



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Evaluación de la condrogénesis mediada por medios  
condicionados de células madre mesenquimales  
derivadas de tejido adiposo versus plasma rico en  
plaquetas en defectos osteocondrales de rodilla: un  
modelo experimental en conejos**

**Camilo Sebastián Ramírez Yépez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía  
Unidad de Ortopedia y Traumatología  
Bogotá D.C, Colombia

2022



**Evaluación de la condrogénesis mediada por medios  
condicionados de células madre mesenquimales  
derivadas de tejido adiposo versus plasma rico en  
plaquetas en defectos osteocondrales de rodilla: un  
modelo experimental en conejos**

**Camilo Sebastián Ramírez Yépez**

Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Especialista en Ortopedia y Traumatología**

Director:

Dr. Jorge Rolando Ortiz Morales

Coodirectores:

Dr. Orlando Chaparro Garzón

Dra. Itali Marcelly Ineró Segrera

Línea de Investigación:

Cirugía de rodilla, Tecnología de tejidos, Ciencias básicas

Grupo de investigación Biología de Células Madre

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía  
Unidad de Ortopedia y Traumatología  
Bogotá D.C, Colombia

2022



*A mis padres, profesores y compañeros.*



# Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado el respectivo reconocimiento, aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Camilo Sebastián Ramírez Yépez

Camilo Sebastián Ramírez Yépez

Fecha: 21 de enero de 2022.





## Resumen

### **Evaluación de la condrogénesis mediada por medios condicionados de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo versus plasma rico en plaquetas en defectos osteocondrales de rodilla: un modelo experimental en conejos**

**Introducción:** Las lesiones del cartílago hialino, ya sean de tipo traumático o degenerativo dan lugar a defectos condrales u osteocondrales que no cicatrizan con cartílago hialino nuevo. Por esta razón se ha investigado en la terapia regenerativa, con especial atención al secretoma de las células madre mesenquimales (MSC). En el presente estudio se plantea evaluar la condrogénesis del plasma rico en plaquetas (PRP) suplementado con medios condicionados de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AD-MSC-CM) en un modelo de defecto osteocondral (DO) de rodilla en conejos.

**Materiales y métodos:** se plantea un estudio por fases, una fase piloto en la cual se establece el modelo experimental estandarizando primero la técnica quirúrgica con seis piezas cadavéricas, luego se estandariza el método de administración del tratamiento con dos conejos Nueva Zelanda con supervivencia. El primero se trata únicamente PRP administrado de forma infiltrativa en la rodilla, el segundo se trata con PRP + AD-MSC-CM. Se practica eutanasia a los 7 días y se evalúan los desenlaces y las complicaciones perioperatorias. En las fases siguientes del trabajo se plantea un estudio con 20 conejos: un grupo sham (n=2), un grupo control (n=6), un grupo tratado con PRP (n=6) y un grupo tratado con PRP + AD-MSC-CM (n=6), se sacrifican a las 12 semanas y se evalúa la regeneración condral de forma macroscópica e histológica; y la diferenciación del tipo de cartílago mediante inmunohistoquímica.

**Resultados:** El presente documento muestra los resultados de la fase piloto determinando el diseño del modelo experimental. Se propone un DO en el surco troclear al lado del tendón extensor digitorum longus. A los 7 días, ambos tratamientos seguían

intraarticulares, sin embargo, mientras que el conejo tratado únicamente con PRP no mostraba ningún cambio en el DO, el conejo tratado con PRP + AD-MSC-CM exhibía características de cicatrización en el defecto creado rellenando parcialmente el mismo. Durante siete días, ninguno de los conejos mostró ningún tipo de efecto adverso más que una leve cojera. Tampoco mostraron signos importantes de dolor, malestar o angustia por lo que no hubo necesidad de aplicar criterios de punto final.

**Discusión y conclusiones:** A pesar de las diferencias entre especies, el planteamiento de un DO en conejos permite evaluar el principio del tratamiento a aplicar siendo un modelo costo efectivo, que permitirá analizar la capacidad condrogénica del PRP y los AD-MSC-CM. El PRP es una buena estrategia que sirve como andamiaje para la entrega de factores de crecimiento y además actúa de forma sinérgica con los AD-MSC-CM. Debemos aclarar que los resultados respecto a la condrogénesis deben analizarse mediante un estudio histopatológico en las siguientes fases del estudio y tras haber pasado 12 semanas. A pesar de haber realizado un implante xenogénico no observamos ningún tipo de evento adverso en el conejo tratado con AD-MSC-CM, posiblemente indica que estos son seguros en la aplicación en estudios ulteriores.

Palabras clave: Cartílago, Células madre mesenquimales, Medios condicionados, Secretoma.

## Abstract

### **Evaluation of adipose-derived mesenchymal stem cell conditioned media mediated chondrogenesis versus platelet-rich plasma in knee osteochondral defects: an experimental model in rabbits**

**Introduction:** Hyaline cartilage injuries, whether traumatic or degenerative, give rise to chondral or osteochondral defects that do not heal with new hyaline cartilage. For this reason, it has been investigated in regenerative therapy, with special attention to the mesenchymal stem cell (MSC) secretome. The present study aims to evaluate the chondrogenesis of platelet-rich plasma (PRP) supplemented with adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned media (AD-MSC-CM) in a model of knee osteochondral defect (OD) in rabbits.

**Materials y methods:** A phased study is proposed, a pilot phase in which the experimental model is established, first standardizing the surgical technique with six cadaveric pieces, then the treatment administration method is standardized with two New Zealand rabbits with survival. The first is treated only with PRP administered infiltratively in the knee, the second is treated with PRP + AD-MSC-CM. Euthanasia is performed at 7 days and perioperative outcomes and complications are evaluated. In the following phases of the work, a study with 20 rabbits is proposed: a sham group (n=2), a control group (n=6), a group treated with PRP (n=6, and a group treated with PRP + AD. -MSC-CM (n=6), sacrificed at 12 weeks and chondral regeneration is evaluated macroscopically and histologically; and differentiation of cartilage type by immunohistochemistry.

**Results:** This document shows the results of the pilot phase determining the design of the experimental model. A DO is proposed in the trochlear groove next to the extensor digitorum longus tendon. At 7 days, both treatments were still intra-articular, however, while

the rabbit treated with PRP alone did not show any change in DO, the rabbit treated with PRP + AD-MSC-CM exhibited healing characteristics in the defect created by partially filling the same. For seven days, none of the rabbits showed any adverse effects other than a slight lameness. They also did not show significant signs of pain, discomfort or distress, so there was no need to apply endpoint criteria.

**Discussion and conclusions:** Despite the differences between species, the approach of a DO in rabbits allows evaluating the principle of the treatment to be applied, being a cost-effective model, which will allow analyzing the chondrogenic capacity of PRP and AD-MSC-CM. PRP is a good strategy that serves as a scaffold for the delivery of growth factors and also acts synergistically with AD-MSC-CM. We must clarify that the results regarding chondrogenesis must be analyzed by means of a histopathological study in the following phases of the study and after 12 weeks have passed. Despite having performed a xenogenic implant, we did not observe any type of adverse event in the rabbit treated with AD-MSC-CM, possibly indicating that these are safe in the application in further studies.

Key words: Cartilage, Mesenchimal stem cells, Conditioned media, Secretome

## CONTENIDO

Resumen .....	V
Lista de imágenes.....	XI
Lista de tablas .....	XII
Lista de abreviaturas .....	XIII
Introducción.....	1
Pregunta de investigación, Hipótesis, Justificación y Objetivos .....	3
1.1    Pregunta de investigación .....	3
1.2    Hipótesis.....	3
1.3    Justificación .....	3
1.4    Objetivos .....	5
1.4.1    Objetivo general .....	5
1.4.2    Objetivos específicos .....	5
Marco teórico.....	7
1.5    Cartílago hialino y cicatrización .....	7
1.6    Implicaciones clínicas de las lesiones osteocondrales .....	9
1.7    Modelos animales .....	10
1.8    Antecedentes y medicina regenerativa .....	11
1.9    Plasma rico en plaquetas.....	15
1.10    Células madre mesenquimales.....	17
1.11    Relación del plasma rico en plaquetas con células madre mesenquimales.....	20
1.12    Secretoma como alternativa de terapias regenerativas no celulares.....	22
Metodología.....	27
1.13    Estudios previos .....	27
1.14    Tipo de estudio.....	27
1.15    Población.....	27
1.16    Tamaño de la muestra y grupos de estudio.....	27
1.17    Fases del estudio .....	29
1.17.1    Preparación de plasma rico en plaquetas autólogo y del PRP suplementado con AD- MSC-CM. 29	
1.17.2    Obtención y preparación de medios condicionados de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. ....	30

---

1.17.3	Procedimiento quirúrgico.....	31
1.17.4	Estandarización del método de administración del tratamiento .....	32
1.17.5	Análisis patológico.....	33
1.17.6	Análisis de resultados.....	36
1.18	Aspectos éticos .....	38
Resultados .....		39
1.19	Fase Piloto.....	39
1.19.1	Estandarización de la técnica quirúrgica .....	39
1.19.2	Presencia de signos inflamatorios locales o dehiscencia en la herida. ....	42
1.19.3	Dolor, malestar y angustia.....	43
1.19.4	Criterios de punto final.....	43
1.19.5	Evaluación del tratamiento aplicado .....	43
Discusión.....		45
1.20	El conejo como modelo de defecto osteocondral en rodilla .....	45
1.21	Determinación del tamaño y ubicación del defecto osteocondral .....	46
1.22	Estandarización de la administración del tratamiento .....	47
1.23	PRP como sistema de andamiaje para administración de factores de crecimiento .....	50
1.24	Nuevos andamiajes biológicos derivados del PRP.....	52
1.25	Desenlaces adversos .....	53
Conclusiones.....		57
Referencias .....		59
Anexos .....		69

## Lista de imágenes

	<b>Página</b>
<b>Imagen 1</b>	Distribución de subgrupos del grupo piloto. 31
<b>Imagen 2</b>	Distribución de subgrupos del grupo definitivo. 31
<b>Imagen 3</b>	Diagrama de la línea de trabajo. 32
<b>Imagen 4</b>	Preparación del plasma rico en plaquetas (PRP). 32
<b>Imagen 5</b>	Activación del plasma rico en plaquetas (PRP). 33
<b>Imagen 6</b>	Activación del plasma rico en plaquetas (PRP) suplementado con los medios condicionados (AD-MS-CM). 33
<b>Imagen 7</b>	Obtención de los medios condicionados (AD-MS-CM). 34
<b>Imagen 8</b>	Infiltración del Plasma rico en plaquetas (PRP). 35
<b>Imagen 9</b>	Implante de plasma rico en plaquetas (PRP). 36
<b>Imagen 10</b>	Incisión. 42
<b>Imagen 11</b>	Abordaje parapatelar medial. 42
<b>Imagen 12</b>	Luxación lateral de la patela y exposición de los cóndilos femorales. 43
<b>Imagen 13</b>	Especímenes cadavéricos. 43
<b>Imagen 14</b>	Creación del defecto osteocondral (DO). 44
<b>Imagen 15</b>	Localización del defecto osteocondral (DO). 44
<b>Imagen 16</b>	Evolución de la cicatrización de la herida. (Día del procedimiento: Día 0). 45
<b>Imagen 17</b>	Evaluación del tratamiento aplicado (PRP). 46
<b>Imagen 18</b>	Evaluación del tratamiento aplicado (PRP + AD-MS-CM). 46

## Lista de tablas

		<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b>	International Cartilage Repair Society (ICRS) macroscopic evaluation of cartilage repair.	36
<b>Tabla 2</b>	International Cartilage Repair Society (ICRS) II Parameters.	38



## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
<b>MSC</b>	Células Madre Mesenquimales
<b>PRP</b>	Plasma Rico en Plaquetas
<b>AD-MSC</b>	Células Madre Mesenquimales Derivadas de Tejido Adiposo
<b>DO</b>	Defecto Osteocondral
<b>ICRS</b>	Sociedad Internacional de Reparación de Cartílago
<b>OA</b>	Osteoartritis
<b>MSC-CM</b>	Medios Condicionados de Células Madre
<b>AD-MSC-CM</b>	Medios Condicionados de Células Madre Derivadas de Tejido Adiposo
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante Beta
<b>BMP</b>	Proteína Morfogénica Ósea
<b>IGF</b>	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
<b>ACI</b>	Implante de Condrocitos Autólogos
<b>MACI</b>	Implante de Condrocitos Autólogos asistido por Matriz
<b>BM-MSC</b>	Células Madre Mesenquimales Derivadas de Médula Ósea.
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
<b>PLGA</b>	Ácido poliláctico/poliglicólico
<b>IL-1RA</b>	Antagonista del Receptor de Interleuquina 1
<b>FGF</b>	Factor de Crecimiento Fibroblástico
<b>EGF</b>	Factor de Crecimiento Epidérmico
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>sTNF-R</b>	Receptores Solubles De Factor De Necrosis Tumoral
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>PIGF</b>	Factor de Crecimiento Placentario
<b>MCP</b>	Proteína Quimioatrayente de Monocitos
<b>CCL</b>	Quimiocina de la familia CC
<b>CXCL</b>	Quimiocina de la familia CXC
<b>IDO</b>	Indoleamina
<b>PGE</b>	Prostaglandina E
<b>PRF</b>	Fibrina Rica en Plaquetas
<b>SD-MSC</b>	Células Madre Mesenquimales Derivadas de Membrana Sinovial
<b>CICUA</b>	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales



## Introducción

El cartílago articular es un tejido caracterizado por ser avascular y su aporte nutricional principalmente se da a través de imbibición. Esta condición hace que sea difícil reparar y que su capacidad intrínseca de cicatrización sea muy limitada(1) .

El trauma o sobreuso articular puede llegar a ocasionar un deterioro biomecánico secundario a un impacto sobre la superficie articular, que finalmente resulta en pérdida de ésta con la subsecuente alteración biomecánica de la articulación en cuestión (2). Situación compleja teniendo en cuenta que es un hallazgo común encontrar defectos osteocondrales (DO) ocasionados por procesos degenerativos como la osteoartritis (OA), el trauma agudo y en condiciones más específicas como la osteocondritis disecante (3).

En el trauma inicial, el hecho de penetrar el hueso subcondral inicia una estimulación de la médula ósea aumentando principalmente la síntesis de colágeno tipo II dando lugar a una cicatrización generando fibrocartílago, el cual tiene propiedades biológicas y mecánicas diferentes del cartílago hialino. Este mismo proceso puede ser iniciado quirúrgicamente por microfractura asistido por artroscopia, hasta el momento uno de los métodos de tratamiento más utilizados en la práctica clínica por su baja complejidad y resultados clínicos aceptables por un tiempo determinado (2).

La medicina regenerativa tiene el objetivo de recuperar el recubrimiento de cartílago hialino en los DO. Se han estudiado diversas opciones terapéuticas para manejar los DO incluyendo terapias celulares, métodos de ingeniería tisular y más recientemente la terapia génica (4).

Los tratamientos con células madre mesenquimales (MSC) es una de las terapias celulares que más ha demostrado efectos condrogénicos en varios modelos animales de lesión osteocondral (5), sin embargo, se ha visto que estos efectos están mediados en gran parte por mecanismos paracrinos que ejercen su acción directa en el tejido lesionado. Los estudios muestran que la condrogénesis se lleva a cabo mediante diferentes moléculas

secretadas al espacio extracelular (quimiocinas, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas etc.) desde las células, a este conjunto de moléculas se les conoce como el secretoma celular. Tras algunos días de incubación, se ha demostrado que estas moléculas del secretoma se encuentran en el medio donde se cultivan las células madre, a estos medios se les denomina medios condicionados de células madre (MSC-CM). Se ha demostrado que los mencionados medios tienen un efecto terapéutico comparable al que exhibe el implante de MSC, no obstante, con ciertas ventajas respecto a los tratamientos con células, por ejemplo, tienen un menor riesgo de generar rechazo inmunológico, su almacenamiento es fácil, menor riesgo de tumorigenicidad, entre otras (6).

El plasma rico en plaquetas (PRP), es un concentrado rico en plaquetas, las cuales una vez son activadas liberan abundantes factores de crecimiento y citoquinas que afectan positivamente la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares. Adicionalmente, la fibrina y las partículas responsables de la adhesión plaquetaria presentes proporciona un excelente andamiaje o matriz que sirve de vehículo para las moléculas presentes en el PRP (7). Sus aplicaciones en diferentes enfermedades del sistema músculo esquelético han sido ampliamente estudiadas y se ha visto que el PRP per se no solo estimula la actividad condrogénica, sino que también potencia el efecto de las MSC y además funciona como andamiaje de los elementos solubles presentes, lo cual hace fácil su manipulación y administración (8).

Teniendo en cuenta el efecto regenerador paracrino de cartílago hialino observado en las células madre mesenquimales (MSC), el objetivo del presente estudio consiste en evaluar el potencial condrogénico de los medios condicionados de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AD-MSC-CM) cuando se asocian al PRP y poder compararlo con los efectos del PRP cuando se administra solo para manejar DO. A la fecha no existe información sobre estudios similares que evalúen este potencial terapéutico.

# Pregunta de investigación, Hipótesis, Justificación y Objetivos

## 1.1 Pregunta de investigación

¿Existen beneficios al dar un tratamiento combinado de medios condicionados de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo más plasma rico en plaquetas para defectos osteocondrales en la superficie articular del fémur del conejo?

## 1.2 Hipótesis

Teniendo en cuenta que el efecto paracrino que tienen las MSC ha demostrado un potencial condrogénico en estudios preclínicos y clínicos, el uso de medios condicionados obtenidos a partir de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AD-MSC-CM), como tratamiento en combinación con plasma rico en plaquetas (PRP) administrado como una matriz potencian el efecto condrogénico, desde el punto de vista de regeneración celular y productor de matriz extracelular.

## 1.3 Justificación

El daño del cartílago articular puede ocurrir como consecuencia de un trauma agudo, el envejecimiento o ambos. Existen muchos mecanismos por el cual se lleva a cabo este deterioro de la superficie articular, por ejemplo, el microtrauma repetitivo, la inestabilidad de la articulación o la transmisión de la carga con lesiones directas o indirectas (9). Esto cobra especial importancia cuando observamos en la clínica que la osteoartritis (OA) es la forma más frecuente de lesión del cartílago hialino, con una significativa carga epidemiológica global, se estima que afecta a 9.6% de los hombres y 18% de las mujeres por encima de los 60 años con una proyección hacia el aumento. El curso natural de la

enfermedad da lugar a un importante deterioro de la funcionalidad, calidad de vida y lleva progresivamente a una discapacidad; En el 2010 de 291 condiciones, la OA fue la causa número 11 de discapacidad en el contexto mundial, justo por debajo de la diabetes (10).

Dentro de los tratamientos que existen para recuperar el cartílago articular, actualmente el tratamiento de elección por su accesibilidad, practicidad y bajo costo es la microfractura del hueso subcondral, con el inconveniente de que el cartílago generado es fibrocartílago cuya composición y características difieren del nativo, por lo que trae un alivio de los síntomas, sin embargo, durante un corto plazo.

Con el advenimiento de la terapia regenerativa, se han utilizado desde injertos de cartílago autólogo y la ingeniería de condrocitos autólogos hasta el trasplante de células madre y más recientemente la terapia génica, con el objetivo de recuperar el cartílago hialino. Particularmente las MSC han probado ser eficaces en el manejo del dolor, la mejoría en las escalas funcionales y han mostrado incluso regeneración de cartílago hialino con propiedades biológicas y mecánicas similares a las del nativo. No obstante, también se puede ver ciertas desventajas como, por ejemplo, la necesidad de un donante, el riesgo latente de generar rechazo inmunológico y su procesamiento y expansión que resultan dispendiosos (9).

El concepto de secretoma se entiende como un conjunto de factores tróficos liberados al espacio extracelular desde las células. En este contexto, se ha podido comprobar que los MSC-CM poseen moléculas secretadas al espacio extracelular con efectos anabólicos, inmunomoduladores, antiinflamatorios, y antiapoptóticos sobre diferentes tipos celulares que pueden compararse al efecto observado en las MSC una vez implantadas. Esto ha podido verificarse en estudios previos realizados por el grupo de investigación Biología en Células Madre de la Universidad Nacional de Colombia, en donde los MSC-CM han probado tener el mismo efecto terapéutico que las MSC sin traer consigo las desventajas inherentes en el uso de estas (11–13).

Teniendo en cuenta la naturaleza del cartílago hialino como tejido, el gran impacto y trascendencia clínica de su deterioro, la limitada oferta de tratamiento además de su difícil acceso, proponemos en el presente estudio, el uso de AD-MSC-CM junto con PRP para el manejo de DO en un modelo preclínico utilizando conejos. Dado que el secretoma de las

AD-MSC contiene factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, es pertinente compararlo (mediante los medios condicionados) con los efectos del PRP, del cual, se ha visto que tiene efectos similares en términos de regeneración de cartílago hialino, adicionalmente el PRP podría servir de matriz para todos estos elementos biológicos (7).

No se conocen al momento estudios preclínicos o clínicos en los que se realice manejo de este tipo de lesiones articulares con AD-MSC-CM, de ahí la importancia de comenzar a evaluar su eficacia en defectos osteocondrales en un modelo preclínico. Esto nos permitirá evaluar el principio del tratamiento propuesto, evaluar su eficacia, seguridad, y de acuerdo con los resultados, posiblemente abra paso a fases clínicas.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar el potencial condrogénico del PRP y del PRP suplementado con AD-MSC-CM en defectos osteocondrales en un modelo preclínico en rodilla de conejo.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

1. Desarrollar un modelo in vivo de defecto osteocondral para el implante de PRP y PRP suplementado con medios condicionados.
2. Evaluar el potencial condrogénico del PRP en lesiones osteocondrales en un modelo preclínico en rodilla de conejos.
3. Evaluar el potencial condrogénico del PRP suplementado con medios condicionados en lesiones osteocondrales en un modelo preclínico en rodilla de conejos.
4. Comparar el potencial regenerativo del PRP y del PRP suplementado con medios condicionados con base en su capacidad de regenerar el cartílago hialino en lesiones osteocondrales en un modelo preclínico en rodilla de conejo.





## Marco teórico

### 1.5 Cartílago hialino y cicatrización

El cartílago es un tejido conectivo altamente especializado que de acuerdo con su composición celular y fibrilar ha sido clasificado en distintos subtipos. El cartílago hialino es uno de los más conocidos debido a su papel en la osificación endocronal y su capacidad de amortiguación y distribución de cargas a nivel articular.

La composición del cartílago hialino está dada por células mesenquimales denominadas condrocitos los cuales se encargan de producir y mantener sustancias fibrilares como colágeno, glucosaminoglucanos y proteoglicanos, los cuales en conjunto con iones inorgánicos y agua forman la matriz extracelular del tejido. El colágeno tipo II constituye cerca del 90 % de estas fibras en la matriz extracelular del cartílago hialino y por tanto constituye un referente histológico y molecular de este tipo de cartílago. La presencia de otros tipos de colágeno como el III, IX, XI y VI cumplen funciones estructurales, así como señales de mecanotransducción para los condrocitos (1). El agregano, uno de los proteoglicanos más importantes en el cartílago hialino, tiene la propiedad de crear uniones no covalentes con el hialuronano y uniones covalentes con glucosaminoglucanos. Éstos, al tener grupos aniónicos en su estructura molecular, crean cargas negativas que atraen cationes como el sodio generando un desequilibrio iónico entre el cartílago y el tejido circundante que resulta en una concentración mayor de agua en el cartílago. De esta manera el agua se distribuye en el tejido y le da la propiedad de resistir deformaciones y cargas de alto impacto (14).

La disposición de los condrocitos y los componentes de la matriz extracelular están distribuidas en 4 zonas histológicamente distinguibles.

La zona superficial compuesta por dos o tres capas de condrocitos aplanados, que en conjunto con fibroblastos son productores de lubricina, un proteoglicano encargado de la lubricación de las superficies articulares (15). Algunos autores describen que esta zona esta subdividida en dos áreas, un área superficial llamada lámina splendens o lubricina donde predominan finas fibras y polisacáridos, y un área profunda caracterizada por la presencia de condrocitos (16). La presencia de colágeno es mayor en la zona superficial y se estima que disminuye cerca del 20% hacia las zonas más profundas (1).

La zona intermedia está compuesta por condrocitos redondos u ovoides asociados a fibras las cuales se distribuyen oblicuamente con respecto a la superficie. Presenta un alto contenido en agua que se distribuye hacia la zona superficial y al espacio sinovial como respuesta a la compresión generada por cargas y que luego retorna a su lugar cuando la presión disminuye.

La zona profunda presenta condrocitos redondos distribuidos de manera lineal y en paralelo con respecto a las fibras de colágeno y se encuentra separada de un área calcificada subyacente por medio de un conjunto de fibras de colágeno tipo I que son reconocidas histológicamente y que reciben el nombre de marca de marea (15).

La zona calcificada se caracteriza por tener colágeno tipo X en contacto con el hueso subcondral (17), y presenta condrocitos hipertróficos que tienen la capacidad de calcificar la matriz extracelular (18).

El cartílago es un tejido avascular, conocido por su limitada capacidad para regenerarse dada la hipocelularidad condrocitaria y su bajo potencial condrogénico. Usualmente su capacidad de reparación depende de la profundidad de la lesión. Lesiones que no alcanzan el hueso subcondral o son defectos parciales presentan proliferación celular con acumulación de condrocitos los cuales producen una matriz celular subóptima. Lesiones más profundas que alcanzan hasta el hueso subcondral pueden presentar un potencial mayor de reparación ya que al comprometer la placa del hueso subcondral se permite la perfusión sanguínea, la llegada de células inflamatorias y mesenquimales, acumulación de plaquetas y formación de coágulos de fibrina. Este proceso lleva a la formación de fibrocartílago, caracterizado por una mayor cantidad de colágeno tipo I con respecto a

colágeno tipo II y una densidad menor de proteoglicanos por lo cual presenta propiedades diferentes al cartílago hialino (1).

## **1.6 Implicaciones clínicas de las lesiones osteocondrales**

Los DO representan un desafío para la ortopedia moderna dado que el potencial reparador del cartílago es limitado ya que como se mencionó anteriormente carece de una vasculatura intrínseca, así como de células con capacidad de diferenciación.

La pérdida de cartílago puede ocurrir como consecuencia de lesiones traumáticas que conducen a defectos focales, o a través de una degeneración crónica, produciendo defectos que pueden ser de espesor parcial o completo, este último, siendo el que mayor probabilidad de reparación espontánea tiene, debido al contacto estrecho que tienen con las células de la médula ósea, que van a migrar al sitio de la lesión, formando un coágulo que va empezar a sintetizar matriz extracelular por medio de factores de crecimiento, que sirven como quimiotácticos para otras células, principalmente factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), proteínas morfogénicas óseas (BMP), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (19,20). Los DO focales que involucran la articulación patelofemoral, pueden resultar en síntomas mecánicos que perjudican la función, causan dolor o edema, más aún si se localizan en áreas de carga de los compartimentos medial o lateral. Lo anterior finalmente resulta en una OA debido a que se presenta una pérdida progresiva del cartílago articular, formación de osteofitos, quistes subcondrales, estrechamiento del espacio articular e inflamación intermitente de los tejidos (21).

Los defectos DO cuando no son tratados, pueden progresar a lesiones más complejas no susceptibles de manejo con el arsenal terapéutico actual, llevando así a requerir el reemplazo total de la articulación si las medidas conservadoras fallan, situación que se viene dando más frecuentemente y cada vez en pacientes más jóvenes (22).

La OA representa una enfermedad con gran impacto a nivel mundial debido a su gran prevalencia siendo aproximadamente de 9% para los hombres por encima de los 60 años y el doble para las mujeres (23), para el año 2010 fue más alta en países de ingresos altos de la región de Asia y Pacífico, seguida de Oceanía y África del norte con Oriente medio,

en contraste con el sur y sudeste de Asia en donde su prevalencia fue más baja (10). En Colombia la OA es actualmente la más frecuente de las enfermedades que producen dolor musculoesquelético y una de las principales causas de dolor e incapacidad, con un crecimiento exponencial que hace que a la edad de 70 años afecte a 1 de cada 3 individuos, afectando más comúnmente a mujeres que a hombres, se estima que la prevalencia es de 33.9% después de los 70 años (24).

Por lo general, las medidas terapéuticas para el manejo de DO, deben cumplir tres objetivos principales, que son: Restauración del rango de movilidad articular, mejoría del dolor, así como evitar la aparición o progresión de la OA (7). Es por este motivo, que en las últimas décadas se ha estudiado el campo de la ingeniería de tejidos, que tiene como objetivo desarrollar técnicas que restauren o mantengan órganos o tejidos dañados, usando combinaciones de células, andamios y moléculas activas que generen el mínimo malestar al paciente (25).

## 1.7 Modelos animales

Han sido diversos los modelos animales utilizados para el estudio de defectos articulares, ya sea a partir de un defecto focal o de una simulación de OA, los estudios incluyen animales pequeños como ratones, ratas y conejos, mientras que los animales grandes en los diferentes estudios, incluyen caballos, perros, ovejas, corderos y porcinos. El conejo es el más utilizado dado que tiene un tamaño articular en la rodilla más grande que los roedores pequeños, las propiedades subcondrales de la tróclea articular son similares al cóndilo femoral medial del humano, y no tienen la limitante de los altos costos de mantenimiento y manejo que tienen los animales más grandes. La limitante de estos es su pequeño tamaño en la articulación, el delgado espesor del cartílago articular, la diferencia en la biomecánica articular y la mayor capacidad de cicatrización espontánea intrínseca del animal. Pese a todo esto, los conejos son una herramienta muy útil para la prueba del principio a evaluar, permite además evaluar la seguridad del tratamiento antes de pasar a animales más grandes o estudios clínicos (26).

## 1.8 Antecedentes y medicina regenerativa

La evidencia clínica actual en el tratamiento para el manejo de los defectos osteocondrales (DO), particularmente hablando en la articulación de la rodilla incluye múltiples técnicas de manejo antes de realizar un reemplazo articular.

Una opción de manejo es mediante técnicas que estimulen la médula ósea subyacente al cartílago (perforaciones osteocondrales, condroplastia por abrasión y microfractura), éstas buscan iniciar la liberación de células condroprogenitoras desde la cavidad medular del hueso a través de la placa subcondral para dar lugar a la formación de fibrocartílago (compuesto principalmente por colágeno tipo I), este por supuesto con unas propiedades biomecánicas inferiores a las del cartílago hialino (compuesto principalmente por colágeno tipo II). Tiene un potencial de reparación impredecible y es considerada por muchos como un tratamiento paliativo para el manejo del dolor en la OA antes de una artroplastia. Dentro de las posibles complicaciones de este procedimiento, se ha reportado formación de quistes subcondrales y osteofitos intralesionales. Para potenciar la estimulación de la médula ósea, algunos autores han descrito técnicas de aumentación biológica, como la adición de células, factores de crecimiento o matrices ya sean celulares o acelulares. Estas tienen como objetivo mejorar las características del tejido de reparación en el defecto de cartílago (27).

Otra técnica utilizada son los trasplantes condrales u osteocondrales cuyo principio busca reemplazar el cartílago articular en el sitio del defecto con tapones de cartílago hialino cosechados de un lugar distante al defecto de la rodilla. La mosaicoplastia trata el mismo principio al injertar varios tapones de cartílago en un defecto osteocondral más grande. Los injertos tienen la ventaja de ser autólogos, sin embargo, por este mismo hecho una de sus desventajas responde a la morbilidad del área donante de cartílago y a su vez constituye un límite para la cantidad de cartílago donante disponible para la reparación de defectos grandes. También es posible utilizar aloinjertos para tratar sobre todo defectos más grandes, tienen la ventaja de que requieren un solo tiempo quirúrgico, con relativa sencillez de la técnica y han mostrado formar histológicamente cartílago hialino.

Una limitante de los injertos es la no fusión con el tejido nativo, esto debido a que el injerto puede ser de diferente grosor u orientación rotacional, con la subsecuente alteración de la biomecánica articular. Otra complicación es el potencial de transmisión de enfermedades con los injertos alogénicos, y la posibilidad de rechazo inmunológico, además de requerir

estudios a largo plazo para evaluar su efectividad, puesto que la evidencia disponible solo evalúa resultados a corto y mediano plazo. También existen los tapones sintéticos los cuales representan un costo importante además de sus complejos y demandantes procesos de producción (27).

En los últimos años, se han hecho grandes esfuerzos por investigar diferentes alternativas de manejo, y la medicina regenerativa juega un papel muy importante. Ésta integra la terapia celular, la terapia con matrices o andamiajes y la integración de estos dos. A la fecha, se considera un campo muy amplio y aún en desarrollo, cuyas alternativas de tratamiento exhiben mecanismos de acción que no son completamente entendidos. La medicina regenerativa tiene como objetivo el poder regenerar tejido favoreciendo ciertas condiciones como la presencia y producción de factores de crecimiento, hormonas y distintos nutrientes que benefician las condiciones físicas y mecánicas presentes en los tejidos que quieren repararse. En este sentido la mayoría de las pruebas se han realizado en modelos animales, principalmente conejos (7), donde se han utilizado principalmente por células inflamatorias, células mesenquimales, células hematopoyéticas entre otras.

Dentro de las terapias celulares, el implante de condrocitos autólogos (ACI) es hasta el momento la única técnica aprobada por la Food and Drug Administration de los estados unidos (US-FDA). Los condrocitos inicialmente requieren ser extraídos, cultivados y expandidos, luego al implantarse, se fijan en el defecto con un injerto de periostio o una membrana de colágeno, lo cual implica un segundo procedimiento artroscópico. En las técnicas de implantes celulares de segunda generación se encuentra el implante de condrocitos autólogos asistido por una matriz (MACI). Esta usa materiales bioabsorbibles como andamiajes que proveen de una estructura tridimensional para la adhesión celular, proliferación y producción de matriz extracelular, por lo tanto, prescindiendo de un tejido o material de fijación adicional. Estas técnicas tienen costos importantes, una metodología dispendiosa, corren riesgo de una mala integración con el tejido circundante, hipertrofia sintomática y para el ACI, riesgo de falla del implante, principalmente cuando se asocia a una membrana de periostio (27).

Actualmente una de las fuentes celulares más ampliamente estudiadas son las células madre, con la capacidad de ser altamente regenerativas, división celular teóricamente ilimitada, y dar lugar a diferentes linajes celulares de acuerdo con su clasificación

(totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales). Desde este punto de vista las células más utilizadas son las MSC adultas, ya que no están sujetas a los dilemas éticos y los riesgos tumorigénicos concernientes al uso de células madre embrionarias. Las fuentes más comunes de MSC que se han estudiado son en médula ósea, tejido adiposo, piel, folículos de pelo, periostio, músculo esquelético, membrana sinovial y pulpa dental. Sus limitaciones van a depender del sitio donde son cosechadas, por nombrar algunos ejemplos, las células madre de médula ósea (BM-MS) para su obtención requieren un procedimiento invasivo, y en una baja cantidad en los aspirados medulares, por lo que tienen que expandirse *in vitro*. Esto puede solucionarse si las células provienen de tejido adiposo, ya que es un tejido ampliamente disponible, puede obtenerse cantidades mucho mayores y los procedimientos se pueden considerar menos invasivos. Como contraparte, las AD-MS, exhiben un potencial regenerativo menor que aquellas derivadas de la médula ósea. En general, en los diferentes estudios, las MSC han demostrado una habilidad para la formación de cartílago hialino parecido al nativo con resultados variables, sin embargo, siempre con riesgo de generar un fenotipo fibroblástico durante los cultivos e hiperproliferación celular intraarticular (7).

Los aspirados concentrados de médula ósea son una gran fuente tanto como de células madre mesenquimales como de factores de crecimiento como por ejemplo VEGF, TGF- $\beta$ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), BMP-2 y -7. Éstos últimos contenidos también dentro de los gránulos de las plaquetas presentes en los concentrados. Se obtienen mediante centrifugación de aspirados de médula ósea, tienen la ventaja de ser autólogos, y han probado ser tanto osteogénicos como condrogénicos (4). Se han utilizado en distintos ensayos clínicos probando mejorar los puntajes de satisfacción del paciente y los puntajes de evaluación funcional (28).

En cuanto a la construcción de medios, matrices o andamiajes, los biomateriales más comúnmente utilizados en la regeneración de cartílago hialino están hechos principalmente de polímeros naturales, artificiales o compuestos. Estos vienen en forma de esponjas, hidrogeles, enmallados, membranas o nanofibras. Están hechos de proteínas naturales como colágeno, fibrina, seda, gelatina, o polisacáridos como alginato, agarosa, chitosán y ácido hialurónico, se consideran biocompatibles y biodegradables. Estas características de las matrices les dan las propiedades de adherirse al tejido nativo, producir matriz extracelular como colágeno tipo II y glucosaminoglucanos y una vez implantadas influyen el efecto condroinductivo. Ejemplos de estas son las matrices de ácido

poliláctico/poliglicólico (PLGA), polietilenglicol, o fumarato de polipropileno. Dentro de sus desventajas puede decirse que al degradarse pierden sus propiedades biomecánicas, tienen riesgo de producir una reacción inmunológica y pueden transmitir enfermedades (7).

Los medios sintéticos, son más estables desde el punto de vista biomecánico, son inmunogénicamente neutros, y no tienen el riesgo de transmitir enfermedades, sin embargo, desde el punto de vista biológico, pueden tener una menor capacidad restaurativa del tejido. Dentro de los más utilizados, están aquellos compuestos por fosfatos de calcio, por ejemplo, biocerámicas de hidroxiapatita (7). Autores como Tang et al. (29), desarrollaron un constructo híbrido a base de un andamiaje impreso en 3D con PLGA suplementado con PRP activado como medio para transporte de factores de crecimiento de MSC así logrando un balance entre las propiedades mecánicas del andamiaje y una bioactividad para la regeneración de cartílago, el análisis de expresión génica indicó una diferenciación osteogénica y condrogénica mostrando este constructo como una buena herramienta en la ingeniería de cartílago. Chang et al. (30) comparó el efecto de preparados en coágulo de PRP, PRP + un andamiaje de PLGA y PRP + PLGA + movimiento pasivo continuo en defectos osteocondrales en rodilla de conejos encontrando que el grupo tratado con PRP + PLGA + CPM a las semanas 4 y 12 tenían una mejor caracterización de la matriz hacia cartílago hialino que los otros dos grupos que mostraban una matriz de fibrocartílago.

La terapia génica es otro campo de estudio y opción de tratamiento. Ésta busca utilizar un segmento del genoma que codifica para un factor bioactivo dado. Esto lo hace mediante vectores virales (adenovirus, retrovirus, lentivirus o herpes) o no virales, y aplicación puede realizarse mediante el implante de células transgénicas con el vector ya implantado o se puede inyectar el vector en el sitio del defecto osteocondral. Uno de los más utilizados es el antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1RA) que ha mostrado una disminución en los síntomas de modelos de enfermedades degenerativas en ratón, rata, conejo, perro y caballo (31). En otros estudios también se ha buscado codificar para factores de crecimiento como IGF I, IGF-II, TGF- $\beta$ , y algunos factores de transcripción como SOX-9, esenciales para la diferenciación condrogénica (32).

En resumen, podría decirse que el gold estándar al momento para el tratamiento de los DO es la microfractura por su bajo costo, solo requiere un tiempo quirúrgico, está



fácilmente disponible y no tiene morbilidad en el sitio donante, sin embargo, teniendo en cuenta que es un procedimiento que genera fibrocartílago y el control del dolor es temporal. Considerando el alto costo asociado a la ingeniería de condrocitos, los inconvenientes que tienen las técnicas de injertos osteocondrales, la limitada disponibilidad de biomateriales o matrices sintéticas y la falta de estudios clínicos y de costo efectividad que justifiquen su uso, la aplicación de cualquiera de estos tratamientos como técnicas rutinarias de manejo de DO está lejos de ser un algoritmo de manejo.

## 1.9 Plasma rico en plaquetas

El PRP se obtiene tras la centrifugación de una muestra de sangre periférica dando lugar a un producto altamente concentrado en plaquetas. Sus componentes básicos y principales efectos parten de factores de crecimiento que estimulan el anabolismo celular, los mediadores y moduladores antiinflamatorios producen un efecto neto antiinflamatorio, y finalmente el fibrinógeno el cual actúa como un biomaterial de andamiaje.

Una vez son activadas, las plaquetas liberan factores de crecimiento que se encuentran en concentraciones mayores a las sanguíneas (TGF –  $\beta$ , PDGF, IGF, VEGF, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factores de crecimiento epidérmicos (EGF), etc.), muchos de estos protegen y estimulan positivamente los condrocitos de tal manera que sintetizan agreganos y colágeno tipo II, estimulan la proliferación de MSC y su diferenciación a condrocitos, previenen su apoptosis y limitan los efectos de las citoquinas proinflamatorias como interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) y metaloproteinasas.

Por otro lado, las plaquetas pueden liberar numerosas citoquinas antiinflamatorias (IL-1ra, receptores solubles de factor de necrosis tumoral I y II (sTNF-R I y II), IL-4, IL-10, IL-13, interferón gamma (INF- $\gamma$ )) y en menor medida algunas citoquinas proinflamatorias, esto sugiere que el PRP podría suprimir la inflamación en la OA y por lo tanto el dolor.

Las proteínas contenidas en el PRP (fibrinógeno y otros factores de la coagulación), se activan y forman un andamiaje provisional para que las células se adhieran, migren y proliferen, lo que resulta útil en tejidos sin vascularización como por ejemplo el cartílago, ya que esta matriz se asemeja a la presente en el estadio inicial de la reparación tisular y la cicatrización de heridas (33).

Se han realizado varios estudios con PRP en los que se utiliza como tratamiento para OA de rodilla y defectos condrales DO en varios modelos animales, y demuestran resultados variables en términos de regeneración tisular, sin embargo, con una tendencia hacia la generación de matriz extracelular, disminución de la actividad inflamatoria, promoviendo angiogénesis, coagulación y homeostasis (34).

En seres humanos es más complicado establecer el grado de regeneración de cartílago hialino, por lo que la mayoría de los estudios se enfocan en evaluar la evolución clínica tras la aplicación del PRP, y muestran tener mejores desenlaces clínicos que en los grupos control con ácido hialurónico. En una revisión sistemática realizada por Campbell et al. (35) observó un efecto benéfico significativamente mayor del PRP inyectado comparado a otros tratamientos como por ejemplo el ácido hialurónico y los corticoesteroides, encajando este como un tratamiento ideal para los estadios iniciales de la OA. A pesar de lo observado, se debe tener en cuenta el tiempo transcurrido tras la aplicación, pues tiene un impacto importante en el efecto observado. En un metaanálisis más reciente realizado por Chen et al. (36), observaron que no hubo diferencia significativa en términos de dolor a corto plazo, esto cambia cuando se evalúa los pacientes a un plazo mayor, en donde el tratamiento con PRP tiene ventajas sobre el control. De igual forma si nos referimos a las escalas funcionales (IKDC), a corto plazo no hubo diferencias estadísticamente significativas con el grupo control, situación que se repite en un plazo intermedio, sin embargo, a un largo plazo si se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas favoreciendo el grupo tratado con PRP. En lo que respecta al hallazgo de eventos adversos, el estudio no encontró diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control.

Entonces, podemos ver que dentro de las terapias celulares para regeneración condrogénica, el PRP es uno de los tratamientos hasta ahora más utilizados tanto en estudios preclínicos como en clínicos, sin embargo, aún queda mucho por entender sobre sus mecanismos de acción, dosificación, aplicación y métodos de preparación. Por tanto, a pesar de la evidencia, hasta el momento no es posible emitir un juicio directo sobre la recomendación de su uso.

## 1.10 Células madre mesenquimales

Las MSC son células multipotenciales capaces de diferenciarse a otros tipos de células que dan lugar a diferentes tejidos, con funciones distintas como por ejemplo cartílago, hueso, músculo, tendón, tejido adiposo y estroma hematopoyético. El Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la sociedad Internacional para Terapia Celular definió a las células madre mesenquimales como células con una morfología delgada y elongada que se adhieren al plástico, con características antiinflamatorias, anti apoptóticas, anti fibróticas con capacidad inmunomoduladora. Una célula madre mesenquimal debe expresar antígenos de superficie específicos: CD73, CD90, y CD105, que las distinguen de otro tipo de células madre y deben carecer de CD45, CD34, CD14, o CD11b, CD79 alfa o CD19 y HLA-DR, además deben demostrar un potencial de diferenciación multipotente in vitro (37).

En su aplicación clínica, este tipo de células son capaces de liberar diferentes moléculas biológicamente activas que tienen un efecto benéfico en los tejidos lesionados, inhiben la fibrosis, apoptosis e inflamación y promueven la angiogénesis y la regeneración del tejido. Los mecanismos de acción no están entendidos por completo, sin embargo, se ha observado una relación directa de las MSC con los pericitos vasculares, los cuales muestran marcadores propios de estas células y, sin importar su tejido de origen, muestran facultades condrogénicas, osteogénicas y adipogénicas. Lo anterior sugiere que las MSC podrían corresponder a pericitos que se presentan en cualquier tejido vascularizado que ante cualquier noxa contribuyen para la reparación del tejido mediante la secreción de factores tróficos que controlan la reacción inflamatoria endógena (IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, PGE-2, IDO, TGF- $\beta$ ), suscitan la angiogénesis (VEGF, IGF-1, factor de crecimiento placentario (PIGF), Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), bFGF, IL-6) y estimulan la proliferación y diferenciación de células progenitoras (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL20, CX3CL1, CXCL5, CXCL11, CXCL1). A su vez, se reclutan células madre endógenas que liberan otros factores paracrinos (PDGFs, BMPs, IGFs, TGF- $\beta$ , FGF, VEGF, IL-6, angiogenina, MCP-3, MCP-1, EGF).

Cuando se trasplantan MSC en cualquier tipo de tejido con el objetivo de regenerar tejido, se observa un efecto terapéutico, sin embargo, no se aprecia una diferenciación de estas a un tipo específico de célula y, por otro lado, no sobreviven por mucho tiempo, lo cual sugiere que muchos de los efectos terapéuticos si no todos, podrían estar mediados por

factores tróficos con un mecanismo paracrino. Esto da lugar a pensar en la posibilidad de la administración directa de estos factores para inducir efectos similares mediante moléculas bioactivas que controlen la inflamación, prevengan las reacciones autoinmunes, disminuyan la formación de cicatriz, inhiban la apoptosis celular debido a isquemia, estimulen la formación y estabilización de vasos sanguíneos y secreten factores tróficos que inducen la replicación de progenitores tisulares endógenos (38) .

Específicamente hablando de la capacidad regenerativa del cartílago articular, las MSC buscan un complejo de reconstrucción constituido por células, andamiajes y factores de estimulación. Las fuentes celulares más utilizadas son la médula ósea, el tejido adiposo y el tejido sinovial, siendo la primera la que mejor capacidad condrogénica tiene en estudios in vitro e in vivo, aunque las células de tejido sinovial han mostrado un mayor potencial en cuanto a proliferación y diferenciación se refiere (39). Las AD-MS, son células que como su nombre lo indica provienen del tejido adiposo, un tejido que puede ser fácilmente aislado, en grandes cantidades, con relativa poca morbilidad y dolor del sitio donante. En el 2001 se hizo el primer reporte de células multipotenciales aisladas de tejido adiposo con la capacidad de diferenciarse a adipocitos, osteoblastos, condrocitos y miocitos bajo condiciones específicas in vitro. Desde entonces han surgido numerosos estudios con este tipo de células.

Para una diferenciación condrogénica, se requiere de un microambiente específico en el cual confluyan factores de crecimiento para tal fin. El componente más importante podría ser el TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3, el cual influye para la expresión de colágeno tipo II y el depósito de glucosaminoglucanos. Otro factor importante es la BMP-6, que al combinarse con el TGF- $\beta$ , incrementa la condrogénesis significativamente con la expresión además de agrecanos, de igual forma BMP-2, 4 y 7. La expresión de SOX-9 en el medio mantiene el fenotipo condrogénico, mientras que su supresión causaba desdiferenciación de los condrocitos (20). Las células una vez trasplantadas además han mostrado disminuir la producción de metaloproteinasas, también hay liberación de vesículas extracelulares que tienen influencia en la regeneración de cartílago, promueven la deposición de colágeno tipo II y glicosaminoglucanos. Sus propiedades inmunomoduladoras derivan de la liberación y señalización intracelular del secretoma de cada origen celular, este cambia el fenotipo celular de las células inflamatorias hacia uno antiinflamatorio. Por ejemplo, se ha visto que

las células que derivan de médula ósea suprimen la proliferación de linfocitos T e inhiben la activación de células natural killer mediante la liberación de prostanglandina E2 (PGE2) e indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). También hay una inhibición de la proliferación, activación, maduración y presentación de antígenos de las células dendríticas, la respuesta producida por los linfocitos B también se modula mediante estas señales paracrinas (26).

Se han publicado varios ensayos clínicos utilizando trasplantes de MSC con el objetivo de regenerar cartílago hialino en osteoartritis de rodilla con resultados prometedores. En un metaanálisis reciente realizado por Lijima et al. (40), se revisa la evidencia de la efectividad del tratamiento con MSC para OA de rodilla. Los resultados sugerían que el tratamiento con MSC ya sea intraarticular o implantación mediante artroscopia mejoraba significativamente el dolor, el desempeño físico y la calidad del cartílago, sin embargo, la eficacia del tratamiento en cuanto a la mejoría en el volumen del cartílago era limitada. En el mismo metaanálisis se analizó la frecuencia de efectos adversos, siendo estos principalmente leves (dolor y edema) con una prevalencia variable (2 – 60%) que se presentaban dentro de la primera semana del tratamiento, y no se documentaron efectos adversos severos, probablemente indicando que los beneficios del tratamiento superan los riesgos. Sin embargo, a pesar de dichos resultados la evidencia se calificó de muy bajo a bajo de acuerdo con el sistema GRADE (Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation) debido al diseño de los estudios involucrados, alto riesgo de sesgo, gran heterogeneidad en las poblaciones. En un metaanálisis más reciente realizado por Maheshwer et al (41). donde se recogieron 25 trabajos con un total de 489 pacientes con OA, se evaluó la regeneración de cartílago además las escalas de dolor y función reportados por el paciente. Con respecto al dolor, no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con MSC y el control en un término de seguimiento promedio de 12 meses, no obstante, los grupos entre los estudios eran moderadamente heterogéneos. En las escalas de evaluación funcional en un promedio de 20 meses, se encontró una diferencia estadísticamente significativa que favorecía al grupo en tratamiento. En cuanto a regeneración de cartílago hialino, se reportó una diferencia estadísticamente significativa que beneficiaba al grupo tratado, sin embargo, no fue significativa en términos de la calidad del cartílago. Estos hallazgos sugieren que se requieren de estudios con mayor nivel de evidencia que faciliten un sustento científico para establecer un algoritmo de manejo eficaz con MSC para el tratamiento de OA.

Las MSC han mostrado ser seguras, en una revisión sistemática realizada por Lalu et al. (42) con 1012 participantes que recibieron terapia con MSC intravascular tanto autólogas como alogénicas para diferentes condiciones, no se identificaron eventos adversos significativos estadísticamente más que fiebre transitoria, y algunos estudios los pacientes se siguieron hasta 90 meses. De forma intraarticular las células madre autólogas no mostraron tener algún potencial de infección, malignidad o muerte en un seguimiento de 21 meses en una revisión sistemática realizada por Peeters et al (43).

## **1.11 Relación del plasma rico en plaquetas con células madre mesenquimales.**

En los cocultivos de MSC con PRP, se ha demostrado que la disponibilidad y el potencial proliferativo de las células aumenta de forma directamente proporcional a la concentración de PRP en la mezcla, de igual forma aumentan los niveles de IL-6, IL-8, IL-10, VEGF e INF- $\gamma$ , el efecto que se ha comprobado en varios modelos preclínicos. Por otro lado, se ha demostrado que la red de fibrina intrínseca del PRP da lugar a un andamiaje tridimensional que sirve como vehículo de entrega de factores de crecimiento, esta interacción podría aumentar el potencial de diferenciación celular y aumentar el tiempo de vida de las MSC (8).

En una revisión sistemática realizada por Rubio-Azpeitia et al. (44), incluyen estudios realizados in vitro que evalúan la interacción del PRP con las MSC humanas y encuentran que los concentrados PRP poseían propiedades quimiotácticas que potenciaban la proliferación de las células de una forma no tumorigénica, preservaban el potencial de diferenciación celular y no interferían con el linaje de diferenciación. Así mismo, también preservaban el potencial inmunomodulador de las MSC. Atashi et al. (45) realizaron un estudio de cocultivo de AD-MSK con diferentes concentraciones de PRP (1%, 10%, 20%, 40% y 60%) por 10 días (PRP con una concentración promedio de  $1.2 \times 10^6 \pm 120.6$  plaquetas/ $\mu$ L), en este estudio se evaluó el potencial de proliferación de las células, el fenotipo celular, la capacidad de multipotencialidad y la estabilidad cromosómica, y encuentran que el PRP a una concentración de 20% era la más efectiva aumentando 13.9 veces el número de células comparado con otras concentraciones sin cambiar las

características de las células, por tanto concluyen que las acciones del PRP era dosis dependiente. Loibl et al. (46), adicionalmente estudiaron el efecto del PRP en tres diferentes escenarios de centrifugación (1500 rpm por 5 minutos con freno, 1500 rpm por 4 minutos sin freno y 3000 rpm por un minuto sin freno) al suplementarse al 10% y 20% en coocultivo con AD-MSC, y se evaluó la cinética del ciclo celular de las células y encuentran que un porcentaje mayor de células se hallaban en fase S del ciclo en los cultivos tratados con PRP al 20% en comparación del 10%, lo cual sugiere una mayor estimulación de la proliferación celular, esto es concordante con el análisis de Rubio-Azpeitia (44). Jalowiec et al. (47), evaluaron la influencia de diferentes concentraciones de plaquetas en las propiedades reológicas, y liberación de factores de crecimiento en geles preparados con PRP a diferentes concentraciones de plaquetas ( $1000 \times 10^3$ ,  $2000 \times 10^3$ ,  $10000 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ), descubren que estos cambios de su contenido no modifican las propiedades reológicas del gel preparado y en todos los casos el PRP mostraba una relación positiva en la liberación de proteínas siendo esta dosis dependiente. Adicionalmente estudiaron la interacción del PRP con cultivos de BM-MSC, y precisan que la mayor viabilidad de células cultivadas al día 7 se presentó con geles preparados a concentraciones de  $1000 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ , proveyendo el mejor ambiente para las células madre.

Existen ya modelos preclínicos de implante de células madre con PRP. En el 2012 Lee et al. (48), condujeron un estudio con conejos con DO en el surco troclear del fémur y se aplicó tratamiento con células madre derivadas de sinovial (SD-MSC) en conjunto con PRP y observan una reparación del defecto con cartílago hialino a las 4, 12 y 24 semanas cuando se comparó con el grupo control y otro grupo tratado únicamente con PRP. Samuel et al. (49), en un modelo de conejos con lesiones condrales en el cóndilo femoral medial de forma bilateral estudiaron si el uso concomitante de PRP y BM-MSC podría tener un efecto reparativo sinérgico al injertarse en el área del defecto. Al término de un mes de la lesión se trató la rodilla derecha solo con PRP en el primer grupo, BM-MSC solas en un segundo grupo, y la combinación de ambos en un tercer grupo. Encontraron a los 3 meses que el tratamiento con PRP y células madre solas fueron igualmente efectivos respecto al control en términos de regeneración de cartílago hialino, sin embargo, la combinación de estos mostró mayores puntajes de reparación condrogénica, además de mayor contenido de glucosaminoglicanos, estos datos se reprodujeron a los 6 meses post tratamiento.

Desde el punto de vista clínico, la evidencia no es muy amplia y los resultados observados indican que hay efectos positivos respecto a la analgesia y el estado funcional de los

pacientes. En una revisión sistemática realizada por Shi et al. (50), recopiló 33 trabajos en donde sólo tres de ellos evaluó la combinación del tratamiento conjunto con MSC más PRP. En uno de estos (51), no se encontró diferencias en los desenlaces del tratamiento combinado vs el tratamiento únicamente con PRP, sin embargo, si había mejoría con ambos tratamientos. En otro trabajo (52) si hubo diferencia en los desenlaces funcionales y escalas de dolor, con ventaja en el tratamiento combinado vs PRP solo. El trabajo restante (53) mostró resultados superiores con el implante de MSC únicamente y la combinación de PRP más MSC, sin embargo, sin diferencias estadísticamente significativas entre estos. En un estudio adicional realizado por Pintat et al. (25), se evaluó la seguridad de la administración por inyección guiado por fluoroscopia de AD-MSC en conjunto con plasma rico en plaquetas (PRP), sin evidenciar ningún efecto adverso, por otro lado, evaluó el desenlace clínico e imagenológico y revela una mejoría sintomática a los 6 y 12 meses de seguimiento, en la evaluación por resonancia, sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas. Se ha probado su seguridad en series de casos al usarse conjuntamente con efectos secundarios leves (dolor y edema) y ninguno severo o grave (50).

La evidencia respecto al uso concomitante del PRP con MSC para manejar DO articulares nos indica que aparentemente esta combinación tiene un efecto sinérgico respecto al potencial condrogénico, reparador articular e inmunomodulador. Adicionalmente el PRP como se ha dicho en repetidas ocasiones provee de una matriz donde pueden depositarse los distintos tratamientos, la evidencia de estudios en humanos es reducida y se requieren de más estudios para probar su eficacia.

## **1.12 Secretoma como alternativa de terapias regenerativas no celulares**

En los últimos años ha surgido un nuevo concepto en medicina regenerativa conocido como el secretoma, el cual se define como una serie de factores o moléculas secretadas al espacio extracelular (proteínas solubles, ácidos nucleicos libres, lípidos y vesículas extracelulares) que ejercen un efecto paracrino en las células y tejidos vecinos. Cada



secretoma es específico de cada tipo celular y tejido y puede cambiar de acuerdo con el estado fisiológico o una condición patológica dada (6).

Para el caso de las MSC, se ha documentado ampliamente que una vez implantadas, su vida media es muy corta para tener algún impacto en el órgano blanco, sugiriendo que los efectos terapéuticos de las células madre son principalmente paracrinos. Se ha visto que los factores secretados por estas células tienen diversos efectos benéficos que modulan el microambiente, lo que subsecuentemente da lugar a unas condiciones favorables para la regeneración de los tejidos. Dichos factores constituyen el secretoma presente en el medio de cultivo de las MSC, que se conoce como medios condicionados (38).

Los MSC-CM han demostrado tener una actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria mediada en parte por moléculas entre las que se encuentran citoquinas antiinflamatorias (TGF- $\beta$ 1, IL 13, proteína de unión a IL18, Factor neurotrófico ciliar (CNTF), neurotrofina 3 (NT-3), IL10, IL12p70, IL17E, IL27 o antagonista del receptor de IL1 (IL1RA)), y citoquinas proinflamatorias (IL1b , IL6, IL8, and IL9), cuyo balance en el tejido en cuestión determina el efecto final. Se ha demostrado que las MSC son capaces de afectar la activación y proliferación de todas las células del sistema inmune, por ejemplo, pueden inhibir la proliferación de linfocitos CD4 Y CD8, las células presentadoras de antígenos y la diferenciación de monocito a macrófago (6). Por otro lado, el secretoma de las MSC tiene actividad anti apoptótica mediante la producción de proteínas inhibitorias de la apoptosis (BCL-2, VEGF, CXCL12), y la disminución de la expresión de proteínas proapoptóticas (por ejemplo, Bax, caspasa – 3).

Contienen además diversos factores de crecimiento que pueden variar de acuerdo con el tipo celular donde se encuentran. Estos se han utilizado como alternativa para la reparación tisular y regulación de la angiogénesis mediante la inducción de la proliferación y migración de células endoteliales, promoviendo la formación tubular y previniendo la apoptosis celular endotelial. Se ha identificado mediante análisis proteómicos algunas moléculas con un papel clave del efecto angiogénico como por ejemplo el inhibidor tisular de metaloproteína 1 (TIMP-1), TGF- $\alpha$ , VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), IL 6, IL 8 (17), y otros con gran actividad osteogénica por ejemplo BMP, PDGF, TGF- $\beta$ , IGF, factor de crecimiento endotelial celular (ECGF), FGF, EGF, entre otros (12). Un estudio realizado en el 2010 (54) evaluó la proteómica de las proteínas presentes en el secretoma de las MSC y localiza hasta 187 proteínas, y en presencia de TNF- $\alpha$  hasta 118, como ejemplos las ya mencionadas. Debido a la complejidad y variedad del secretoma de

las células madre mesenquimales (MSC), se requieren aún más estudios de caracterización cualitativa y cuantitativa que determine cuales son los principales agentes relacionados con el potencial terapéutico de los medios condicionados.

In vivo, hay varios modelos animales experimentales. Se ha demostrado ampliamente la cantidad de aplicaciones de los MSC-CM y sobre diversos tejidos, que revelan efectividad terapéutica similar al trasplante de células madre (6). En una revisión sistemática realizada por Bousnaki et al. (55), donde se incluyeron 28 trabajos en modelos preclínicos donde se indujo OA, en general se obtuvieron resultados positivos utilizando medios condicionados, exosomas y vesículas extracelulares. Estos evidencian reparación del cartílago en el área de defecto, y regeneración de este, esto soporta la hipótesis de que las células madre actúan mediante un efecto paracrino en lugar de una regeneración tisular a partir de la diferenciación de las MSC en un determinado tejido. Además, cuatro de los estudios incluidos en la revisión prueban que la aplicación de medios condicionados ejercía un efecto antiinflamatorio, inmunomodulador (mediante la regulación en la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), antiapoptótico (disminuyendo la síntesis de metaloproteinasas), angiogénico y desde luego regenerativo (cartílago hialino). En términos de practicidad, la aplicación de todo el secretoma es más costo efectivo comparado con por ejemplo utilizar las vesículas extracelulares, pues su proceso de obtención es más complejo con el riesgo de disminuir la concentración de factores que ejercen ese efecto paracrino. Son pocos los estudios clínicos realizados en humanos, en una revisión de la literatura (56), sobre el uso de medios condicionados para regeneración en el sistema músculo esquelético, identifican un solo estudio que involucra humanos en defectos dentales alveolares que mostraban regeneración ósea sin efectos secundarios importantes (57). También se disponen hasta el momento de algunos modelos de estudio clínico en reparación de tejidos en heridas de piel (58) y alopecia (59).

Son varias las ventajas del uso de medios condicionados en terapia regenerativa ya que resuelve varios problemas presentes en la terapia celular como por ejemplo la compatibilidad inmunológica, tumorigenicidad, formación de émbolos, o transmisión de infecciones. Su seguridad puede ser evaluada de forma similar a agentes farmacéuticos convencionales, puede almacenarse sin la necesidad de agentes criopreservativos tóxicos y durante un largo periodo sin perder su potencia, su producción como medios

condicionados es más económica y práctica a la hora al aplicarse clínicamente, además de no tener que someter al paciente a procedimientos invasivos de extracción de muestras en un sitio donante. Puede producirse en masa bajo condiciones de laboratorio controladas, el efecto terapéutico obtenido puede modificarse de acuerdo con el efecto celular específico deseado y finalmente no hay conflictos éticos presentes con el uso de terapias celulares (6).



# Metodología

## 1.13 Estudios previos

Se realizó una búsqueda en la base de datos de PubMed con palabras clave y con los siguientes términos MeSH: Mesenchymal Stem Cells, Secretome, Culture Media Conditioned, Paracrine Communication, Knee joint, Cartilage. Además se realizaron búsquedas en ScienceDirect y SciELO. En todas las ocasiones se utilizaron los conectores booleanos AND y OR. Sin embargo, hasta ahora no hay ningún estudio planteado en el cual se evalúe la eficacia clínica de los medios condicionados de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en una matriz de plasma rico en plaquetas para el tratamiento de defectos osteocondrales de rodilla de conejo.

## 1.14 Tipo de estudio

Estudio experimental en modelo animal.

## 1.15 Población

Se selecciona una población para estudio de 3 especímenes cadavéricos y 22 conejos machos, de la especie Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) de entre 2000 a 4000 gramos con una edad aproximada de 4 a 6 semanas.

## 1.16 Tamaño de la muestra y grupos de estudio

Conejos vivos: 22.

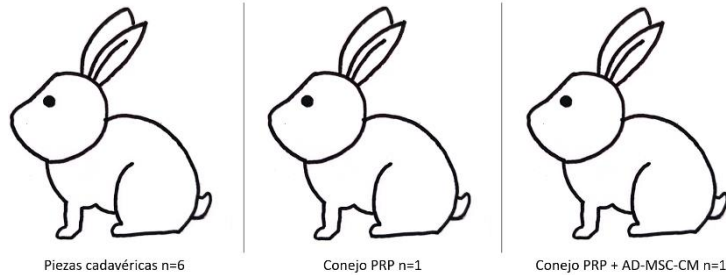
Especímenes cadavéricos: 3

Se planteó un subgrupo de conejos piloto para estandarización del modelo (Imagen 1):

G1: 3 Cadáveres de conejo o piezas anatómicas (6 rodillas).

G2: 1 Conejo vivo para la aplicación de PRP (1 rodilla).

G3: 1 Conejo vivo para la aplicación de PRP suplementado con AD-MSC-CM (1 rodilla).



*Imagen 1. Distribución de subgrupos del grupo piloto*

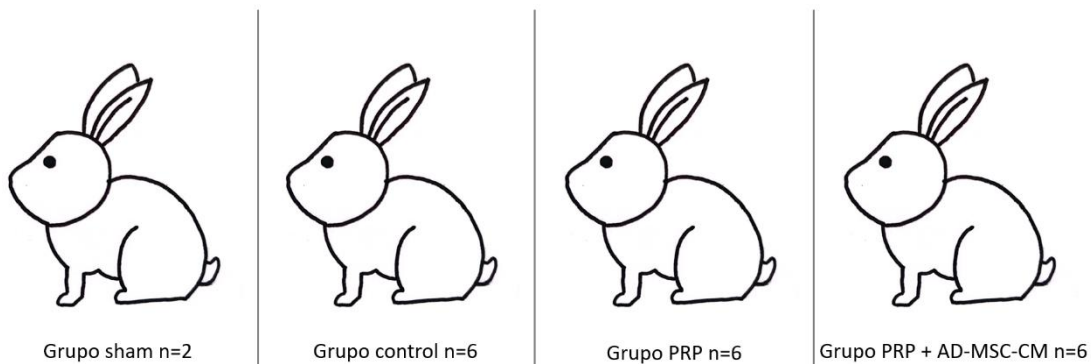
Se plantearon 4 subgrupos de conejos sujetos de estudio (n=20) (Imagen 2):

G1: Grupo sham con 2 conejos sanos.

G2: Grupo control con 6 conejos sanos.

G3: Grupo tratado únicamente con PRP con 6 conejos sanos.

G4: Grupo tratado con PRP suplementado con AD-MSC-CM con 6 conejos sanos.



*Imagen 2. Distribución de subgrupos del grupo definitivo.*

## 1.17 Fases del estudio

Se planteó una línea de trabajo de 4 fases: una fase piloto para estandarización de la técnica quirúrgica y el tratamiento, una segunda fase quirúrgica en los sujetos de estudio de intervención y aplicación del tratamiento, seguido de una fase postoperatoria de análisis macroscópico e histológico y finalmente una fase de recopilación de datos, análisis y publicación de resultados (Imagen 3).



Imagen 3. Diagrama de la línea de trabajo.

### 1.17.1 Preparación de plasma rico en plaquetas autólogo y del PRP suplementado con AD-MS-CM.

Se obtienen muestras sanguíneas de los conejos bajo anestesia, se extraen 5 ml de sangre de la vena central de la oreja y se colectan en un tubo estéril que contiene una solución de citrato de sodio al 10%. Se centrifuga la muestra inicialmente a 100 g por 10 minutos se desecha la fracción eritrocitaria y la fracción leucocitaria se pasa a un nuevo tubo estéril. Este nuevo tubo se centrifuga nuevamente a 400 g por 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y el precipitado final será el producto para utilizar (Imagen 4).

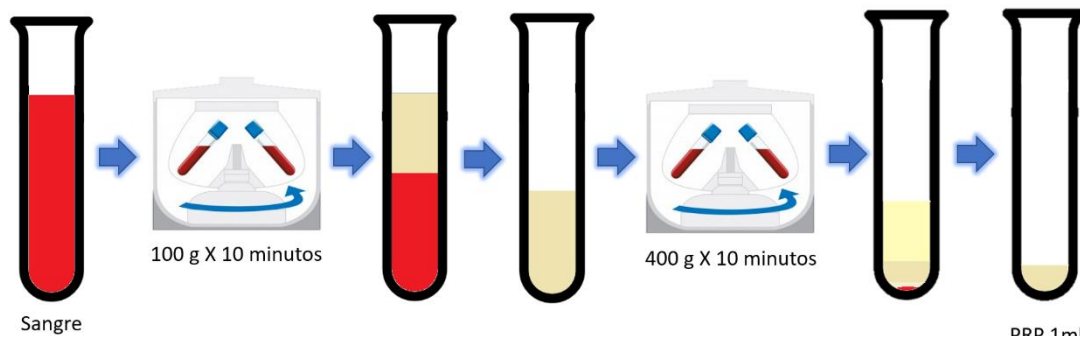
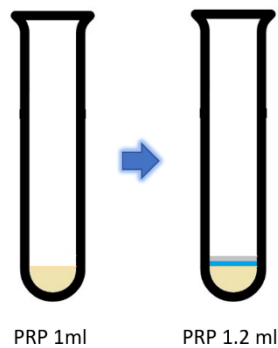


Imagen 4. Preparación del plasma rico en plaquetas (PRP).

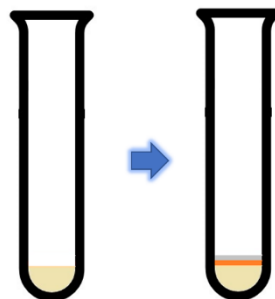
Posteriormente se realiza un recuento plaquetario tanto del conejo como del plasma rico en plaquetas (PRP) de cada espécimen.

Ahora se toma 1cc de PRP preparado, se adiciona 0.1cc de medio de cultivo DMEM y se activa con 0.1cc de cloruro de calcio al 10% (Imagen 5).



*Imagen 5. Activación del plasma rico en plaquetas (PRP).*

Para la preparación del PRP suplementado con AD-MS-CM se repite el proceso, se toma 1cc de PRP preparado, se adiciona 0.1 cc de medio condicionado y se activa con 0.1cc de cloruro de calcio al 10% (Imagen 6).



*Imagen 6. Activación del plasma rico en plaquetas (PRP) suplementado con los medios condicionados (AD-MS-CM).*

### **1.17.2 Obtención y preparación de medios condicionados de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.**

Para la obtención de los AD-MS-CM, se hará uso de los medios ya disponibles en el almacén biológico del laboratorio del departamento de fisiología de la facultad de medicina



de la Universidad Nacional de Colombia, preparados de acuerdo con los protocolos adoptados por el grupo de investigación Biología en Células Madre de la Universidad Nacional de Colombia (11,60) los cuales corresponden a medios preparados a partir de células de tejido adiposo humanas obtenidas de un donante. Brevemente Las AD-MSC fueron aisladas de tejido adiposo extraído de 3 madres donantes voluntarias sometidas a parto por cesárea. Se cultivaron hasta un 70% de confluencia, se lavaron y nuevamente se cultivaron por 24 horas. Después de 24 horas se recolectaron los medios condicionados se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante, se realizó posteriormente un análisis de los factores de crecimiento detectados (12) (Imagen 7).

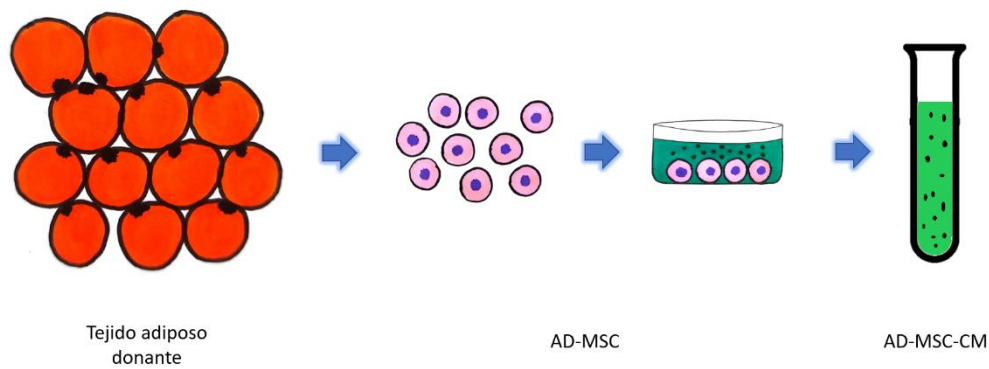


Imagen 7. Obtención de los medios condicionados (AD-MSC-CM).

### 1.17.3 Procedimiento quirúrgico

Bajo anestesia general se rasura la extremidad inferior derecha, se realiza asepsia y antisepsia, se efectúa una artrotomía de la rodilla mediante un abordaje parapatelar medial, se luxa la patela lateralmente exponiendo la superficie articular de los cóndilos femorales. En el grupo sham se ejecuta únicamente la artrotomía, sin realizarse la lesión osteocondral.

En los grupos subsiguientes se genera un defecto osteocondral cilíndrico de espesor completo en el surco troclear con una trefina de 5mm de diámetro y a una profundidad de 3 mm, un segundo defecto de similares características se realiza en el cóndilo femoral medial. Una vez ejecutado esto, se lava la articulación con solución salina estéril.

Tanto el PRP solo, como el PRP suplementado con medios condicionados se preparan simultáneamente al procedimiento quirúrgico. Se efectúa el cierre de la herida por planos. Se cubre las heridas con vendaje y gasas estériles.

Los conejos se dejan con antibiótico endovenoso por 3 días consecutivos. No se realiza ningún tipo de inmovilización rígida y se les permite moverse libremente en sus jaulas. Se realiza un monitoreo del estado de cicatrización durante la primera semana. Si lo ameritan curaciones con yodopovidona o clorhexidina.

#### **1.17.4 Estandarización del método de administración del tratamiento**

Al no existir modelos experimentales similares, en la fase piloto se contemplan dos conejos con supervivencia para estandarizar el método de aplicación del tratamiento. En cada caso, de 5ml de sangre, se obtienen 1cc de PRP aproximadamente.

En el grupo piloto, el conejo denominado G2 se administra el PRP activado, es decir se toma 1cc de PRP preparado, se adiciona 0.1cc de medio de cultivo DMEM y se activa con 0.1cc de cloruro de calcio al 1%. Una vez realizado esto, inmediatamente se administra el tratamiento contenido en una jeringa de 1cc, con un volumen total aproximado de 1.2cc. Lo anterior con la rodilla cerrada por planos, se administrará el volumen total a manera de infiltración en la rodilla, de esta forma se espera que se forme un coagulo homogéneo intraarticular que se distribuye por la rodilla (Imagen 8).



*Imagen 8. Infiltración del plasma rico en plaquetas (PRP).*

En el grupo piloto, el conejo denominado G3 se administra el tratamiento con el PRP ya activado de manera que se espera obtener un producto final con una parte en fase líquida

y otra parte en forma de coagulo. Es decir, se toma 1cc de PRP preparado, se adiciona 0.1cc de AD-MS-CM y se activa con 0.1cc de cloruro de calcio al 1%. Se permite la formación del coagulo durante 20 minutos lo que permite manipular el PRP y administrarlo directamente en el defecto osteocondral creado, se cierra la rodilla por planos tal como se menciona en el apartado del procedimiento quirúrgico y finalmente se administra a manera de infiltración el restante liquido del preparado final como para el primer conejo (Imagen 9).

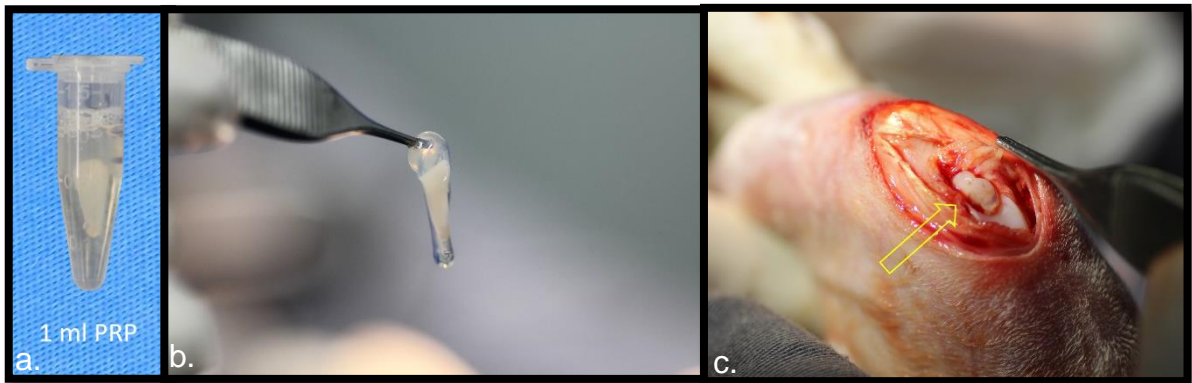


Imagen 9. Implante de plasma rico en plaquetas (PRP). a. 1ml de PRP. b. Coagulo de PRP listo para ser implantado. c. Coagulo de PRP implantado en el defecto osteocondral (DO).

## 1.17.5 Análisis patológico

### Análisis macroscópico

Una vez estandarizada la técnica quirúrgica y el método de administración del tratamiento, se repite el proceso en los 20 conejos restantes. Después de 12 semanas del momento quirúrgico se sacrifican todos los conejos con una sobredosis de sedación, y se extrae quirúrgicamente el fémur distal tomando los últimos 3 cm por encima de los cóndilos. Dos evaluadores patólogos de forma cegada determinan el grado de regeneración condral según el puntaje macroscópico de la sociedad internacional de reparación de cartílago (ICRS) (61). Para cada categoría de este se puntúa de 0 a 3 con un puntaje total perfecto de 12 (Tabla 1). Para determinar la confiabilidad de esta evaluación se realiza una asignación cegada y se procede a un análisis de correlación Inter observador y se deja un registro fotográfico de las lesiones.

*Tabla 1 International Cartilage Repair Society (ICRS) macroscopic evaluation of cartilage repair. Tomado de van den Borne. 2007.p 1398.*

<b>Categories</b>	<b>Scores</b>
<b>Degree of defect repair</b>	
In level with surrounding cartilage	4
75% repair of defect depth	3
50% repair of defect depth	2
25% repair of defect depth	1
No repair of defect depth	0
<b>Integration to border zone</b>	
Complete integration with surrounding cartilage	4
Demarcating border-1 mm	3
Three-quarters of graft integrated, one-quarter with a notable border-1 mm in width	2
One-half of graft integrated with surrounding cartilage, one-half with a notable border-1 mm	1
From no contact to one-quarter of graft integrated with surrounding cartilage	0
<b>Macroscopic appearance</b>	
Intact smooth surface	4
Fibrillated surface	3
Small, scattered fissures or cracks	2
Several small or few large fissures	1
Total degeneration of grafted area	0
<b>Overall repair assessment</b>	
Grade I: normal	12
Grade II: nearly normal	8-11
Grade III: abnormal	4-7
Grade IV: severely abnormal	1-3

### **Análisis microscópico**

El protocolo de preparación de los especímenes y tinción de estos se efectúa de acuerdo con las pautas recomendadas por la sociedad internacional para reparación del cartílago (ICRS) (62), para valoración histológica para estudios de reparación de cartílago en modelos animales y ensayos clínicos.

Los fémures, sin tejidos blandos asociados, se fijan con solución al 10% de formaldehído durante 4 días, a continuación, se decalcifican en una solución de ácido clorhídrico 0.5 normal a 4°C durante 10 días. El proceso de decalcificación se verifica perforando el hueso subcondral usando una aguja calibre 26. Una vez decalcificados, se extraen del defecto reparado dos muestras de menos de 0,5 cm de grosor, las cuales se toman en distintos

niveles debido a la heterogeneidad del tejido reparado; posteriormente se criopreservan las muestras. De cada tejido se realiza tinción con hematoxilina y eosina, azul de toluidina así como inmunohistoquímica para colágeno tipo I (anticuerpo monoclonal I-8H5) y colágeno tipo II (anticuerpo monoclonal II-II6B3).

De las muestras teñidas con hematoxilina y eosina se evalúa la estructura general del tejido y la celularidad haciendo uso de microscopio de luz. Con microscopio de luz polarizada se determina la distribución de las fibras de colágeno.

De las muestras teñidas con Azul de toluidina se determina la presencia de glucosaminoglucanos sulfatados (tinción púrpura) y la presencia de matriz colágena (tinción azul).

La evaluación de la regeneración se lleva a cabo por dos evaluadores cegados según los 14 criterios histológicos contemplados en el nuevo sistema de puntaje histológico de la sociedad internacional para reparación de cartílago (ICRS-II por sus siglas en inglés) (63). Cada criterio histológico es evaluado de acuerdo con la escala visual análoga graduada de 0 a 100; asignándose 100 para las muestras que cumplan las características histológicas definidas para regeneración condral y 0 para la ausencia de regeneración condral (Tabla 2).

*Tabla 2 International Cartilage Repair Society (ICRS) II Parameters. Tomado de Mainil. 2010.p 883*

<b>Histological Parameter</b>	<b>Score</b>
1. Tissue morphology (viewed under polarized light).	0%: Full-thickness collagen fibers. 100%: Normal cartilage birefringence.
2. Matrix staining (metachromasia).	0%: No staining. 100%: Full metachromasia.
3. Cell morphology.	0%: No round/oval cells. 100%: Mostly round/oval cells.
4. Chondrocyte clustering (4 or more grouped cells).	0%: Present. 100%: Absent.
5. Surface architecture.	0%: Delamination, or major irregularity. 100%: Smooth surface.
6. Basal integration.	0%: No integration. 100%: Complete integration.
7. Formation of a tidemark.	0%: No calcification front. 100%: Tidemark.

*Tabla 2 (Continuación) International Cartilage Repair Society (ICRS) II Parameters. Tomado de Mainil. 2010.p 883*

<b>Histological Parameter</b>	<b>Score</b>
8. Subchondral bone abnormalities/marrow fibrosis.	0%: Abnormal. 100%: Normal marrow.
9. Inflammation.	0%: Present. 100%: Absent.
10. Abnormal calcification/ossification.	0%: Present. 100%: Absent.
11. Vascularization (within the repaired tissue).	0%: Present. 100%: Absent.
12. Surface/superficial assessment.	0%: Total loss or complete disruption. 100%: Resembles intact articular cartilage.
13. Mid/deep zone assessment.	0%: Fibrous tissue. 100%: Normal hyaline cartilage.
14. Overall assessment.	0%: Bad (fibrous tissue). 100%: Good (hyaline cartilage).

Para establecer el grado de diferenciación hacia cartílago hialino mediante inmunohistoquímica se toma como marcador la presencia de colágeno tipo II en la muestra evaluada. La presencia de colágeno tipo I y II como marcador de fibrocartílago y la presencia de colágeno tipo I como marcador de tejido fibroso. De forma aleatoria se seleccionan 5 campos a una magnificación microscópica de 200 x y se determina la presencia o no de la reacción fluorescente para cada caso.

En todos los casos se realiza un consenso por parte de los evaluadores cuando existen discrepancias dadas por una diferencia mayor a 30% en los puntajes asignados a cada muestra, con el fin de aumentar la objetividad del estudio. Para el análisis estadístico, los datos de los evaluadores son promediados.

### **1.17.6 Análisis de resultados**

#### **Fase piloto**

Con el fin de estandarizar el modelo propuesto se establece un análisis preliminar en este subgrupo con las siguientes variables:

- Estandarización de la técnica quirúrgica en especímenes cadavéricos.
- Estandarización del método de administración del tratamiento con PRP y PRPR suplementado con AD-MS-CM.
- Descripción de complicaciones en herida al día 2 y al día 7 (presente o ausente).
- Dolor, malestar y angustia (Primeras 72 horas postoperatorio). Esta se realizó mediante escalas estandarizadas y aplicadas por personal veterinario del Bioterio de la Universidad Javeriana (Anexo 1).
- Criterios de punto final. Se aplica esta escala siguiendo la escala de dolor, malestar y angustia, si el animal presenta un puntaje mayor a 4 se realiza la eutanasia de este. Escala estandarizada y aplicada por personal veterinario del CICUA de la Universidad Javeriana (Anexo 2).
- Evaluación del tratamiento aplicado: a los siete días se hace una descripción macroscópica de lo observado en el líquido articular y en la superficie articular del fémur.

### **Variables de desenlace**

Las dos variables de desenlace principal son la formación de una cicatriz de cartílago en el área de defecto articular y la caracterización a cartílago hialino.

- Regeneración condral según el puntaje macroscópico de la sociedad internacional de reparación de cartílago (ICRS): Escala de 0 a 12, siendo el 12 puntuación más alta en términos de reparación del cartílago que evalúa el porcentaje de reparación del defecto, la integración de este a la zona del borde del defecto y su apariencia macroscópica.
- Regeneración condral según los 14 criterios histológicos contemplados en el nuevo sistema de puntaje histológico de la sociedad internacional de reparación de cartílago (ICRS-II): Escala de 0 a 100, siendo 100 la puntuación más alta en términos de reparación del cartílago.
- Diferenciación del tipo de cartílago según la relación del número promedio de células positivas por campo óptico tanto para la tinción de colágeno tipo I, como para colágeno tipo II: predominio de colágeno tipo II para cartílago hialino, colágeno tipo I y II para fibrocartílago y colágeno tipo I como marcador de tejido fibroso.

### **Variables de control**

- Recuento plaquetario según el número de plaquetas por microlitro en sangre venosa periférica del animal y conteo plaquetario en el PRP de cada animal.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico, los datos de los evaluadores son promediados y expresados como la media y su respectiva desviación estándar. La varianza de los resultados se realiza según la prueba de ANOVA, se analiza registrando los datos en el software EXCEL® (Microsoft 365®). Se considera un valor de P estadísticamente significativo  $< 0.05$ .

## **1.18 Aspectos éticos**

Este estudio se ciñe a los lineamientos de la normativa nacional dispuestos en la Ley No. 84 de 1989: "Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia", particularmente el Capítulo Sexto: *Del Uso de Animales Vivos en Experimentos e Investigación* (64). De igual forma siguiendo la normativa dispuesta en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud donde resuelve en el título V la investigación biomédica con animales (65).

El presente trabajo, fue avalado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, y se lleva a cabo en el bioterio de la Universidad Javeriana, en donde fue sometido a un segundo Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales bajo el Formato de Uso de Animales de laboratorio (CICUA) con Formato de Uso de Animales (FUA) No. 118-21 con el fin de asegurar el mínimo sufrimiento animal. El bioterio cuenta con los servicios de quirófano, cuidado y evaluación postoperatoria de los conejos durante la duración del estudio a fin de optimizar al máximo la comodidad y cuidado de los animales mientras dura el estudio. Así mismo se establecen los criterios de punto final.

No existen conflictos de interés.

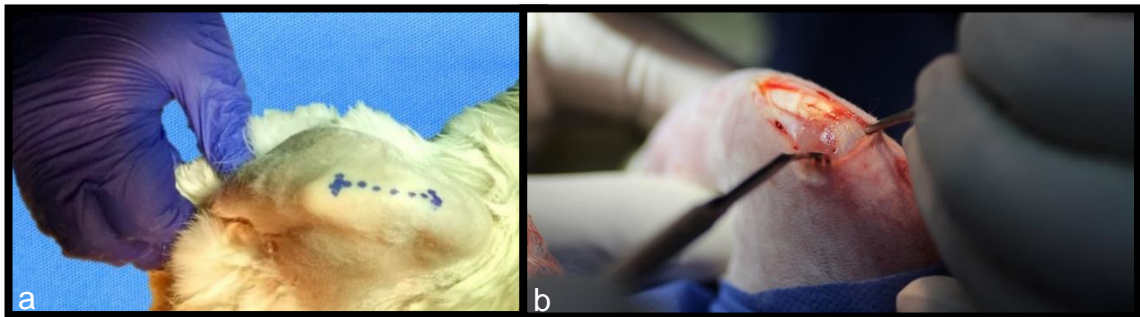


## Resultados

### 1.19 Fase Piloto.

#### 1.19.1 Estandarización de la técnica quirúrgica

Esta se ejecutó en los especímenes cadavéricos. Tal como se estableció en la metodología, se produjo una incisión sobre la línea media de la rodilla determinando un tamaño entre 3 y 3.5 cm que permite exponer adecuadamente el mecanismo extensor (Imagen 10).



*Imagen 10. Incisión. a. Diseño de Incisión sobre la línea media de la rodilla. b. Exposición del tendón patelar.*

La artrotomía se definió con un abordaje parapatelar medial desde la unión miotendinosa del vasto medial siguiendo el borde medial del tendón patelar hasta su inserción en la tibia (Imagen 11).



*Imagen 12. Abordaje parapatelar medial.*

La luxación lateral de la patela permite exponer adecuadamente los cóndilos femorales y la escotadura cuando se realiza una flexión completa de la rodilla (Imagen 12).



*Imagen 11. Luxación lateral de la patela y exposición de los cóndilos femorales.*

Se determinó que 2 lesiones osteocondrales de 5mm de diámetro son muy grandes para el tamaño promedio de la superficie articular del fémur del conejo en el tipo de población escogida tal como se muestra en la imagen 13 donde se observa una fractura del cóndilo femoral lateral.



Imagen 13. Especímenes cadavéricos. a. Superficie articular de los cóndilos femorales. b. La imagen muestra un defecto osteocondral (DO) de 5mm de diámetro, la pinza señala una fractura del cóndilo femoral lateral.

Por lo tanto, se redujo el tamaño de la lesión a 4mm de diámetro con una profundidad de 3mm para asegurar el compromiso del hueso subcondral (imagen 14).

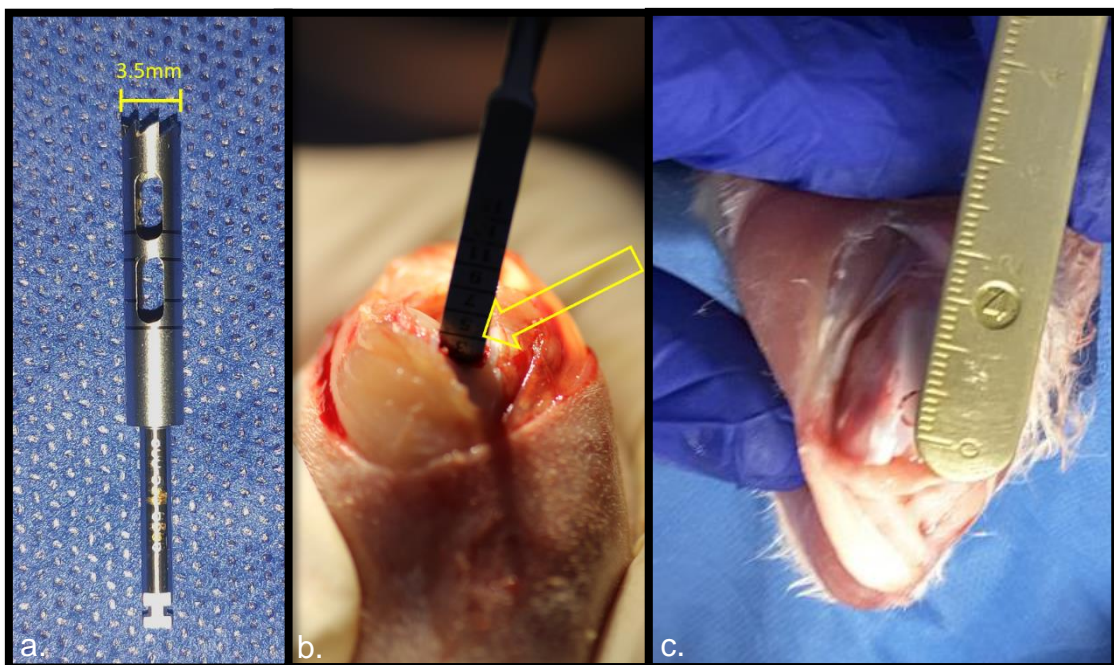
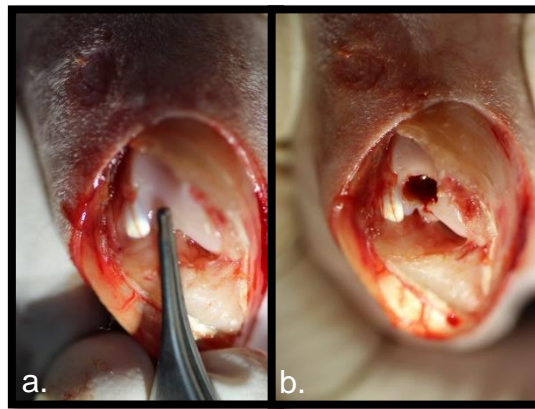


Imagen 14. Creación del defecto osteocondral (DO). a. Trefina de 3.5 mm de diámetro para realizar los DO. b. Defecto de 3mm de profundidad. c. Defecto de 4mm de diámetro.

Se evidenció además que al escoger el cóndilo femoral lateral como sitio para la artrotomía había una inestabilidad biomecánica en valgo, en tal sentido, en los ensayos subsiguientes

se eliminó esta zona para realizar el DO y se escogió únicamente el surco troclear como sitio para formalizar el DO.

Dado que el defecto creado queda en el trayecto en el que discurre la patela, pudimos observar un bloqueo en la flexoextensión de la rodilla con un resalto debido a que la patela se bloqueaba en el defecto osteocondral creado; así que se estandariza la posición de este justo al lado de la inserción del tendón del extensor digitorum longus, lo que posiciona el defecto hacia la escotadura intercondílea permitiendo dejar el defecto en una superficie cartilaginosa (Imagen 15).



*Imagen 15. Localización del defecto osteocondral (DO). A. La pinza muestra el lugar de la perforación medial al tendón del extensor digitorum longus. B. DO creado*

### **1.19.2 Presencia de signos inflamatorios locales o dehiscencia en la herida.**

Se revisaron las heridas a los dos días y siete días postoperatorio en los dos conejos con supervivencia, sin evidencia de signos inflamatorios locales ni dehiscencia (Imagen 16).

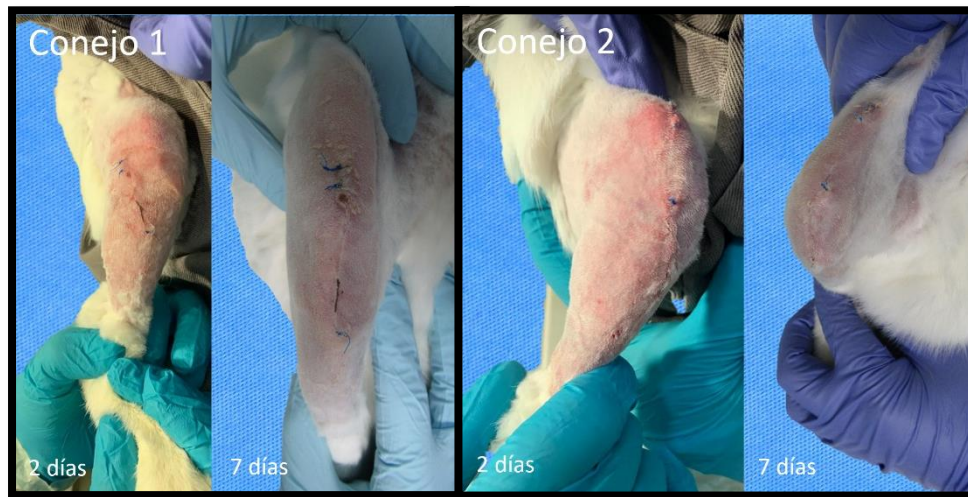


Imagen 16. Evolución de la cicatrización de la herida. (Día del procedimiento: Día 0).

### 1.19.3 Dolor, malestar y angustia

Estos aspectos se evaluaron los primeros 3 días del postoperatorio y al día 5, y se observó que como única condición asociada al dolor o malestar era una marcha con cojera y pérdida de la tendencia a correr en los dos conejos (PRP y PRP + AD-MS-CM). El conejo tratado con PRP mostraba una disminución en la tendencia a morder (Ver anexo 1).

### 1.19.4 Criterios de punto final

No se evidenciaron durante el seguimiento signos clínicos que indiquen la necesidad de realizar eutanasia en ningún conejo (Ver anexo 2).

### 1.19.5 Evaluación del tratamiento aplicado

**Conejo tratado con PRP (G2):** al día 7 de administrado el tratamiento se realizó la eutanasia del animal y se realiza la artrotomía de la rodilla por la misma vía de abordaje previo observándose completamente la articulación.



Se observa un líquido articular cetrino con un aumento en la viscosidad de aproximadamente 0.5cc. En la superficie articular del fémur se ve el defecto osteocondral con un coagulo hemático, sin embargo, no hay cambios estructurales macroscópicos (Imagen 17).

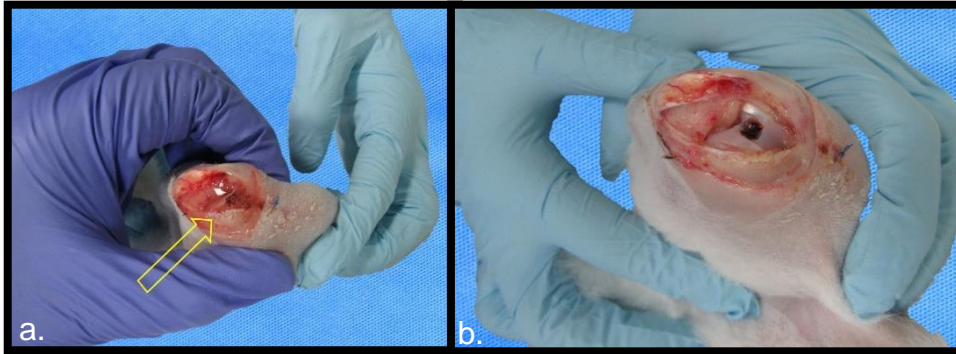


Imagen 17. Evaluación del tratamiento aplicado (PRP). a. Tratamiento contenido intraarticular. b. Defecto osteocondral (DO) sin cambios al día 7 (Día del procedimiento: día 0).

**Conejo tratado con PRP suplementado con AD-MSC-CM (G3):** al día 7 de administrado el tratamiento se ejecutó la eutanasia del animal y se lleva a cabo la artrotomía de la rodilla por la misma vía de abordaje previo observándose completamente la articulación.

Se identifica un líquido articular cetrino con aumento en la viscosidad del cual se obtienen aproximadamente 0.2cc. En la superficie articular del fémur se distingue el defecto osteocondral creado con la formación de un tejido blanquecino brillante, de consistencia elástica en continuidad con el borde del defecto en el cartílago articular rellenando aproximadamente un 60% del total del defecto, al retirarse, este tejido midió 4mm de diámetro y 1 mm de ancho (Imagen 18).

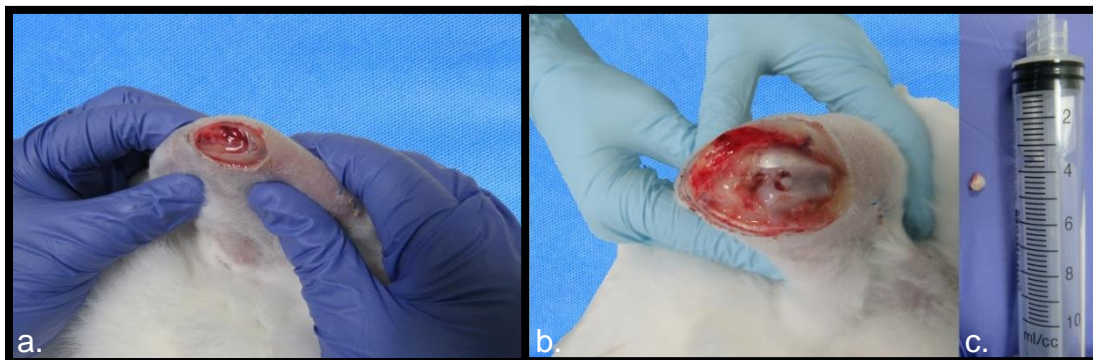


Imagen 18. Evaluación del tratamiento aplicado (PRP + AD-MSC-CM). a. Tratamiento contenido intraarticular. b. defecto osteocondral (DO) con cambios morfológicos al día 7 mostrando cicatrización (Día del procedimiento: Día 0). c. Tejido tomado del DO.

## Discusión

La pérdida del cartílago articular en el ser humano por trauma o de tipo degenerativo (OA) es una condición bastante común, y existen múltiples tratamientos que intentan reducir el dolor, mejorar la función y hasta recuperar el cartílago articular (7,27), sin embargo, el hecho que existan múltiples tratamientos indica que posiblemente ninguno de estos ha logrado ser el ideal para manejar este tipo de lesiones. Por esta razón el desarrollo de técnicas novedosas y la optimización de las técnicas actuales deben enfocarse en la investigación desde las ciencias básicas para poderse aplicar posteriormente en ensayos clínicos.

El presente documento muestra resultados preliminares de la fase piloto, la cual busca estandarizar el modelo de DO en conejos y el tratamiento propuesto con el fin de evaluar a posteriori la capacidad condrogénica del PRP y del PRP suplementado AD-MS-CM.

### **1.20 El conejo como modelo de defecto osteocondral en rodilla**

Han sido diversos los modelos animales utilizados para el estudio de DO (26). El modelo propuesto en conejos es uno de los modelos animales más utilizados, dado que tienen un tamaño articular en la rodilla más grande que los roedores pequeños, las propiedades subcondrales de la tróclea articular son similares al cóndilo femoral medial del humano, y no tienen la limitante de los altos costos de mantenimiento y manejo que tienen los animales más grandes. La limitante de estos es su pequeño tamaño en la articulación.

Desde el punto de vista morfológico, una desventaja de este modelo es el delgado espesor del cartílago articular, con un promedio de 0.44  $\pm$  0.08 mm para el surco troclear y 0.3  $\pm$  0.07 mm para el cóndilo femoral medial. También la diferencia en la biomecánica articular con el humano, ya que al evaluarse el patrón de marcha se identifica que debido a la gran

variedad de patrones de aterrizaje durante el salto hay un aumento de las fuerzas en la articulación tibio femoral lateral con un promedio de 303.8% del peso, mientras que en la medial un 262.3%. Además, las rodillas del conejo están principalmente en flexión, a diferencia de las del humano que está principalmente bloqueada en extensión (66).

Está documentado que el conejo exhibe una mayor capacidad de cicatrización espontánea intrínseca en el cartílago, esto probablemente porque los conejos tienen una tasa metabólica alta, y se ha visto que tienen una densidad mayor de células madre pluripotenciales cerca al cartílago articular al compararse con otras especies de mayor tamaño. Se ha estimado que la densidad celular del cóndilo femoral medial humano es de aproximadamente 1.7%, mientras que en el conejo adulto es de 12.2%, lo que indica una menor probabilidad de reparación en el cartílago hialino en el humano (67).

Pese a todo, los conejos son una herramienta muy útil para la evaluación del principio a investigar, permiten evaluar la seguridad del tratamiento y otras variables como degradación, biocompatibilidad, interacción con los tejidos antes de pasar a animales más grandes o estudios clínicos. Animales grandes tienen inconvenientes de costos, mayor duración de los estudios y hasta permisos éticos.

## **1.21 Determinación del tamaño y ubicación del defecto osteocondral**

El tamaño crítico del defecto osteocondral indica el tamaño más pequeño (en diámetro) en el que el animal no puede repararlo espontáneamente. Dentro de los protocolos estudiados, observamos que en aquellos estudios en los que se utiliza como modelo la rodilla del conejo, se establece como tamaño crítico del defecto 3mm, no obstante, se ha puesto en duda este tamaño pues se ha reportado cicatrización espontánea, por tanto, se aconsejan diámetros de 4 a 5 mm (66). Durante los ensayos pudimos ver que defectos de 5mm generaban fracturas de los cóndilos, así pues, para nuestro modelo definimos un defecto de un tamaño de 4mm de diámetro y 3 mm de profundidad.

El tamaño del defecto tiene implicaciones en la capacidad condrogénica del tratamiento como lo demuestra Higa et al., en donde utilizaron un gel compuesto por ácido poli (2-



acrilamido-2-metilpropano sulfónico) (PAMPS) y poli (N,N'-dimetil acrilamida) (PDMAAm) en DO de 2.5 mm, 4.3mm y 5.8 mm de diámetro, ellos encontraron en todos los casos regeneración de cartílago con respecto al control, sin embargo la formación de este era más rápida en los defectos más pequeños en todos los casos (68).

En nuestro ensayo se pudo ver que dos defectos osteocondrales en la misma rodilla podrían resultar demasiado mórbidos para la rodilla, de igual manera el tamaño y profundidad de este, un defecto demasiado grande podría alterar la mecánica normal de la rodilla, así mismo la ubicación de este, dando lugar a una mayor limitación funcional pudiendo afectar el desenlace postoperatorio. Por otro lado, teniendo en cuenta el tamaño de los cóndilos femorales, no escogimos estos como sitio para generar el defecto pues el tamaño escogido (4mm) daba lugar a una alteración de la mecánica de la rodilla durante la flexoextensión que podría interferir con la rehabilitación. Esto dejó como opción la realización del defecto en el surco troclear, inicialmente propuesta en la mitad de este, sin embargo notamos que la patela se bloqueaba en el defecto ocasionando un resalto durante la excursión patelar con la flexoextensión de la rodilla, por consiguiente definimos que la localización del defecto que menos influía en la excursión patelar, era al lado de la inserción del tendón del extensor digitorum longus, esta ubicación permite dejar el defecto posterior en el surco y sobre una superficie con un adecuado recubrimiento de cartílago.

## 1.22 Estandarización de la administración del tratamiento

En medicina regenerativa, sin importar el método que se escoja para la regeneración condral, uno de los grandes problemas para tener en cuenta es el método de aplicación del tratamiento, pues debe asegurarse que el tratamiento cumpla su actividad terapéutica, que este permanezca en el área a tratar durante el tiempo suficiente y que no intervenga en la funcionalidad de la articulación o que su potencial terapéutico no se afecte por la funcionalidad de esta. El reto se encuentra en asegurar la máxima eficacia y predictibilidad al tiempo que se reducen los riesgos de presentar efectos adversos.

Con el objetivo de entregar localmente ya sean células o factores de crecimiento se han ideado múltiples técnicas como por ejemplo sistemas de andamiaje sintéticos o híbridos los cuales se basan en carbohidratos como por ejemplo (alginato, quitosano, ácido polilactico/ poliglicólico, agarosa y ácido hialurónico). Estos andamiajes, aunque no tienen una actividad biológica importante, tienen como objetivo simular a estructura y función del

tejido nativo, permitir la proliferación celular y mostrar unas propiedades mecánicas similares al cartílago hialino nativo (69).

Teniendo en cuenta esta ventaja estructural que ofrecen estos andamiajes, se han realizado ensayos en los que han podido explotarse estas características. Un estudio in vitro realizado por Yin et al. (70), con geles de agarosa enriquecido con PRP cultivados con condrocitos porcinos encontró a la microscopia electrónica una estructura uniforme, porosa con una supervivencia del 100% de los condrocitos a los 28 días del cultivo, además con una mayor adherencia de los condrocitos en el ensayo con PRP que el control con el andamiaje en agarosa puro. Zhang et al. (71), desarrollaron un andamiaje en PLGA a manera de una bicapa para semejar la estructura del cartílago y el hueso subcondral para ser implantados en DO en conejos y realizaron ensayos con un grupo control, un grupo únicamente con el PLGA y otro con PLGA + PRP activado y encontraron unos puntajes mayores en la apariencia microscópica e histológica del grupo tratado con el andamiaje de PLGA y el PRP demostrando que el PRP mejoraba la reconstrucción de los DO en conejos. En un ensayo in vitro realizado por Li et al. (72) aprovechan otro biopolímero susceptible de manejarse con la tecnología de impresión en 3D, ellos incorporaron PRP en diferentes concentraciones (12.5%, 25%, y 50%) a andamiajes construidos en fibroína de seda para determinar la tasa de regeneración de cartílago cultivado de la superficie articular de fémur de conejo, determinaron que los andamiajes construidos poseían buenas propiedades biomecánicas, una tasa de degradación aceptable y mostraron una adecuada proliferación de los condrocitos en aquel grupo que se trató con 50% de PRP que en aquellos con los andamiajes de fibroína solo. Una revisión sistemática de 14 estudios (73) en animales nivel III y IV acerca de la evaluación del PRP como coadyuvante en regeneración condral en andamiajes o implantes sintéticos, 10 de estos reportaron efectos positivos, 2 mostraron efectos negativos y 2 mostraron que no había cambios o la diferencia no era significativa al compararse con otros tratamientos, sin embargo, los métodos de preparación de PRP eran diferentes entre los estudios y una comparación entre estos no era posible.

Estos andamiajes han demostrado ser de utilidad en la entrega de otras fuentes de factores de crecimiento como es el caso de las MSC (29). Beigi et al. (74), utilizaron un andamiaje tridimensional en alginato suplementado con PRP y AD-MSK para reparación de cartílago

articular. In vitro las AD-MSK pudieron diferenciarse hacia cartílago maduro evaluado por la expresión de marcadores específicos de cartílago. In vivo en un modelo de DO en ratón a las 8 semanas, los conejos tratados con el andamiaje en alginato con PRP y AD-MSK mostraban condrocitos funcionales con una matriz inmadura y, a las 16 semanas mostraban una matriz de cartílago hialino homogénea e integrada con el tejido nativo, los andamiajes solos formaron fibrocartílago y el control (sin tratamiento) no generó un cartílago continuo. Otros autores han ido más allá tratando de adicionar al tratamiento la rehabilitación mostrando resultados aun mejores (30).

Otro tipo de andamiajes son los que podrían llamarse biológicos, su estructura permite cierto grado de manipulación, permiten entregar factores de crecimiento directamente, sin embargo, estructuralmente no exhiben unas características que sean similares al tejido nativo. Ejemplos de estos son el PRP, la fibrina rica en plaquetas (PRF), los agregados de gránulos plaquetarios y los coágulos inducidos en el sitio directamente.

En el PRP la polimerización del fibrinógeno en fibrina, le permite adquirir esa estructura semirrígida. El efecto biológico estará determinado por la identidad del factor de crecimiento, concentración, duración y la presencia de otras moléculas como por ejemplo PDGF. Estas características le permiten producir un andamiaje tridimensional autólogo. La liberación de los factores de crecimiento dependerá de varios factores, por ejemplo, la tasa de liberación de los gránulos plaquetarios, la mecánica difusora de los factores de crecimiento a través de la red de fibrina, las propiedades mecánicas de la red en sí misma y la tasa de degradación de esta para la liberación de los factores. La naturaleza adhesiva del PRP además facilita la manipulación y la aplicación a biomateriales dentro de los que se han estudiado materiales, orgánicos, inorgánicos e híbridos (75).

En nuestro ensayo, pudimos darnos cuenta de que aparentemente el PRP aplicado de forma infiltrativa continuaba intraarticular en la rodilla a los 7 días, no obstante, este tenía una consistencia líquida viscosa. Mientras tanto el PRP que se administró en el defecto creado con los medios condicionados en forma de coágulo aparentemente había cambiado su composición en el defecto, mostrando el inicio de una cicatriz.

Teniendo presente el comportamiento que exhibe el coágulo de fibrina obtenido en nuestro ensayo, determinamos como mejor vía de administración del tratamiento la manipulación del coágulo para el implante directo en el DO y, la porción en fase líquida del preparado administrarla de forma infiltrativa con la rodilla cerrada, ya que observamos una adecuada

---

contención del coagulo en el defecto. Slimi et al. (76), realizaron un ensayo con 24 rodillas de conejo, 12 manejadas con PRP en forma de coagulo y 12 sin tratamiento, se comparó su capacidad condrogénica en defectos osteocondrales a las 3 y 12 semanas observándose tejido reparado con cartílago hialino en el grupo tratado con PRP, mientras que se formó fibrocartílago en el grupo sin tratamiento, estos resultados se evaluaron macroscópicamente y mediante resonancia observándose las superficies reparadas.

La preparación de los coágulos de PRP como andamiajes en defectos osteocondrales se ha diseñado también para humanos como lo muestra Vinod et al. (77); este estudio es un ensayo in vitro que determinó que el PRP podría ser una estructura de andamiaje con bioactividad sinérgica en proliferación celular, viabilidad celular y producción de matriz extracelular. Ellos tomaron muestras de cartílago de rodillas con osteoartrosis de 3 voluntarios humanos que se sometieron a reemplazo de rodilla, se aislaron, cultivaron y expandieron células condroprogenitoras. Luego de otros tres voluntarios humanos tomaron PRP y lo activaron formando un gel el cual se cocultivo con las células condroprogenitoras de cartílago, estos cocultivos lograron ser capaces de mostrar diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica bajo cada estímulo de cultivo y aquellas que mostraron diferenciación condrogénica lograron además producir matriz extracelular y mantuvieron su viabilidad durante el tiempo que se cultivaron.

### **1.23 PRP como sistema de andamiaje para administración de factores de crecimiento**

Una de las aplicaciones más frecuentes para los factores de crecimiento que liberan las MSC. En el presente estudio planteamos una matriz de PRP usada como vehículo sinérgico que pueda entregar los factores de crecimiento presentes en los AD-MS-CM.

Se observa que, a los siete días postoperatorio, el DO del conejo que se trató con PRP infiltrado no presentaba ningún tipo de cambio morfológico grande, sin embargo, el tratamiento aparentemente parecía seguir contenido intraarticular como se mencionó anteriormente.

Por otro lado, el DO del conejo tratado con PRP en forma de coágulo suplementado con los AD-MS-CM mostraba cambios en su composición, pues a los 7 días de su administración mostraba características de cicatrización en el defecto creado rellenando parcialmente el mismo con un tejido blanquecino brillante, de consistencia elástica en continuidad con el borde del defecto en el cartílago articular. Al tratarse de la fase piloto del estudio, no realizamos una caracterización histopatológica de este tejido, sin embargo, en la siguiente fase se plantea una caracterización morfológica macroscópica y microscópica.

Esto nos induce a pensar que probablemente el PRP sirva no solo como un sistema de andamiaje biológico y vehículo de entrega de factores de crecimiento, sino que también podría estar actuando de forma sinérgica con el AD-MS-CM al mostrar un grado más avanzado de cicatrización.

En otros ensayos con PRP diseñado como vehículo de entrega de factores de crecimiento, Berninger et al. (78), desarrollaron un protocolo en conejos para realizar implante de células BM-MS-C en coágulos de fibrina capaces de diseñarse del mismo tamaño que el DO dejado de tal manera que puede implantarse sin dejar hendiduras entre el implante y el tejido que lo rodea. A las 12 semanas notaron una cicatrización con un tejido suficientemente rígido y de una superficie homogénea al tejido alrededor de este. De forma similar, Lee et al. (48) trataron DO de conejo con SD-MS-C en un gel de PRP activado y lo compararon con el PRP solo y el grupo control, encontraron que a las 24 semanas existía un tejido fibroso en el grupo control, mientras que en los otros dos grupos se repararon con cartílago hialino, no obstante, la regeneración del tejido fue incompleta en el grupo tratado únicamente con PRP. Recientemente otros autores (79) encontraron en el flujo menstrual una fuente significativa de MS-C sanguíneas de tal forma que las asilaron y las aplicaron en conjunto con un coágulo de PRP activado y lo compararon con PRP solo y con el control sin tratamiento; a las 12 semanas identificaron que el grupo tratado con PRP + MS-C rellenaban el defecto con cartílago hialino con una adecuada integración cuando se comparaban con los otros grupos, sin embargo, no hubo diferencias a las 24 semanas.

Una revisión sistemática de 17 artículos realizada por Chona et al. (80), sugiere que el PRP y los concentrados de médula ósea pueden mejorar los resultados del manejo de los DO de la rodilla cuando se manejan con un andamiaje, aunque son diversas las formas en las que se utilizan estas aumentaciones biológicas, por lo tanto, los estudios no son comparables entre sí y se requiere de más ensayos.

Una de las limitantes para estandarizar el método de preparación del plasma rico en plaquetas es la variada disponibilidad de literatura en donde plantean diferentes métodos de preparación de este (81,82).

Nuestros resultados son presentados en esta fase únicamente a los 7 días, tiempo en el cual llama la atención que ya se observan cambios morfológicos grandes en el defecto osteocondral creado, sin embargo, no trabajamos conclusiones al respecto sin el debido estudio histopatológico.

## **1.24 Nuevos andamiajes biológicos derivados del PRP**

Bajo esta premisa de los andamiajes en fibrina, recientemente se han descrito otros derivados plaquetarios como andamiajes fisiológicos, este es el caso de la fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) y la fibrina rica en plaquetas (PRF) los cuales se han categorizado como protocolos de preparación más fáciles, baratos y rápidos pues una de las facilidades en su preparación es que no requiere de anticoagulantes y por ese hecho tampoco activadores plaquetarios, dejando estas matrices más fisiológicas (83), a este tipo de derivados plaquetarios se les ha llamado de segunda generación.

En una revisión de literatura sobre regeneración de cartílago con derivados de plaquetas, Barbon et al. (84), realiza una comparación entre estudios que incluyen manejo de defectos osteocondrales con PRP y PRF, en cada caso se resalta la utilidad de los derivados de plaquetas como una matriz tridimensional que puede albergar y entregar factores de crecimiento, la gran mayoría de los estudios utilizan estos asociados a otro tipo de tratamiento como por ejemplo fragmentos de cartílago, células madre mesenquimales y otras fuentes de factores de crecimiento. Wong et al. (85), realizó un estudio por microscopia electrónica de los andamiajes de PRF evidenciando una red porosa de fibrina. Mas tarde el mismo grupo (85), evidenció en cocultivos con condrocitos que los condrocitos se adherían a la red y migraban a través de esta indicando una buena afinidad entre las células y el andamiaje diseñado.

El grupo de Maruyama et al, realizó trasplantes de autoinjertos osteocondrales en un modelo de conejo y lo compararon al adicionar PRP infiltrado vs PRF interpuesto entre el defecto y autoinjerto encontrando que a las 3 semanas el grupo tratado con PRF había

cicatrizado parcialmente a diferencia del otro grupo y el control, y a las 12 semanas los tres grupos habían cicatrizado, sin embargo el grupo tratado con PRF mostraba características histológicas de cartílago hialino, mientras que los otros dos fibrocartílago (86). Hsu et al., comparó el potencial condrogénico de las AD-MS, el PRF, las AD-MS + PRF y el PRF + condrocitos en defectos osteocondrales en cóndilos femorales mediales de conejos y los administro de forma infiltrativa, a las 14 semanas evidenciaba que no hubo complicaciones en ninguno de los animales, el tamaño del defecto disminuyó y el volumen del cartílago reparado fue mayor en el grupo tratado con ADMSC + PRF, mostrando una capa más gruesa de cartílago hialino, exhibían una mejor matriz extracelular y distribución celular que otros grupos (87). De forma similar Wu et al. (88), evaluó el tratamiento con PRF, MSC y PRF + MSC y señala que no hubo efectos adversos en los animales a las 12 semanas, disminuyó el volumen del defecto y además aumento el volumen de cartílago en este, en el grupo tratado con MSC + PRF al igual que exhibía mejores características histológicas que en los otros grupos.

Kazemi et al. (89), comparó el PRP y PRF aplicados en forma de coágulo en defectos osteocondrales en rodilla de perros encontrando a las 4, 16 y 24 semanas que cualquiera de los dos tratamientos inducen cicatrización.

## 1.25 Desenlaces adversos

Como se mencionó anteriormente uno de los objetivos principales en terapia regenerativa es que el tratamiento propuesto tenga la mayor eficacia posible reduciendo al máximo la probabilidad de presentar efectos adversos.

Es bien conocido que algunas de las características sine qua non de las MSC es que deben exhibir un comportamiento antiinflamatorio, anti apoptótico, anti fibrótico con capacidad inmunomoduladora. En la caracterización de las MSC, estas deben expresar antígenos de superficie específicos: CD73, CD90, y CD105, que las distinguen de otro tipo de células madre y deben carecer de CD45, CD34, CD14, o CD11b, CD79 alfa o CD19 y HLA-DR, además deben demostrar un potencial de diferenciación multipotente in vitro (37).

Las propiedades inmunomoduladoras derivan de la liberación y señalización intracelular del secretoma de cada origen celular, este cambia el fenotipo celular de las células inflamatorias hacia uno antiinflamatorio. En general, se ha demostrado que las MSC son

---

capaces de afectar la activación y proliferación de todas las células del sistema inmune (6).

Nuestro ensayo es un tratamiento mediante un implante xenogénico de AD-MS-CM. Desde lo observado, no detectamos ningún tipo de complicación intra o postoperatoria hasta el día 7, notamos un adecuado proceso de cicatrización de la herida, aunque fue evidente una leve disminución en la movilidad del animal en su jaula y un patrón de marcha con cojera, lo más probable es que esto sea inherente al procedimiento quirúrgico. Estos resultados probablemente estén soportados por el hecho de que el secretoma de las MSC contienen moléculas antiinflamatorias, y principalmente anabólicas.

Con respecto a los implantes xenogénicos y su riesgo de generar condiciones adversas, Lee et al. (90). evaluó la capacidad de regeneración osteocondral con el uso células madre mesenquimales derivadas de medula ósea humana cultivadas en forma “esférica”, en DO de rodillas de conejos. No se detectó efectos adversos o rechazo inmunológico evidente, a las 6-12 semanas de estudio. Sin embargo, hacen la aclaración de que se necesita más información para determinar la capacidad rechazo inmunogénico del tratamiento. De manera similar, Zayed et al. (91), evidenció una adecuada regeneración celular con el uso de SD-MS-C de equino en DO realizados en surcos trocleares de fémures de ratas a las 12 semanas de estudio y no hay reporte de rechazo inmunológico, en dicho estudio.

Por otro lado, también existen reportes de rechazo inmunológico con el uso de tratamientos de distintas especies. Pei et al. (92), realiza un reporte de rechazo inmunológico a los 6 meses de estudio con el uso de SD-MS-C porcino para el tratamiento de DO de rodillas de conejos, esta reacción mediada por la respuesta innata del huésped.

Aunque nuestro ensayo piloto no encontró alguna reacción adversa al tratamiento en los conejos, se evaluó en un periodo de tiempo muy corto, es difícil predecir la posibilidad de un rechazo inmunológico en el estudio final, dado que se necesita de un periodo de observación mayor y los datos ya presentados en la literatura aún son insuficientes para emitir un juicio. En un ensayo realizado previamente por el grupo de investigación se evaluó la capacidad osteogénica del implante las AD-MS-C derivadas de humano y de los AD-MS-C-CM en un modelo de defecto óseo creado en la mandíbula de conejos evidenció



que ambos tratamientos inducían la regeneración ósea sin reporte de efectos adversos durante el seguimiento hasta 45 días (12).

Los ensayos clínicos que mencionan el uso de trasplantes de MSC para regenerar cartílago hialino en osteoartritis de rodilla muestran que los resultados adversos son principalmente leves (dolor y edema) (40,41). En cuanto a regeneración de cartílago hialino, se reportó una diferencia estadísticamente significativa favoreciendo al grupo tratado, sin embargo, no fue significativa en términos de la calidad del cartílago (41). Estos hallazgos sugieren que se requieren de estudios con mayor nivel de evidencia que faciliten un sustento científico para establecer un algoritmo de manejo eficaz con MSC para el tratamiento de OA.

Las MSC han mostrado ser seguras, en la revisión de Lalu et al. (42) donde 1012 participantes recibieron terapia con MSC intravascular tanto autólogas como alogénicas para diferentes condiciones, no se identificaron eventos adversos estadísticamente significativos. De igual modo aplicadas de forma intraarticular, las células madre autólogas no mostraron tener potencial de infección, malignidad o muerte (43).

Respecto al uso clínico de medios condicionados en humanos la literatura es limitada. Para regeneración en sistema musculo esquelético un estudio con defectos alveolares mostraba regeneración ósea, sin efectos secundarios importantes (57). Se ha utilizado en heridas de piel (58) y alopecia (59).



## Conclusiones

El presente trabajo muestra los resultados de la fase piloto en donde se estandariza el modelo animal utilizado y adicionalmente la metodología de implantación del tratamiento con PRP y PRP suplementado con AD-MS-CM.

El modelo animal en conejos es una herramienta útil para evaluar el principio del tratamiento a investigar sin poder extrapolar estos resultados a la especie humana dada las diferencias biológicas entre las especies, hasta el momento no se ha propuesto en la literatura un modelo similar de tratamiento de defectos osteocondrales.

Los andamiajes biológicos aun ofrecen una gran versatilidad en el manejo de defectos osteocondrales en modelos animales, para nuestro caso en particular, el PRP en forma de coagulo nos permitió utilizarlo como vehículo de factores de crecimiento al estar suplementado con los AD-MS-CM sin embargo su efecto terapéutico no es posible determinar con el presente ensayo. Los cambios morfológicos observados en los defectos osteocondrales de nuestro proceso preliminar deben ser reproducidos y analizados en las fases subsiguientes y evaluados mediante un estudio histopatológico.

Aunque se trata de un ensayo piloto, a los 7 días de tratamiento, no observamos ninguna reacción adversa en los conejos más que la discapacidad producida por la cirugía, por lo que no hubo necesidad de aplicar criterios de punto final. Sin embargo, se requiere una observación más prolongada para determinar esta variable.



## Referencias

1. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. Vol. 36, Clinics in Sports Medicine. W.B. Saunders; 2017. p. 413–25.
2. Whitney Kaitlyn E, Bolia Ioanna, Chahla Jorge, Utsunomiya Hajime, Evans Thos A., Provencher Matthew, et al. Physiology and Homeostasis of Musculoskeletal Structures, Injury Response, Healing Process, and Regenerative Medicine Approaches. In: Gobbi Alberto, Espregueira-Mendes João, Lane John G., Karahan Mustafa, editors. Bio-orthopaedics A New Approach. Berlín; 2017. p. 71–85.
3. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. Vols. 71–72, Matrix Biology. Elsevier B.V.; 2018. p. 51–69.
4. Roseti Livia, Grigolo Brunella. Host Environment: Scaffolds and Signaling (Tissue Engineering) Articular Cartilage Regeneration: Cells, Scaffolds, and Growth Factors. In: Gobbi A, Espregueira-Mendes J, Lane JG, Karahan M, editors. Bio-orthopaedics A New Approach. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017. p. 87–103.
5. Maglio M, Brogini S, Pagani S, Giavaresi G, Tschon M. Current Trends in the Evaluation of Osteochondral Lesion Treatments: Histology, Histomorphometry, and Biomechanics in Preclinical Models. Vol. 2019, BioMed Research International. Hindawi Limited; 2019.
6. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. Vol. 18, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2017.
7. Zylińska B, Silmanowicz P, Sobczyńska-Rak A, Jarosz Ł, Szponder T. Treatment of articular cartilage defects: Focus on tissue engineering. Vol. 32, In Vivo. International Institute of Anticancer Research; 2018. p. 1289–300.
8. Tobita M, Tajima S, Mizuno H. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: Stem cell transplantation methods that enhance stemness Mesenchymal Stem/Stromal Cells-An update. Vol. 6, Stem Cell Research and Therapy. BioMed Central Ltd.; 2015.
9. Chahla Jorge, Cinque Mark, LaPrade Robert F., Mandelbaum Bert. Overview of Orthobiology and Biomechanics. In: Bio-orthopaedics A New Approach. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017. p. 25–40.

10. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2014;73(7):1323–30.
11. Fletscher G. Modificación experimental de la técnica de membrana inducida (Masquelet) mediante uso de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales. [Bogotá D.C]; 2014.
12. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS ONE*. 2014 Sep 8;9(9).
13. Sánchez R. COMPARACIÓN DEL EFECTO DE MEDIOS CONDICIONADOS DE CULTIVOS DE 2 TIPOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN RATONES. [Bogotá D.C]; 2011.
14. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan [Internet]. Vol. 12, *Cell Research*. 2002. Available from: <http://www.cell-research.com>
15. Correa D, Lietman SA. Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions. Vol. 62, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press; 2017. p. 67–77.
16. Alvarez A, Fuentes R, Soto S, Nguyen Tuan, Garcia Y. Cartílago y gonartrosis. *Archivo medico de Camaguey*. 2019;23(6).
17. Armiento AR, Alini M, Stoddart MJ. Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? Vol. 146, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2019. p. 289–305.
18. Poole A. Robin, Kojima Toshi, Yasuda Tadashi, Mwale Fackson, Kobayashi Masahiko, Laverty Sheila. Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 2001;391 Supplement:S26–33.
19. Lubis AMT, Lubis VK. Adult Bone Marrow Stem Cells in Cartilage Therapy.
20. Wu L, Cai X, Zhang S, Karperien M, Lin Y. Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: Perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *Journal of Cellular Physiology*. 2013 May;228(5):938–44.
21. Houck DA, Kraeutler MJ, Belk JW, Frank RM, McCarty EC, Bravman JT. Do Focal Chondral Defects of the Knee Increase the Risk for Progression to Osteoarthritis? A Review of the Literature. Vol. 6, *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. SAGE Publications Ltd; 2018.
22. Castillo Tiffany N., Huddleston James I. Total Knee Arthroplasty for the Young, Active Patient with Osteoarthritis. In: Parker D, editor. *Management of Knee*

- Osteoarthritis in the Younger, Active Patient. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 133–47.
23. Suri P, Morgenroth DC, Hunter DJ. Epidemiology of Osteoarthritis and Associated Comorbidities. Vol. 4, PM and R. 2012.
  24. Londoño J, Peláez Ballestas I, Cuervo F, Angarita I, Giraldo R, Rueda JC, et al. Prevalence of rheumatic disease in Colombia according to the Colombian Rheumatology Association (COPCORD) strategy. Prevalence study of rheumatic disease in Colombian population older than 18 years. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2018 Oct 1;25(4):245–56.
  25. Pintat J, Silvestre A, Magalon G, Gadeau AP, Pesquer L, Perozziello A, et al. Intra-articular Injection of Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma to Treat Patellofemoral Osteoarthritis: Preliminary Results of a Long-Term Pilot Study. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2017 Dec 1;28(12):1708–13.
  26. lo Monaco M, Merckx G, Ratajczak J, Gervois P, Hilkens P, Clegg P, et al. Stem Cells for Cartilage Repair: Preclinical Studies and Insights in Translational Animal Models and Outcome Measures. Vol. 2018, *Stem Cells International*. Hindawi Limited; 2018.
  27. Devitt Brian M., Bell Stuart W., Whitehead Tim S. Cartilage Preservation and Restoration Techniques: Evidence-Based Practice. In: Parker D, editor. *Management of Knee Osteoarthritis in the Younger, Active Patient*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 51–65.
  28. Southworth TM, Naveen NB, Nwachukwu BU, Cole BJ, Frank RM. Orthobiologics for Focal Articular Cartilage Defects. Vol. 38, *Clinics in Sports Medicine*. W.B. Saunders; 2019. p. 109–22.
  29. Tang Y, Wang H, Sun Y, Jiang Y, Fang S, Kan Z, et al. Using Platelet-Rich Plasma Hydrogel to Deliver Mesenchymal Stem Cells into Three-Dimensional PLGA Scaffold for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Applied Bio Materials*. 2021 Dec 20;4(12):8607–14.
  30. Chang NJ, Erdenekhuyag Y, Chou PH, Chu CJ, Lin CC, Shie MY. Therapeutic Effects of the Addition of Platelet-Rich Plasma to Bioimplants and Early Rehabilitation Exercise on Articular Cartilage Repair. *American Journal of Sports Medicine*. 2018 Jul 1;46(9):2232–41.
  31. Madry H, Orth P, Cucchiari M. Gene therapy for cartilage repair. Vol. 2, *Cartilage*. 2011. p. 201–25.
  32. Cucchiari M, Henrionnet C, Mainard D, Pinzano A, Madry H. New trends in articular cartilage repair. *Journal of Experimental Orthopaedics*. 2015 Dec 1;2(1):1–8.
  33. Xie X, Zhang C, Tuan RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy*. 2014;16(1):204.

34. Zhu Y, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y, et al. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: A review. Vol. 21, *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013. p. 1627–37.
35. Campbell KA, Saltzman BM, Mascarenhas R, Khair MM, Verma NN, Bach BR, et al. Does Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injection Provide Clinically Superior Outcomes Compared With Other Therapies in the Treatment of Knee Osteoarthritis? A Systematic Review of Overlapping Meta-analyses. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2015 Nov;31(11):2213–21.
36. Chen Z, Wang C, You D, Zhao S, Zhu Z, Xu M. Platelet-rich plasma versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: A meta-analysis. *Medicine*. 2020 Mar 1;99(11):e19388.
37. Dominici M, le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 Aug;8(4):315–7.
38. Chaparro O, Linero I. Regenerative Medicine: A New Paradigm in Bone Regeneration. In: *Advanced Techniques in Bone Regeneration*. InTech; 2016.
39. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*. 2019 Aug 13;8(8):886.
40. Iijima H, Isho T, Kuroki H, Takahashi M, Aoyama T. Effectiveness of mesenchymal stem cells for treating patients with knee osteoarthritis: a meta-analysis toward the establishment of effective regenerative rehabilitation. Vol. 3, *npj Regenerative Medicine*. Nature Publishing Group; 2018.
41. Maheshwer B, Polce EM, Paul K, Williams BT, Wolfson TS, Yanke A, et al. Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis and Chondral Defects: A Systematic Review and Meta-analysis. Vol. 37, *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. W.B. Saunders; 2021. p. 362–78.
42. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. Vol. 7, *PLoS ONE*. 2012.
43. Peeters CMM, Leijts MJC, Reijman M, van Osch GJVM, Bos PK. Safety of intra-articular cell-therapy with culture-expanded stem cells in humans: A systematic literature review. Vol. 21, *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013. p. 1465–73.
44. Rubio-Azpeitia E, Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. Vol. 4, *Ligaments and Tendons Journal*. 2014.



45. Atashi F, Jaconi MEE, Pittet-Cuénod B, Modarressi A. Autologous platelet-rich plasma: A biological supplement to enhance adipose-derived mesenchymal stem cell expansion. *Tissue Engineering - Part C: Methods*. 2015 Mar 1;21(3):253–62.
46. Loibl M, Lang S, Brockhoff G, Gueorguiev B, Hilber F, Worlicek M, et al. The effect of leukocyte-reduced platelet-rich plasma on the proliferation of autologous adipose-tissue derived mesenchymal stem cells<sup>1</sup>. In: *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. IOS Press; 2016. p. 599–614.
47. Jalowiec JM, D'Este M, Bara JJ, Denom J, Menzel U, Alini M, et al. An in Vitro Investigation of Platelet-Rich Plasma-Gel as a Cell and Growth Factor Delivery Vehicle for Tissue Engineering. *Tissue Engineering - Part C: Methods*. 2016 Jan 1;22(1):49–58.
48. Lee JC, Min HJ, Park HJ, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovial membrane-derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. 2013 Jun;29(6):1034–46.
49. Samuel S, Ahmad RE, Ramasamy TS, Manan F, Kamarul T. Platelet rich concentrate enhances mesenchymal stem cells capacity to repair focal cartilage injury in rabbits. *Injury*. 2018 Apr 1;49(4):775–83.
50. Shi WJ, Tjoumakaris FP, Lendner M, Freedman KB. Biologic injections for osteoarthritis and articular cartilage damage: can we modify disease? *The Physician and Sportsmedicine*. 2017 Jul 3;45(3):203–23.
51. Koh Y-G, Choi Y-J. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *The Knee*. 2012 Dec;19(6):902–7.
52. Koh Y-G, Kwon O-R, Kim Y-S, Choi Y-J. Comparative Outcomes of Open-Wedge High Tibial Osteotomy With Platelet-Rich Plasma Alone or in Combination With Mesenchymal Stem Cell Treatment: A Prospective Study. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2014 Nov;30(11):1453–60.
53. Kim YS, Kwon OR, Choi YJ, Suh DS, Heo DB, Koh YG. Comparative Matched-Pair Analysis of the Injection Versus Implantation of Mesenchymal Stem Cells for Knee Osteoarthritis. *The American Journal of Sports Medicine*. 2015 Nov 3;43(11):2738–46.
54. Lee MJ, Kim J, Kim MY, Bae YS, Ryu SH, Lee TG, et al. Proteomic analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Proteome Research*. 2010 Apr 5;9(4):1754–62.
55. Bousnaki M, Bakopoulou A, Kritis A, Koidis P. The Efficacy of Stem Cells Secretome Application in Osteoarthritis: A Systematic Review of In Vivo Studies. Vol. 16, *Stem Cell Reviews and Reports*. Springer; 2020. p. 1222–41.
56. Veronesi F, Borsari V, Sartori M, Orciani M, Mattioli-Belmonte M, Fini M. The use of cell conditioned medium for musculoskeletal tissue regeneration. Vol. 233, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.; 2018. p. 4423–42.

57. Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Hibi H. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head & Face Medicine*. 2016 Dec 15;12(1):5.
58. Zhou BR, Xu Y, Xu Y, Guo SL, Wang Y, Zhu F, et al. The effect of conditioned media of Adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. *BioMed Research International*. 2013;2013.
59. Fukuoka H, Suga H. Hair Regeneration Treatment Using Adipose-Derived Stem Cell Conditioned Medium: Follow-up With Trichograms. 2015.
60. Escobar CH, Chaparro O. Xeno-Free Extraction, Culture, and Cryopreservation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 2016 Mar 1;5(3):358–65.
61. van den Borne MPJ, Raijmakers NJH, Vanlauwe J, Victor J, de Jong SN, Bellemans J, et al. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007 Dec;15(12):1397–402.
62. Hoemann C, Kandel R, Roberts S, Saris DBF, Creemers L, Mainil-Varlet P, et al. International cartilage repair society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. Vol. 2, *Cartilage*. 2011. p. 153–72.
63. Mainil-Varlet P, van Damme B, Nesic D, Knutsen G, Kandel R, Roberts S. A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. *American Journal of Sports Medicine*. 2010;38(5):880–90.
64. Congreso de la República de Colombia. Ley 84 de 1989: Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. *Diario Oficial* 39120. Bogotá D.C.; 1989.
65. Ministerio de salud. Resolución número 8430 de 1993. Bogotá D.C; 1993.
66. Meng X, Ziadlou R, Grad S, Alini M, Wen C, Lai Y, et al. Animal Models of Osteochondral Defect for Testing Biomaterials. Vol. 2020, *Biochemistry Research International*. Hindawi Limited; 2020.
67. Moran CJ, Ramesh A, Brama PAJ, O'Byrne JM, O'Brien FJ, Levingstone TJ. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. Vol. 3, *Journal of Experimental Orthopaedics*. Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 1–12.
68. Higa K, Kitamura N, Goto K, Kurokawa T, Gong JP, Kanaya F, et al. Effects of osteochondral defect size on cartilage regeneration using a double-network hydrogel. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2017 May 22;18(1).

69. Campos Y, Almirall A, Fuentes G, Bloem HL, Kaijzel EL, Cruz LJ. Tissue Engineering: An Alternative to Repair Cartilage. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2019 Aug;25(4):357–73.
70. Yin Z, Yang X, Jiang Y, Xing L, Xu Y, Lu Y, et al. Platelet-rich plasma combined with agarose as a bioactive scaffold to enhance cartilage repair: An *in vitro* study. *Journal of Biomaterials Applications*. 2014 Mar 3;28(7):1039–50.
71. Zhang YT, Niu J, Wang Z, Liu S, Wu J, Yu B. Repair of osteochondral defects in a rabbit model using bilayer poly(Lactide-co-Glycolide) scaffolds loaded with autologous platelet-rich plasma. *Medical Science Monitor*. 2017 Oct 31;23:5189–201.
72. Li Z, Zhang X, Yuan T, Zhang Y, Luo C, Zhang J, et al. Addition of Platelet-Rich Plasma to Silk Fibroin Hydrogel Bioprinting for Cartilage Regeneration. *Tissue Engineering - Part A*. 2020 Aug 1;26(15–16):886–95.
73. Sermer C, Devitt B, Chahal J, Kandel R, Theodoropoulos J. The addition of platelet-rich plasma to scaffolds used for cartilage repair: A review of human and animal studies. Vol. 31, *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. W.B. Saunders; 2015. p. 1607–25.
74. Beigi M-H, Atefi A, Ghanaei H-R, Labbaf S, Ejeian F, Nasr-Esfahani M-H. Activated platelet-rich plasma improves cartilage regeneration using adipose stem cells encapsulated in a 3D alginate scaffold. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018 Jun;12(6):1327–38.
75. Anitua E, Tejero R, Alkhraisat MH, Orive G. Platelet-rich plasma to improve the bio-functionality of biomaterials. Vol. 27, *BioDrugs*. 2013. p. 97–111.
76. Slimi F, Zribi W, Trigui M, Amri R, Gouiaa N, Abid C, et al. The effectiveness of platelet-rich plasma gel on full-thickness cartilage defect repair in a rabbit model Aims The present study investigates the effectiveness of platelet-rich plasma (PRP) gel without adjunct to induce cartilage regeneration in large osteochondral defects in a rabbit model. *Methods. Bone Joint Res*. 2021;10(3):192–202.
77. Vinod E, Vinod Francis D, Manickam Amirtham S, Sathishkumar S, Boopalan PRJVC. Allogeneic platelet rich plasma serves as a scaffold for articular cartilage derived chondroprogenitors. *Tissue and Cell*. 2019 Feb;56:107–13.
78. Berninger MT, Wexel G, Rummeny EJ, Imhoff AB, Anton M, Henning TD, et al. Treatment of osteochondral defects in the rabbit's knee joint by implantation of allogeneic mesenchymal stem cells in fibrin clots. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013;(75).
79. Khanmohammadi M, Golshahi H, Saffarian Z, Montazeri S, Khorasani S, Kazemnejad S. Repair of Osteochondral Defects in Rabbit Knee Using Menstrual Blood Stem Cells Encapsulated in Fibrin Glue: A Good Stem Cell Candidate for the Treatment of Osteochondral Defects. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019 Jun 1;16(3):311–24.

80. Chona D v., Kha ST, Minetos PD, LaPrade CM, Chu CR, Abrams GD, et al. Biologic Augmentation for the Operative Treatment of Osteochondral Defects of the Knee: A Systematic Review. Vol. 9, Orthopaedic Journal of Sports Medicine. SAGE Publications Ltd; 2021.
81. Dai WL, Zhou AG, Zhang H, Zhang J. Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. 2017 Mar 1;33(3):659-670.e1.
82. Le ADK, Enweze L, DeBaun MR, Dragoo JL. Current Clinical Recommendations for Use of Platelet-Rich Plasma. Vol. 11, *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. Humana Press Inc.; 2018. p. 624–34.
83. Caruana A, Savina D, Macedo JP, Soares SC. From Platelet-Rich Plasma to Advanced Platelet-Rich Fibrin: Biological Achievements and Clinical Advances in Modern Surgery. Vol. 13, *European Journal of Dentistry*. Georg Thieme Verlag; 2019. p. 280–6.
84. Barbon S, Stocco E, Macchi V, Contran M, Grandi F, Borean A, et al. Platelet-rich fibrin scaffolds for cartilage and tendon regenerative medicine: From bench to bedside. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
85. Wong CC, Chen CH, Chan WP, Chiu LH, Ho WP, Hsieh FJ, et al. Single-Stage Cartilage Repair Using Platelet-Rich Fibrin Scaffolds With Autologous Cartilaginous Grafts. *American Journal of Sports Medicine*. 2017 Nov 1;45(13):3128–42.
86. Maruyama M, Satake H, Suzuki T, Honma R, Naganuma Y, Takakubo Y, et al. Comparison of the Effects of Osteochondral Autograft Transplantation With Platelet-Rich Plasma or Platelet-Rich Fibrin on Osteochondral Defects in a Rabbit Model. *American Journal of Sports Medicine*. 2017 Dec 1;45(14):3280–8.
87. Hsu YK, Sheu SY, Wang CY, Chuang MH, Chung PC, Luo YS, et al. The effect of adipose-derived mesenchymal stem cells and chondrocytes with platelet-rich fibrin releasates augmentation by intra-articular injection on acute osteochondral defects in a rabbit model. *Knee*. 2018 Dec 1;25(6):1181–91.
88. Wu C-C, Sheu S-Y, Hsu L-H, Yang K-C, Tseng C-C, Kuo T-F. Intra-articular Injection of platelet-rich fibrin releasates in combination with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of articular cartilage defects: An *in vivo* study in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2017 Aug;105(6):1536–43.
89. Kazemi D, Fakhrjou A. Leukocyte and platelet rich plasma (L-PRP) versus leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) for articular cartilage repair of the knee: A comparative evaluation in an animal model. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2015 Oct 1;17(10).

90. Lee BH, Park JN, Lee EJ, Moon YW, Wang JH. Therapeutic Efficacy of Spherical Aggregated Human Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured for Osteochondral Defects of Rabbit Knee Joints. *American Journal of Sports Medicine*. 2018 Jul 1;46(9):2242–52.
91. Zayed M, Newby S, Misk N, Donnell R, Dhar M. Xenogenic implantation of equine synovial fluid-derived mesenchymal stem cells leads to articular cartilage regeneration. *Stem Cells International*. 2018;2018.
92. Pei M, Yan Z, Shoukry M, Boyce BM. Failure of xenotransplantation using porcine synovium-derived stem cell-based cartilage tissue constructs for the repair of rabbit osteochondral defects. *Journal of Orthopaedic Research*. 2010 Aug;28(8):1064–70.



# Anexos

Anexo 1. Identificación de signos de dolor, malestar y/o angustia												
	G2						G3					
	16/12/21 Am	17/12/21 Am	17/12/21 Pm	18/12/21 Pm	20/12/21	23/12/21	16/12/21	17/12/21	17/12/21 Pm	18/12/21 Pm	20/12/21	23/12/21
Corre	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Postura anormal	Si	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
Marcha anormal	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Tendencia a morder	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Si	No	No	Si
Anormalidad des externas	Herida quirúrgica a MTD	Herida quirúrgica MTD	Herida quirúrgica MTD	Herida quirúrgica MTD	Herida quirúrgica MTD	Herida quirúrgica MTD	Herida quirúrgica MTD	Herida quirúrgica MTD	Herida quirúrgica MTD	Herida quirúrgica MTD	Herida quirúrgica MTD	Herida quirúrgica MTD
Lesiones cutáneas	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si (inducidas)	No
Zonas de alopecia	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si (inducidas)	No
Parpados cerrados	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Constipación	No	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No

Anexo A. Identificación de signos de dolor, malestar y/o angustia. Se muestran únicamente los datos positivos del original. MTD: Miembro trasero derecho. Fuente: Bioterio Pontificia Universidad Javeriana



<b>Anexo 2. Criterios de punto final</b>		
	<b>G2</b>	<b>G3</b>
	23/12/2021	23/12/2021
<b>Peso</b>	2800G	2700G
<b>Pérdida de peso</b>	0	0
<b>Apariencia física</b>	0	0
<b>Hidratación</b>	0	0
<b>Comportamiento no provocado</b>	2	2
<b>Alteraciones clínicas</b>	0	0
<b>Total</b>	2	2

*Anexo B. Criterios de punto final. Menor o igual a 4: Adopte medidas de soporte y manejo veterinario para manejo de la condición. Reevalúe posteriormente. Mayor a 4: Realice eutanasia. Fuente: Bioterio Pontificia Universidad Javeriana*