en los cóndilos femorales así como en los platillos tibiales (Figura 1A, 1C y 1E). Es importante señalar que en la evaluación macroscópica por la escala de Yoshioka (Tabla 5), este grupo control se acercó más a un puntaje de 4, lo que demuestra que la articulación presenta una artrosis establecida ( $P=0.25$ ).



**Figura 1. Hallazgos Macroscópicos en la Superficie Articular de las Rodillas Sujetas a Estudio.**

A) Rodilla control de lesión del grupo tratado con PRP. B) Rodilla tratada con PRP. C) Rodilla control de lesión del grupo tratado con CMDTA. D) Rodilla tratada con CMDTA. E) Rodilla control de lesión del grupo tratado con PRP/CMDTA. F) Rodilla tratada con PRP/CMDTA.

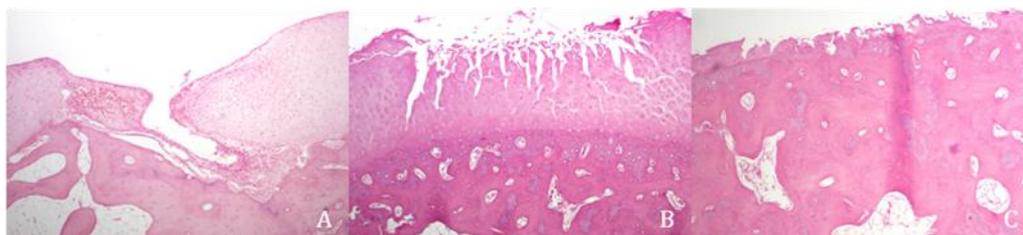
En cuanto a las rodillas derechas, en el grupo con PRP, encontramos que el cartílago articular obtuvo una puntuación mayor en comparación con el grupo PRP/CMDTA con una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.010$ ). En cambio no hubo una diferencia entre los grupos tratados con PRP y CMDTA. En general, se observó una superficie lisa y con mucho menor erosión y fibrilación (Figura 1B, 1D y 1F).

**Tabla 5.** Resultados valoración macroscópica a través de la escala de Yoshioka.

<b>Grupo</b>	<b>Rodilla Izquierda</b>	<b>Rodilla Derecha</b>
PRP	3.75 $\pm$ 0.71	2.45 $\pm$ 0.76
CMDTA	3.75 $\pm$ 0.46	2.13 $\pm$ 0.35
PRP/CMDTA	3.50 $\pm$ 0.35	1.29 $\pm$ 0.49

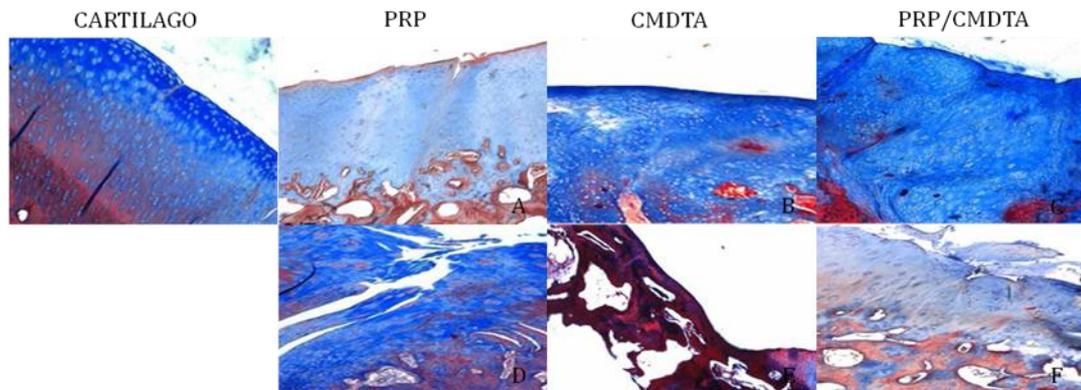
## 7.2 Análisis Histológico

Las rodillas izquierdas de todos los grupos, mostraron hendiduras profundas, fibrilación, hipercelularidad que es un indicador de una atrofia, así como pérdida de la congruencia entre las diferentes zonas del cartílago articular (Figura 2).



**Figura 2. Microfotografías de Cortes Histológicos de Rodillas Izquierdas de los Diferentes Grupos Sujetos a Estudio.** En la imagen A) observamos el grupo PRP, se observa hipercelularidad pérdida de la estructura. B) Grupo CMDTA, se observa el cartílago articular agrietado y perdida de la congruencia del cartílago. C) Grupo PRP/CMDTA se observan irregularidades sobre la superficie articular y fibrilación. Tinciones con H&E, objetivo 5x.

En cuanto a la tinción con Tricrómico de Masson, se empleó cartílago sano de conejo para poder comparar la intensidad de la matriz extracelular con respecto a los diferentes grupos. Se puede apreciar que en los conejos que recibieron PRP como tratamiento, la tinción con azul de anilina, que es el colorante que tiñe la matriz del cartílago, se encuentra disminuida en comparación con los grupos que recibieron CMDTA o PRP/CMDTA (Figura 3).



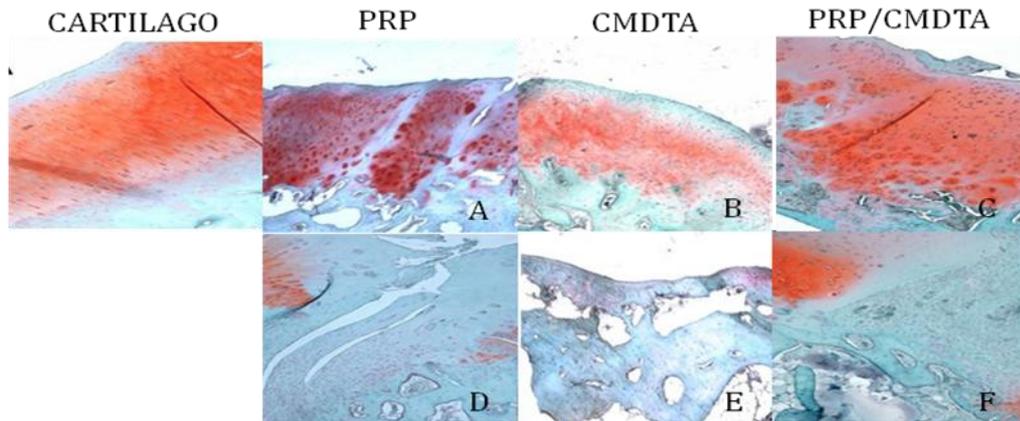
**Figura 3. Tinciones con Tricrómico de Masson.** Se aprecia la matriz extracelular teñida de azul y el hueso de color rojo. En la primer columna se observa cartílago hialino sano. A) Rodilla derecha que recibió PRP como tratamiento. B) Rodilla derecha que recibió CMDTA como tratamiento. C) Rodilla derecha que recibió PRP/CMDTA como tratamiento. D, E y F) Rodillas izquierdas en donde se dejó progresar la lesión. Objetivo 5x.

En las rodillas izquierdas, se observaron diferentes patrones de tinción debido a que la superficie articular presentaba, desde pobre coloración de la matriz extracelular, hasta falta de color azul por la pérdida o erosión del cartílago articular. El principal objetivo de una terapia celular para el cartílago articular, es la regeneración de la arquitectura del tejido. Existen diferentes escalas de evaluación histológica para determinar la naturaleza del tejido formado. La Escala O’Driscoll evalúa ocho rasgos del cartílago tratado valorándolos con un puntaje que va del 0 al 3, siendo 0 el peor resultado y 2 o 3 un tejido similar al cartílago hialino. A partir de las observaciones de tres técnicos diferentes y de forma independiente, se

determinaron los puntajes para cada variable y se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos.

En cuanto a la morfología celular, el grupo que recibió PRP como tratamiento presentó mayor cantidad de fibrosis en ciertas zonas. Para los otros grupos se observó una transición entre tejido fibroso y matriz extracelular con apariencia de cartílago articular. Al momento de analizar los cortes que fueron teñidos con Safranina O, el grupo que recibió PRP/CMDTA mostró mayor cantidad de GAGs en su matriz extracelular en comparación con los otros dos grupos. De la misma manera, la superficie articular fue más íntegra y con menos fibrilación o hendiduras para el grupo en donde se administraron PRP y CMDTA en el mismo evento. No se observó una diferencia significativa en cuanto al espesor del cartílago entre los tres grupos.

Sin embargo, el grupo con PRP mostró una menor presencia de células, lo que podría explicar la poca cantidad de GAGs y de matriz extracelular, a pesar de que el cartílago hialino sano, es de baja celularidad. Este evento es totalmente opuesto a la situación de los grupos con CMDTA y PRP/CMDTA ya que poseen mayor número de células y una matriz extracelular con mayor presencia de colágeno y GAGs. Una característica no deseable en la regeneración de cartílago es la formación de grupos o clústers de condrocitos que se presentan en cicatrices fibrosas. El grupo con PRP/CMDTA presentó un puntaje más alto en esta variable, esto podría deberse al estímulo de ambos tratamientos y se deberá realizar un estudio *in vivo* de mayor tiempo para poder evaluar la diferenciación de los condrocitos, ya que al momento de analizar el cartílago adyacente a las zonas en proceso de regeneración, esta característica parece invertirse.



**Figura 4. Cortes teñidos con Safranina O y Verde Rápido.** En rojo se pueden apreciar zonas de producción de glucosaminoglicanos. En verde pálido se pueden detectar áreas de producción de colágenos. Se usó cartílago sano de conejo para observar los GAGs. A) Rodilla derecha que recibió PRP como tratamiento. B) Rodilla derecha que recibió CMDTA como tratamiento. C) Rodilla derecha que recibió PRP/CMDTA como tratamiento. D, E y F) Rodillas izquierdas en donde se dejó progresar la lesión. Objetivo 5x.

En las rodillas izquierdas, se observa como el colorante verde rápido tiñe las áreas de colágeno pertenecientes al hueso subcondral y se puede distinguir la escasa o nula presencia de GAGs.

## 8. DISCUSIÓN

La OA es una enfermedad degenerativa muy común que afecta el cartílago articular de humanos y de diferentes animales en la medicina veterinaria. Esta condición afecta al 15% de la población mundial, con costos de atención de salud colosal y tiene un gran impacto en la calidad de vida de un paciente.

Los enfoques terapéuticos actuales se centran en la prevención o al menos retrasar los cambios estructurales y funcionales de OA. El uso de terapias basadas en células madre y PRP para la reparación y regeneración en la OA, se ha convertido en una nueva vía de tratamiento, como una alternativa a las terapias más agresivas (Singh 2012).

Las células madre mesenquimales pueden ser fácilmente aisladas de muchos tejidos adultos como la médula ósea, la placenta, cordón umbilical, el músculo esquelético, la membrana sinovial, líquido sinovial y el tejido adiposo entre otros. Una cantidad cada vez mayor de estudios, están utilizando tejidos derivados de células mesenquimales de tejido adiposo para el tratamiento de la OA, por las grandes cantidades de células fácilmente cosechadas y con poca morbilidad o malestar del paciente en el sitio donante, así por la capacidad de diferenciación en condrocitos, osteocitos y adipocitos (Yang *et al.* 2012; Wu *et al.* 2013). Se ha demostrado que las células madre autólogas tienen una afinidad por el tejido articular dañado; estudios recientes han confirmado que las células madre tienen la capacidad de localizar y participar en la reparación de las estructuras articulares dañadas. Recientemente, se ha publicado que la terapia celular resultó ser un tratamiento adecuado para las articulaciones de cadera en los perros, la mejoría de la marcha y la capacidad de vivir una vida normal más del perro (Black *et al.* 2008).

Los modelos animales aportan muchas de las claves para mejorar nuestra comprensión sobre la evolución de las lesiones subcondrales en la OA y la creación de tratamientos que pudieran ser eficaces. La mayoría de los estudios clínicos se han ocupado de la enfermedad avanzada como el diagnóstico de la artrosis temprana (Serra *et al.* 2013). En estudios preclínicos, se ha utilizado PRP como un gel para rellenar defectos del cartílago con resultados variables o para retardar la progresión

de la artritis en modelos animales con resultados positivos. Los resultados de los ensayos clínicos actuales sugieren que el PRP puede tener el potencial para llenar defectos y para mejorar la reparación del cartílago, atenúan los síntomas de la osteoartritis y mejora la función articular, con un perfil de seguridad aceptable (Vilar *et al.* 2013).

Xie *et al.* , realizaron defectos osteocondrales en la tróclea de conejos, aplicaron PRP, PRP/CDMTA y PRP/Células madre mesenquimales, encontrando mejores resultados macroscópicos e histológicos en los grupos con PRP y células que en el grupo con PRP solo. En el presente estudio y con nuestro modelo de OA química en conejos, encontramos mayor síntesis de GAGs y de colágena en la matriz extracelular en el grupo que recibió tratamiento de células y en el grupo con células y PRP, que con el grupo en donde solo se administró PRP. Sin embargo, el PRP fue capaz de estimular la regeneración de las lesiones provocadas por la OA química. El mecanismo por el cual el PRP puede estimular la regeneración en los tejidos se puede deber a que una vez activadas, las plaquetas pueden liberar una multitud de factores de crecimiento en concentraciones significativamente más altos que los niveles en sangre incluyendo factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGFb), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EPG), entre otros. Muchas de estas citocinas anabólicas, tales como el TGF- $\beta$ , IGF, FGFb y PDGF, son condro-promotores y condro-protectores (Vilar *et al.* 2013).

En concreto, pueden estimular a condrocitos, células madre mesenquimales y derivadas del tejido adiposo, así como la proliferación celular, promover la síntesis de agregano, colágeno tipo II. También conducir la diferenciación de las CMDTA hacia un fenotipo condrogénico, prevenir la apoptosis de condrocitos y CMDTA y disminuir los efectos catabólicos de citocinas inflamatorias, tales como IL-1 $\beta$ , y MMPs (Yoshihara *et al.* 2011).

Un análisis macroscópico resulta insuficiente ya que es en los análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos donde se puede observar la naturaleza y arquitectura del tejido formado y del tejido lesionado. Sin embargo, los cambios

favorables fueron muy evidentes y respaldados por la escala de Yoshioka, en donde las cuatro variables describen la calidad del tejido articular. En el presente estudio, las rodillas izquierdas mostraron zonas amplias en donde se observaba el hueso subcondral de manera franca. Contrario a los grupos en donde se aplicaron los diferentes tratamientos, donde en todas las rodillas se pudo atestiguar la presencia de un tejido muy similar al cartílago hialino con superficies regulares y con mínima fibrilación.

Microscópicamente en los tres grupos, se observa una recuperación del cartílago, debido a la presencia de grupos de condrocitos cerca de las áreas lesionadas. En la tinción con Tricrómico de Masson se observa un patrón normal, la matriz cartilaginosa en color azul y la matriz ósea en color rojo. En la zona superficial se encuentran fisuras, la tinción con verde rápido indica riqueza de colágenos lo que confirma lo encontrado por Tricrómico de Masson (Yarak 2010). La tinción con Safranina O reveló la presencia de GAGs muy similar al control de cartílago sano. Sin embargo, se pudieron observar áreas de fibrocartílago que suponemos fue por la proliferación excesiva de condrocitos. Aún así, es probable que se requiera de un mayor tiempo para el sacrificio de los animales, pues existen diversos estudios, que sugieren que la regeneración del cartílago total, es un proceso que lleva de 6 a 12 meses (Zscharnack, *et al.* 2010; Marquass *et al.* 2011).

En los tres grupos con tratamiento (rodillas derechas), pudimos observar una mezcla de tejidos en aparente estado de organización: hialino, mesenquimatoso y fibroso. También se puede apreciar lagunas propias del cartílago articular dispersas a lo largo de los cortes histológicos. Existen reportes de mesénquima presente cuando se aplican terapias con células madre, aunque éstas hayan sido pre-diferenciadas y es probable que se deban a factores de crecimiento que éstas secretan, lo que podría promover el reclutamiento de otras células mesenquimales o de células especializadas en la reparación del tejido (LeBaron *et al.* 2000).

Los resultados del presente estudio coinciden con los de numerosos estudios, que han demostrado que el PRP estimula la proliferación de condrocitos y la síntesis de matriz (Akeda *et al.* 2006; Serra *et al.* 2013) e indican que la inyección intraarticular de PRP previene la progresión de la osteoartritis, mejora la función articular y reduce

el dolor en el área. Otros estudios han proporcionado pruebas de que las células madre pueden ofrecer un beneficio terapéutico potencial en la OA (Agung *et al.* 2006; Vilar *et al.* 2013). Sin embargo, debe determinarse el número de aplicaciones necesarias tanto de PRP como de CMDTA para tener un resultado permanente, así como estimar un número adecuado de células que deberán ser aplicadas en los tejidos tratados. En el caso de la medicina veterinaria, se deberá también considerar el grado de lesión, la articulación comprometida, la edad del paciente, así como costos entre una terapia y otra, ya que realizar la técnica de la preparación del PRP requiere de mucho menos inversión y es de menor invasión en comparación con todo el proceso de extracción de CMDTA. Consideramos que es necesario determinar si existe relación entre los niveles de marcadores biológicos. También se deberá realizar inmunohistoquímica para establecer la calidad de la matriz extracelular (Kon *et al.* 2010; Sampson *et al.* 2010).

## **9. CONCLUSIÓN**

Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden representar el fundamento para estudios prospectivos clínicos en la práctica veterinaria con un período de mayor vigilancia para determinar si el efecto del estímulo proporcionado por el PRP, CMDTA y PRP/CMDTA, es capaz de mantener su eficacia a largo plazo.

Aplicar las CMDTA solas o en conjunto con el PRP, mostró una regeneración más favorable de manera macroscópica y microscópica en comparación con el grupo en donde se aplicó solo el PRP. Sin embargo, la técnica del PRP es un procedimiento seguro, sin complicaciones y de bajo costo que también demostró su capacidad de regeneración en comparación con los grupos en donde se dejó progresar la lesión.

## 10. LITERATURA CITADA

1. Agung, M., Ochi, M., Yanada, S., Adachi, N., Izuta, Y., Yamasaki, T., Toda, K. 2006. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 1307–1314.
2. Aigner T, McKenna L. 2002. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci*, 59:5-18.
3. Aigner T, Stoss H, Weseloh G, Zeiler G, von der Mark K. 1992. Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Archiv B. Cell Pathol* 1992, 62:337–345.
4. Ajadi, R. A. Otesile, E. B. Kasali, O. B. 2012. Short-Term Changes In Lipid Profile Following Experimental Osteoarthritis In Dogs, *Bulgarian Journal Of Veterinary Medicine*; 166-171.
5. Anitua E. 1999. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 529-535.
6. Anitua E, Andia I, Ardanza B, *et al.* 2004. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 4–15.
7. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, *et al.* 2007. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology*. 1769-1772.
8. Aust, L., Devlin, B., Foster, S.J., Halvorsen, Y.D., Hicok, K., du Laney, T., Sen, A., Willingmyre, G.D. & Gimble, J.M. 2004. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. 7–14.
9. Akeda, K.; An, H.S.; Okuma, M.; Attawia, M.; Miyamoto, K.; Thonar, E.J.; Lenz, M.E.; Sah, R.L.; Masuda, K. 2006. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthr. Cartil.* 1272–1280.
10. Bacou, F., el Andaloussi, R.B., Daussin, P.A., Micallef, J.P., Levin, J.M., Chammas, M., Casteilla, L., Reyne, Y. & Nougues, J. 2004. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplantation*, 103–111.
11. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T. 2007. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: An in vitro study. 417-420.
12. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H,

- Poole AR. 2011. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest*, 1534–1545.
13. Black, L.L.; Gaynor, J.; Adams, C.; Dhupa, S.; Sams, A.E.; Taylor, R.; Harman, S.; Gingerich, D.A.; Harman, R. 2008. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. 192–200.
  14. Blanco-García FJ, Hernández Royo A, Trigueros JA, Gimeno Marques A, Fernández Portal L, Badia Llach X. 2003. *Guía De Práctica Clínica En Artrosis De Rodilla*. SER. Madrid: Editorial You&US.
  15. Brandl A, Angele P, Roll C, Prantl L, Kujat R, Kinner B. 2010. Influence of the growth factors PDGF-BB, TGF-beta1 and bFGF on the replicative aging of human articular chondrocytes during in vitro expansion. *J Orthop Res*, 354–360.
  16. Chubinskaya S, Kuettner KE, Cole AA. 1999. Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Lab Invest*, 1669–1677.
  17. Cugat R. 2009. Platelet derived growth factors: Experience in soft tissue injuries and in joint trauma. Presented at the Seventh Biennial International Society of Arthroscopy, 5-9.
  18. Dean DD, Muniz OE, Howell DS. 2000. Association of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) with hypertrophic cell enlargement in the growth plate. *Matrix*, 366–375.
  19. Egloff, C.; Hugle, T.; Valderrabano, V. 2012. Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis. *Swiss Med. Wkly*, 142.
  20. Eyre D. 1995. Collagen structure and function in articular cartilage: Metabolic changes in the development of osteoarthritis. In *Osteoarthritic Disorders*, 219–228.
  21. Eyre D, McDevitt CA, Billingham MEJ, Muir .H. 2011. Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experimental osteoarthritis. *Biochem J*, 823–837.
  22. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, *et al*. 2000. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med*, 635-646.
  23. Fenwick SA, Gregg PJ, Rooney P. 1999. Osteoarthritic cartilage loses its ability to remain avascular. *Osteoarthritis Cartilage*, 441-452.

24. Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ. 2002. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*, 276–288.
25. Fukui N, Sandell L. 2001. Enzymatic processing of type IIA procollagen NH2-propeptide by matrix metalloproteinases. *Trans Orthop Res Soc*.
26. Grageda E. 2004. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent*. 301–309.
27. Goldring MB. 2000. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Conn Tiss Res*, 1–11.
28. Goranov, N. V. 2012. Clinical Changes In Sodium Monoiodoacetate-Induced Stifle Osteoarthritis Model In Dogs. *Veterinary World*, 137-144.
29. Harrison P, Cramer EM. 1993. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*. 52–62.
30. Jackson, W.M.; Lozito, T.P.; Djouad, F.; Kuhn, N.Z.; Nesti, L.J.; Tuan, R.S. 2011. Differentiation and regeneration potential of mesenchymal progenitor cells derived from traumatized muscle tissue. 2377–2388.
31. Jones, B.A.; Pei, M. 2012. Synovium-derived stem cells: A tissue-specific stem cell for cartilage engineering and regeneration. 301–311.
32. Jones, E.A.; Crawford, A.; English, A.; Henshaw, K.; Mundy, J.; Corscadden, D.; Chapman, T.; Emery, P.; Hatton, P.; McGonagle, D. 2008. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: Detection and functional evaluation at the single-cell level. 1731–1740.
33. Juni, P.; Reichenbach, S.; Dieppe, P. 2006. Osteoarthritis: Rational approach to treating the individual. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol*. 721–740.
34. Kikuchi T, Sakuta T, Yamauchi T. 1998. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*, 177-86.
35. Kon, E.; Buda, R.; Filardo, G.; di Martino, A.; Timoncini, A.; Cenacchi, A.; Fornasari, P.M.; Giannini, S.; Marcacci, M. 2010. Platelet-rich plasma: Intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. 472–479.
36. Kuroki K., Cook CR., Cook JL. 2011. Subchondral bone changes in three different canine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 1142-1149.

37. Lang A, Horler D, Baici A. 2000. The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis. *J Rheumatology*, 1970–1979.
38. LeBaron, R. G. & Athanasiou, K. 2000. Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials*, 2575–2587.
39. Lee CH, Cook JL, Mendelson A, Moioli EK, Yao H, Mao JJ. 2007. Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study.
40. Lippiello L, Hall D, Mankin HJ: 2001. Collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 593–600.
41. Malek, S.; Sample, S.J.; Schwartz, Z.; Nemke, B.; Jacobson, P.B.; Cozzi, E.M.; Schaefer, S.L.; Bleedorn, J.A.; Holzman, G.; Muir, P. 2012. Effect of analgesic therapy on clinical outcome measures in a randomized controlled trial using client-owned dogs with hip osteoarthritis. 145-158.
42. Mankin HJ. 2000. Current concepts review: The response of articular cartilage to mechanical injury, *J Bone Joint Surg*. 460–466.
43. Mankin HJ, Johnson ME, Lippiello L. 2005. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules. *J Bone Joint Surg*, 131–139.
44. Marquass, B. *et al.* 2011. Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year. *The American journal of sports medicine*, 1401–1412.
45. Marx RE. 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 489–496.
46. Meachim G, Brooke G. 2002. The pathology of osteoarthritis. In *Osteoarthritis: Diagnosis and Management*. Edited by Moskowitz RW, Howell D S, Goldberg VM, Mankin HJ. Philadelphia: WB Saunders, 29–42.
47. Naito K, Takahashi M, Kushida K Suzuki M, Ohishi T, Miura M, Inoue T, Nagano A. 1999. Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology*, 510–515.
48. Newman A. 1998. Current Concepts: articular cartilage repair. *Am J Sports Med*. 309–324.

49. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. 2008. Platelets and wound healing. *Front Biosci*, 3532–3548.
50. O’Driscoll S. 1998. Current concepts review: the healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg*. 1795–1812.
51. Puissant, B; Barreau, C; Bourin, P; Clavel,C; Corre, J; Bousquet, C; Taureau,C; Cousin, B; Abbal,M; Laharrague, P; Penicaud, L; Casteilla, L; Blancher, A. 2005. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells.
52. Rodríguez-Jiménez, F.J.; Valdes-Sánchez, T.; Carrillo, J.M.; Rubio, M.; Monleon-Prades, M.; García-Cruz, D.M.; García, M.; Cugat, R.; Moreno-Manzano, V. 2012. Platelet-rich plasma favors proliferation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells in methacrylate-encapped caprolactone porous scaffold niches. *J. Funct. Biomater*. 556–568.
53. Rothwell AG, Bentley G. 2013. Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage. *J Bone Joint Surg Brit*, 588–594.
54. Rychel, J.K. 2010. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. 20–25.
55. Ryu J, Treadwell BV, Mankin HJ. 2007. Biochemical and metabolic abnormalities in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 49–57.
56. Sampson, S.; Reed, M.; Silvers, H.; Meng, M.; Mandelbaum, B. 2010. Injection of platelet-rich plasma in patients with primary and secondary knee osteoarthritis: A pilot study. *Am. J. Phys. Med. Rehabil*. 961–969.
57. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I. 2013. Intraarticular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: A retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol*.
58. Sanchez M, Azofra J, Anitua E, *et al*. 2003. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: A case report. *Med Sci Sports*, 1648-1652.
59. Sandy J, Adams ME, Billingham ME, Plaas AHK, Muir H. 2003. In vivo and in vitro stimulation of chondrocyte biosynthetic activity in early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 388–397.
60. Sandell LJ. 2002. Molecular biology of collagens in normal and osteoarthritic cartilage. In *Osteoarthritic Disorders*. Edited by Kuettner KE, Goldberg V. Rosemont, Illinois: American Association of Orthopaedic Surgeons, 131-146.
61. Serra, C.I.; Soler, C.; Carillo, J.M.; Sopena, J.J.; Redondo, J.I.; Cugat, R. 2013. Effect of autologous platelet-rich plasma on the repair of full-thickness

- articular defects in rabbits. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 1730–1736.
62. Singh, J.A. 2012. Stem cells and other innovative intra-articular therapies for osteoarthritis: What does the future hold? 34-42.
  63. Smith JO, Orefo ROC, Clarke NMP, Roach HI. 2003. Changes in the angiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis. *J Orthop Sci*, 849-857.
  64. Stewart AA, Byron CR, Pondenis H, Stewart MC. 2007. Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal stem cell monolayer expansion and chondrogenesis. *Am J Vet Res*, 941–945.
  65. Timmins, N.E.; Kiel, M.; Gunther, M.; Heazlewood, C.; Doran, M.R.; Brooke, G.; Atkinson, K. 2012. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 1817–1826.
  66. Tortorella M, Pratta M, Liu RQ, Abbaszade I, Ross H, Burn T, Arner E. 2000. The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem*, 25791–25797.
  67. Tsvee Lapidot, Ayelet Dar, and Orit Kollet. 2005. How do stem cells find their way home? *Blood*, 45-56.
  68. Uitterlinden, EJ; Jahr, H; Koevoet, LM; Jenniskens, M; Bierma-Zeinstra; DeGroot; Verhaar, N; Weinans, N; van Osch, M. 2005. Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants. *OsteoArthritis and Cartilage*.
  69. Vaquerizo, V.; Plasencia, M.A.; Arribas, I.; Seijas, R.; Padilla, S.; Orive, G.; Anitua, E. 2013. Comparison of intra-articular injections of plasma rich in growth factors (prgf-endoret) *versus* durolane hyaluronic acid in the treatment of patients with symptomatic osteoarthritis: A randomized controlled trial. 1635–1643.
  70. Vilar, J.M.; Morales, M.; Santana, A.; Spinella, G.; Rubio, M.; Cuervo, B.; Cugat, R.; Carrillo, J.M. 2013. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to prgf-endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Vet. Res.* 131-143.
  71. Wang-Saegusa, A.; Cugat, R.; Ares, O.; Seijas, R.; Cusco, X.; Garcia-Balletbo, M. 2011. Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life. *Arch. Orthop. Trauma Surg*, 311–317.
  72. Wu, L.; Cai, X.; Zhang, S.; Karperien, M.; Lin, Y. 2013. Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells:

Perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *J. Cell. Physiol.* 938–944.

73. Wu, W.; Chen, F.; Liu, Y.; Ma, Q.; Mao, T. 2007. Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: Experimental study in a rabbit model. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1951–1957.
74. Xie X, Wang Y, Zhao C, Guo S, Liu S, Jia W, Tuan RS, Zhang C: 2012. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials*, 7008–7018.
75. Yang, S.; Huang, S.; Feng, C.; Fu, X. 2012. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Strategies, challenges, and potential for cutaneous regeneration. *Front. Med.* 41–47.
76. Yarak, S.; Okamoto, O.K. 2010. Human adipose-derived stem cells: Current challenges and clinical perspectives. *An. Bras. Dermatol.* 647–656.
77. Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA. 2001. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 87-98.
78. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. 2011. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 455–461.
79. Zscharnack, M. *et al.* 2010. Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model. *The American journal of sports medicine*, 1857–1869.