



Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Tesis Doctoral

Modelo de investigación animal para el estudio de la osteoartrosis

Carlos Thams Baudot

Directores de Tesis

Dr. Ulf Thams Lorey

Dr. Jorge Freixinet Gilart

Las Palmas de Gran Canaria, Noviembre 2015



Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Programa de Doctorado: Avances en traumatología, medicina del deporte.

Cuidados de heridas (Interdepartamental)

Tesis Doctoral

Modelo de investigación animal para el estudio de la osteoartritis

Carlos Thams Baudot

Doctorando

Directores de Tesis

Dr. Ulf Thams Lorey

Dr. Jorge Freixinet Gilart

Las Palmas de Gran Canaria, Noviembre 2015

A toda mi familia

Agradecimientos

Tengo tanto que agradecer a tantos que no sé muy bien cómo ni por dónde empezar. Este trabajo no es fruto de unos meses, ni tan siquiera de unos pocos años. Comenzó como un proyecto ilusionante hace casi 7 años, y tras un prolongado proceso no libre de numerosos obstáculos, finalmente hemos conseguido transformar lo que al principio fue una pequeña idea en una realidad.

Creo que es justo comenzar por mis directores, por lo que en primer lugar, quisiera mencionar la gratitud y el amor que tengo hacia mi padre, el Dr. Ulf Thams Lorey, alma y motor de este trabajo y cuyo ejemplo de bondad, honestidad y esfuerzo me han servido de inspiración para convertirme en el médico que soy hoy.

Agradecer al Dr. Jorge Freixinet Gilart todo su apoyo, experiencia y sus acertados consejos.

Sin la labor del Dr. Fidel San Román este trabajo nunca hubiera existido; su ayuda, su experiencia y su conocimiento del campo fue indispensable para la realización de este trabajo experimental con animales.

Enorme es mi gratitud también hacia la Dra. Belén López Brito por su eterna paciencia, encontrando siempre un momento para ayudarme y asesorarme durante todos estos meses.

Sin la gran ayuda, sacrificio y motivación de mi buen amigo David Pérez Dévora este trabajo habría tenido un aspecto muy diferente.

A Nicanor Guerra Quintana por su ayuda y contribución con la estadística.

También quiero mostrar mi gratitud hacia la Dra. Jeanette Libera por su ayuda científica, al Dr. Lutz Slomianka por sus imágenes histológicas y al Dr. Watzeck por su iniciativa investigadora.

A mi amor Jezabel y a mi hija Cecilia, cuya alegría y cariño son la mejor motivación con la que un hombre puede soñar.

A mi madre María y a mi hermana Verena por su amor y su ejemplo de tenacidad y dedicación; su apoyo y su ayuda durante todos esos largos años de formación han hecho que yo haya podido llegar hasta aquí.

Índice

Índice de abreviaturas	21
1. Introducción	23
1.1 La articulación	
1.1.1. Estructura de las diartrosis, especialmente la rodilla	23
1.1.2. El cartílago hialino	27
1.2 Artrosis	33
1.2.1. Definición de artrosis	34
1.2.2. Diagnóstico de la artrosis	36
1.2.3. Clasificación de la artrosis	41
1.2.4. Factores de riesgo	46
1.3 Patogenia de la artrosis	47
1.4 Tratamiento de la artrosis	56
1.4.1. Tratamiento preventivo	58
1.4.2. Tratamiento farmacológico	59
1.4.3. Tratamiento quirúrgico	63
1.4.4. Expectativas, terapia génica y células madre	72
1.5 Modelos animales para el estudio de la artrosis	75
1.5.1. Generalidades sobre el estudio de la artrosis con modelos de experimentación animal	75
1.5.2. El modelo “Pond-Nuki” y el modelo “Moskowitz”	81
1.5.3. El modelo animal de este trabajo	81
1.6 Objetivos	86
2. Material y métodos	87
2.1 Manejo de los animales	87
2.2 Cultivo celular	92

2.2.1. Aislamiento de condrocitos	92
2.2.2. Conservación y descongelado de los condrocitos	93
2.2.3. Cultivo en monocapa	93
2.2.4. La cosecha y el procesado de las células	94
2.2.5. Contaje celular	95
2.2.6. Elaboración de los agregados tridimensionales de condrocitos	96
2.3 Histología e inmunohistoquímica	97
2.3.1. Descalcificación	98
2.3.2. Cortes de las muestras de tejido porcino	98
2.3.3. Fijación e inclusión en parafina de las muestras	100
2.3.4. Cortes ultrafinos de las muestras	100
2.3.5. Desparafinado y rehidratación	101
2.3.6. Tinción de hematoxilina eosina	101
2.3.7. Tinción Masson-Goldner	102
2.3.8. Tinción Safranina-O-Fast Green	102
2.3.9. Preparación de las muestras en formol	103
2.3.9.1. Pretratamiento con tripsina	103
2.3.9.2. Pretratamiento con hialuronidasa y pronasa	104
2.3.9.3. Pretratamiento con pronasa	104
2.3.9.4. Pretratamiento con el tampón de citrato	104
2.3.10. Tinciones inmunohistoquímicas	105
2.3.11. Control negativo	106
2.3.12. Evaluación de las tinciones	107
2.3.13. Establecimiento de determinados anticuerpos primarios	107
2.3.14. Supresión de la tinción positivas en los controles negativos positivos	108
2.4 Diseño del análisis estadístico	109

3. Resultados	110
3.1 Evaluación del cultivo celular	110
3.1.1. Estudios morfológicos de los cultivos monocapa	110
3.1.1.1. Valoración morfológica de los condrocitos del cerdo	111
3.1.1.2. Valoración morfológica de los condrocitos humanos	111
3.1.2. Valoración morfológica de los trasplantes tridimensionales	112
3.1.2.1. Análisis de los trasplantes de condrocitos porcinos	112
3.1.2.2. Análisis de los trasplantes de condrocitos humanos	112
3.2 Evaluación macroscópica de los cóndilos femorales porcinos tratados y de los no tratados con colagenasa	114
3.3 Análisis histológico de los cóndilos sanos y los tratados con colagenasa	119
3.3.1. Valoración de la tinción con hematoxilina-eosina	119
3.3.2. Valoración de la tinción de Safranina-O-FastGreen	120
3.3.3. Valoración de la tinción tricrómica de Masson-Goldner	122
3.4 Análisis inmunohistoquímico de los cóndilos sanos y los tratados con colagenasa	124
3.4.1. Valoración inmunohistoquímica de los componentes de la matriz extracelular	124
3.4.1.1. Expresión de colágeno tipo II	124
3.4.1.2. Expresión de colágeno tipo I	126
3.4.1.3. Expresión de colágeno tipo III	128
3.4.1.4. Expresión de agregcano	128
3.4.1.5. Expresión de S-100	129
3.4.2. Valoración inmunohistoquímico de la expresión de factores de crecimiento	130
3.4.2.1. IGF-1	130
3.4.2.2. TGF- β	131

3.4.3. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de citoquinas degenerativas o catabólicas	133
3.4.3.1. Interleuquina-1 β	133
3.4.3.2. Factor de Necrosis Tumoral α	134
3.4.4. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de enzimas	134
3.4.4.1. ADAMTS-5 (Agrecanasa-2)	134
3.4.4.2. MMP-13 (Colagenasa-3)	135
3.4.5. Estudio inmunihistoquímico de la expresión del marcador de apoptosis caspasa-3	136
3.5 Resumen de resultados	137
3.5.1. Análisis estadístico de los resultados	139
4. Discusión	140
4.1 Comparativa entre la producción de trasplantes de condrocitos porcinos y humanos	140
4.1.1. Comparación de los cultivos monocapa	140
4.1.2. Cultivo tridimensional de los condrocitos de cerdo	141
4.1.3. Comparación de los cultivos tridimensionales	141
4.2 Comparación macroscópica e histológica del cartílago sano y el tratado con colagenasa	142
4.3 Comparación de los componentes de la matriz extracelular en el cartílago sano y artrósico	146
4.4 Comparación de la expresión de citoquinas entre articulaciones sanas y artrósicas	148
4.4.1. Las enzimas catabólicas IL-1 β y TNF- α	148
4.4.2. IGF-1 y TGF- β , dos citoquinas anabólicas	149
4.5 Las enzimas MMP-13 y ADAMTS-5 y su papel en el desarrollo de la artrosis	152

4.6 Apoptosis en el desarrollo de la artosis	154
4.7 La idoneidad de la inyección intraarticular de colagenasa en la rodilla del minipig como modelo de artrosis	156
4.8 Perspectiva	157
Bibliografía	159

Índice de abreviaturas

°C	Grado centígrado
3D	Tridimensionales
fig.	Figura
ROM	Rango de movilidad (del inglés Range of motion)
ABVD	Actividades básicas de la vida diaria
ICRS	International Cartilage Repair Society
LCA	Ligamento cruzado anterior
TAC	Tomografía axial computerizada
RMN	Resonancia nuclear magnética
ADAMTS	A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs
AP	Fosfatasa alcalina
BSA	Bovine serum albumin (albúmina de suero bovino)
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
TC	Tomografía computerizada
EDTA	Tetraacetato de etilendiamina
et al.	Et altera
MEC	Matriz extracelular
FGF	Fibroblast growth factor (factor de crecimiento fibroblástico)
FI	Fossa intercodilaris
gr	Gramo
h	Hora
H-E	Hematoxilina-Eosina
AH	Ácido hialurónico

1. Introducción

1.1 La articulación

Una articulación se define como zona de contacto entre dos elementos del esqueleto próximos entre sí. A la articulación le corresponden las superficies de contacto entre los correspondientes elementos del esqueleto (superficies articulares), así como estructuras de partes blandas (tejidos) que se encuentran entre ambas superficies articulares (1,2).

Existen principalmente dos tipos de articulaciones, las sinartrosis y las diartrosis. En las primeras falta el espacio articular, donde en su lugar existe tejido conjuntivo o cartílago como tejido conectivo. Por otro lado se encuentran las diartrosis (clasificadas según su función) o también articulaciones sinoviales (clasificadas según su estructura).

1.1.1 Estructura de las diartrosis, especialmente la rodilla

Las articulaciones sinoviales del tipo diartrosis se componen de los siguientes elementos:

- 1) Superficies articulares lisas, separadas por una cavidad articular y móviles unas sobre otras.
- 2) una cápsula articular y ligamentos.
- 3) un tejido sinovial responsable de producir líquido sinovial que sirve de alimento y lubricante articular.

Superficies articulares - Las superficies articulares están siempre revestidas por cartílago llamado articular o de revestimiento. Este cartílago presenta una superficie libre, lisa y pulida, cuyo espesor será proporcional a la presión soportada por unidad de superficie. Es sólido, flexible, elástico y liso, facilitando los deslizamientos, protegiendo la superficie ósea y evitando el desgaste del hueso.

Frecuentemente, como es el caso de la rodilla, las superficies articulares no se adaptan entre sí con exactitud. Para lograr la concordancia existen unas láminas fibrocartilaginosas interarticulares llamadas meniscos. En la rodilla tienen forma de medialuna cuyas periferias se adhieren directamente a la cápsula articular.

Cápsula articular y ligamentos - Son las encargadas de mantener en contacto las superficies articulares. El manguito fibroso que se inserta en la vecindad de las superficies articulares se denomina cápsula articular.

Su laxitud será directamente proporcional a la amplitud de movimiento y a la movilidad en sí de cada articulación. Existen una serie de refuerzos situados en donde la cápsula debe presentar una mayor resistencia denominados ligamentos.

Sin embargo, existen ligamentos que no son refuerzos de la cápsula, sino que se relacionan con tendones, tejido muscular y aponeurosis en su origen embriológico, quedando como ligamentos intrínsecos en la articulación definida, como por ejemplo los ligamentos cruzados en la rodilla.

La rodilla

En el caso concreto de la rodilla la cápsula articular tiene dos capas, compuestas por fuera por la membrana fibrosa y por dentro por la membrana sinovial. La membrana fibrosa se compone de tejido conectivo fuerte unido al hueso a través de fibras de colágeno. La membrana sinovial se divide en íntima y subíntima. La primera está compuesta de uno a cuatro estratos de sinoviocitos fibroblásticos y macrófagos. Los macrófagos se encargan de fagocitar bacterias y restos celulares así como de la producción de ácido hialurónico. Los sinoviocitos fibroblásticos sintetizan diversas proteínas. También encontramos células nerviosas aferentes en la cápsula articular.

El espacio articular está relleno de líquido sinovial, que suele ser claro, de color ámbar y viscosa gracias a su alto contenido en ácido hialurónico. Este líquido lubrica las superficies articulares rebajando enormemente la fricción entre ellas. También participa en la amortiguación y en aportar nutrientes al cartílago.

El líquido sinovial presenta fosfolípidos, proteoglicanos (por ejemplo lubricina) y proteínas, que provienen de la sangre.



Fig. 1: Vista frontal de una rodilla derecha en bipedestación

La rodilla articula el fémur en proximal y con la tibia y el peroné hacia distal. El peroné no articula con el fémur, sino únicamente con la tibia en su lado lateral por debajo de la meseta tibial.

El fémur termina distalmente en dos rodetes ligeramente convexos cubiertos de cartílago articular: los cóndilos femorales, uno interno y otro externo.

Formando parte del aparato extensor de la rodilla encontramos el hueso sesamoideo más grande del cuerpo humano, la rótula, que articula en su cara posterior con el fémur a nivel del surco intercondíleo. En su parte proximal se inserta el tendón cuadricipital del músculo cuádriceps femoral, y distalmente el tendón rotuliano que a su vez se inserta en la espina tibial anterior, formando parte de esta forma del potente aparato extensor de la rodilla.

Las superficies articulares de los cóndilos femorales y de la tibia no son del todo congruentes, pero existen dos meniscos en forma de semiluna que se ocupan de aportar estabilidad y amortiguación, consiguiendo de esta forma una articulación estable y armónica. Cuando la rodilla está flexionada, son las superficies posteriores, más planas, de los cóndilos femorales las que articulan sobre la tibia.

Al ser menos convexas no permiten movimientos de rotación. Con la extensión de la rodilla, pasan a articular con la tibia las superficies más anteriores de los cóndilos femorales, que al tener mayor convexidad sí otorgan un pequeño grado de movimiento rotacional. La estabilidad intraarticular será proporcionada por dos ligamentos cruzados, el anterior y el posterior, que nacen proximalmente en el surco intercondíleo del fémur fuera de la superficie cartilaginosa articular para insertarse en las espinas tibiales en el centro del platillo tibial.

Existen dos ligamentos extraarticulares, los ligamentos laterales interno y externo que proporcionan estabilidad lateral contra los movimientos de varo y valgo.

1.1.2. El Cartílago hialino

Se trata de un tejido con unas características muy bien definidas. Tiene una gran resistencia y durabilidad, y su aspecto macroscópico es blanco, brillante y firme. Carece de vasos sanguíneos, por lo que su nutrición depende del líquido sinovial y se realiza mediante un sistema de difusión durante las distintas fases de distribución de la carga articular. El cartílago hialino consta de una abundante matriz extracelular y de condrocitos, que son sus únicas células y se encuentran en las llamadas lagunas o agregados.

Clásicamente se divide en tres zonas principales (Forriol, 3).

- *Zona superficial (zona 1)*: Aquí las células se disponen de forma paralela a la superficie articular para soportar mejor las fuerzas de cizallamiento.
- *Zona de transición o media (zona 2)*
- *Zona radial o profunda (zona 3)*: Las células tienden a formar grupos llamados agregados o condrones, y se disponen perpendiculares a la superficie articular por la distribución tridimensional de las fibras de colágeno, que de esta forma proporcionan resistencia a la compresión y facilitan la cohesión del tejido. La mayor concentración de proteoglicanos la encontramos en esta capa profunda.

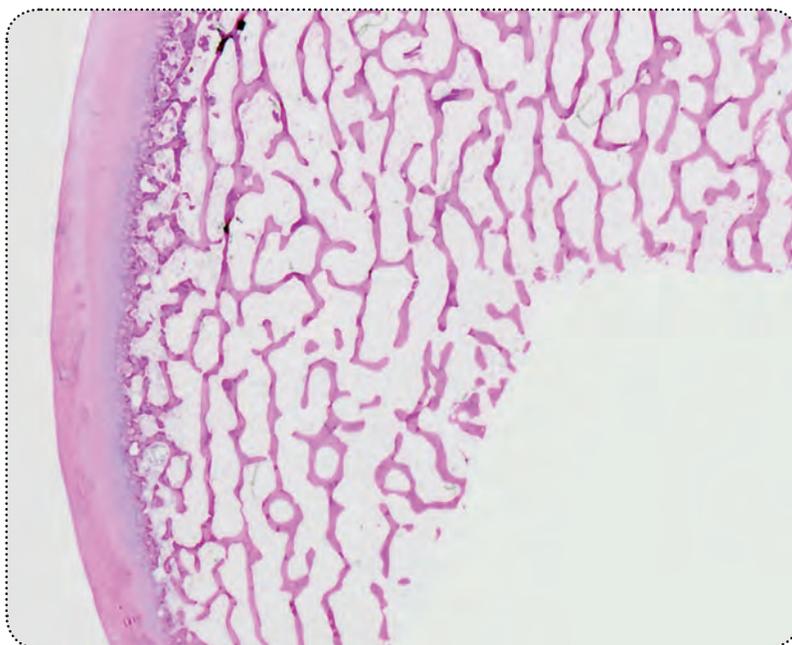


Fig. 2: Imagen histológica con lupa de hueso subcondral y cartilago articular, con tinción de hematoxilina-eoxina (H-E).

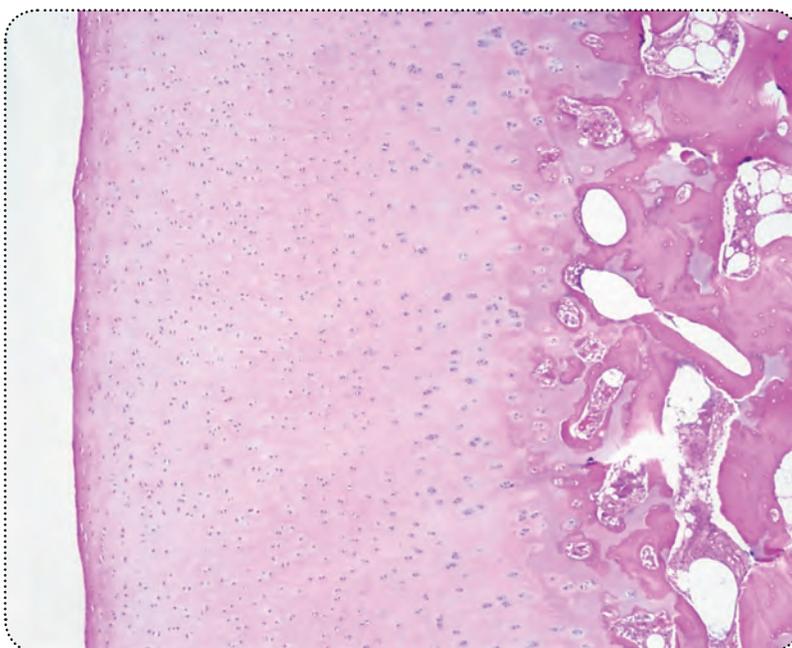


Fig. 3: Detalle de corte transversal del grosor completo del cartilago articular, con tinción de hematoxilina-eoxina (H-E).

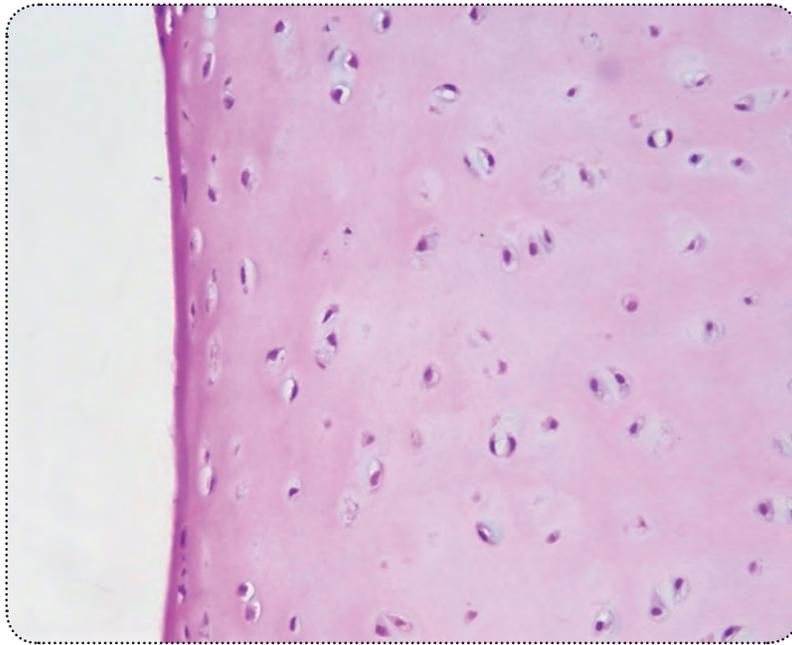


Fig. 4 : H-E: Detalle de la zona superficial en la que tanto las fibras de colágeno como los propios condrocitos se disponen en una distribución paralela a la superficie articular.

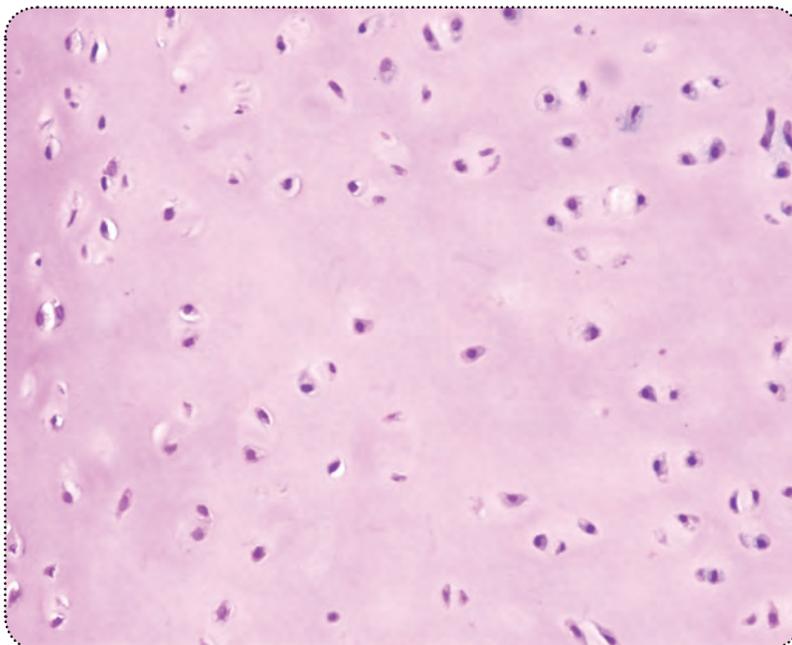


Fig. 5: H-E: En la zona intermedia la disposición de los condrocitos está menos definida, ya que es zona de transición de posición paralela a la superficie a zona de disposición radial o perpendicular a la misma.

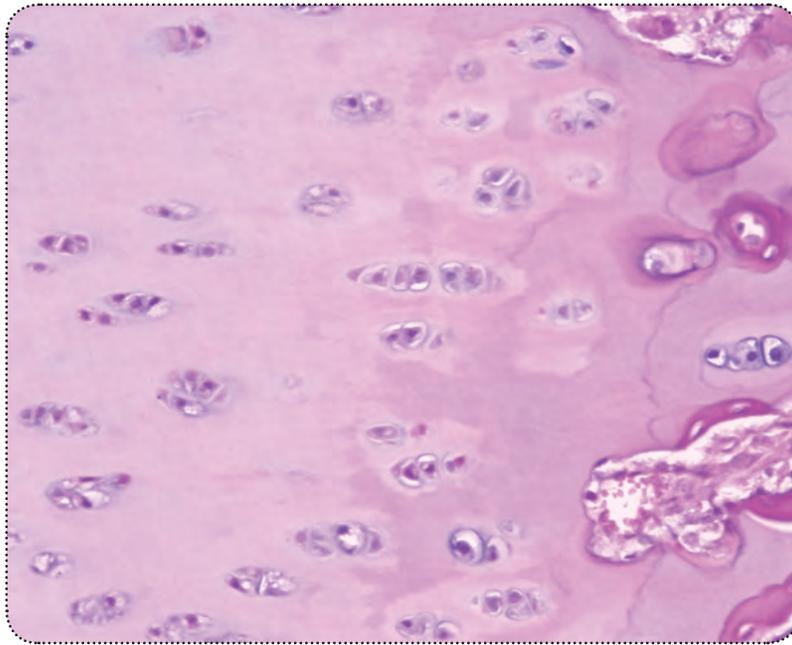


Fig. 6: H-E: En la zona profunda las fibras de colágeno forman un entramado perpendicular a la superficie que permite al cartílago contrarrestar fuerzas de carga directa. Esto implica que la disposición de condrocitos sea en forma de agregados longitudinales perpendiculares a la superficie del cartílago.

Los condrocitos se encargan de sintetizar y secretar esta matriz, que es una red macromolecular formada principalmente por cuatro tipos de moléculas: colágeno, ácido hialurónico, proteoglicanos y proteínas no colagénicas o glicoproteínas.

El cartílago presenta una consistencia dura, pero se puede deformar por presión y después recupera su forma original (tiene “memoria”). Esta elasticidad a la presión es una característica que nace de la interacción de los proteoglicanos y las fibrillas de colágeno. El cartílago es un tejido avascular, su nutrición acontece a través de largos microcanales a través de la matriz extracelular (2,21,29).

Las características que confieren al cartílago un carácter único son la ausencia de inervación y vascularización, y tampoco tienen vasos linfáticos ni membrana basal (3).

El pericondrio es una membrana que rodea cada placa o lámina de tejido cartilaginoso. Se trata de una membrana de tejido conjuntivo densa y que tiene dos capas, la externa fibrosa y la interna celular, en la cual encontraremos las células que se diferenciarán hacia condroblastos.

Los condrocitos proceden de células mesenquimales, que primero se diferencian hacia condroblastos y después producen matriz cartilaginosa. Los condrocitos se supeditan al crecimiento intersticial, es decir, que a medida que crece la matriz extracelular las células se van separando y comienzan a proliferar al mismo tiempo. Al finalizar el crecimiento intersticial, los condrocitos que han proliferado de las últimas divisiones celulares permanecen juntos en grupos separados por finos septos matriciales. Estos conjuntos son llamados grupos isógenicos. El condrocito o grupo de condrocitos junto con la matriz cartilaginosa que los rodea, forman la llamada laguna o agregado; aunque también se pueden denominar condrones. Estos condrones van proliferando de forma lenta pero constante, de forma que en el cartílago sano pueda existir un equilibrio entre la creación y destrucción de matriz extracelular, conocido como anabolismo y catabolismo celular. Los condrocitos tan sólo suponen el 2% del volumen de cartílago articular normal (2,3).

Los condrocitos responden tanto a estímulos químicos como a estímulos mecánicos. También responden a mediadores celulares como las interleucinas y factor de crecimiento, a la composición de la matriz, a cargas mecánicas, presiones hidrostáticas e incluso a campos eléctricos. Su metabolismo es fundamentalmente anaerobio debido a la baja concentración de oxígeno, como consecuencia de la ausencia de vasos sanguíneos.

La matriz extracelular está compuesta por líquido intersticial y por la red de macromoléculas estructurales que le otorgan al tejido su forma y su estabilidad, es decir, agua, colágenos y proteoglicanos.

Las fibras de colágeno del cartílago articular suman entre el 10% y el 30% del volumen y son principalmente de colágeno tipo II (90 a 95%), y en menor medida de colágeno tipo IX y XI, aunque también se pueden encontrar fibras de colágeno tipo VI y X. (2, 21, 29).

El agua, aunque no sea el componente más voluminoso, sí supone entre el 65% y el 80% del peso total, y su concentración varía en función de la edad, de la carga y otros factores. Participa en la lubricación y en el transporte de nutrientes, y su presión es fundamental para resistir a cargas de presión.

Los proteoglicanos se componen de un núcleo central proteico unido a diferentes cadenas de mucopolisacáridos o glicosaminoglicanos. Éstos últimos son cadenas largas de polisacáridos no ramificadas formadas por unidades de disacáridos repetidas sucesivamente. Las forman el ácido urónico y hexosamina acetilada.

Los glucosaminoglicanos que se asocian con proteoglicanos son cinco: keratán, hiparán sulfato, dermatán sulfato, condroitín sulfato y hialuronato.

El más importante de éstos es el ácido hialurónico no sulfatado, ya que posee una secuencia de 25.000 ácidos, lo que le confiere una carga negativa. Por esto atrae a diversos cationes, sobre todo al sodio, y esto hace que tenga gran actividad osmótica. Esta propiedad hace que atraiga agua, convirtiendo cada molécula en un ovillo muy hidratado y laxamente plegado, ocupando un volumen importante en el espacio intercelular.

Los glicosaminoglicanos sulfatados se encuentran en el espesor de la red de colágeno y su principal contribución es la de revertir la deformación del cartílago.

El agregano es el proteoglicano más importante y se trata de una proteína grande a la que se unen más de 100 cadenas de condroitín sulfato y 20 de keratán sulfato, y a través de su cordón proteico se puede unir al ácido hialurónico. Cuando se unen varios a una molécula de hialuronato pueden formar un agregado masivo. Esta construcción es la responsable de la dureza y la resistencia de la matriz cartilaginosa. Cuando es presionada, pierde agua y cuando la presión cede lo vuelve a atraer, recuperando la forma. Esta característica hace que el cartílago actúe como un amortiguador para el hueso subyacente.

La fuerza aplicada será distribuida de forma ordenada y repartida gracias a la configuración espacial de las fibras de colágeno. Se trata de una distribución en forma de arcos que se pueden dividir en cuatro zonas que sin embargo no se pueden diferenciar directamente unas de otras.

Las fibras de colágeno más superficiales están colocadas de forma tangencial, en la zona 1. Aquí, la concentración de colágeno es alta y la de proteoglicanos es menor, al contrario que en las zonas 2 y 3. La zona 2 tan sólo es la transición a la zona 3, en la que las fibras de colágeno adoptan una distribución radial o perpendicular hacia la superficie. Aquí es donde se encuentra la mayor concentración de proteoglicanos, aunque las fibras de colágeno son de mayor grosor. La zona más profunda es la llamada zona 4 o mineralizada, que contacta con el hueso subcondral y es donde se anclan las fibras de colágeno y donde encontraremos cristales de hidroxiapatita en la matriz extracelular. (2, 21, 25, 80).

1.2 Artrosis

También conocida como osteoartritis o enfermedad degenerativa de las articulaciones, es la afectación degenerativa de las superficies sinoviales.

Es la patología articular más frecuente y supone un alto gasto sanitario a nivel mundial.

Afecta con mayor frecuencia a las rodillas, caderas, manos, pies y columna vertebral, pero potencialmente puede aparecer en cualquier articulación sinovial.

La artrosis de las rodillas se denomina gonartrosis, en las caderas coxartrosis y en la base del pulgar rizartrosis. Éstas son las tres presentaciones más comunes de la enfermedad, junto con la lumboartrosis. Suponen un 30% de todos los ingresos hospitalarios a nivel mundial. Se estima que más del 10% de la población mundial padece esta patología (Neogi, 50).

Se estima que alrededor del 40% de los varones y el 47% de las mujeres desarrollarán alguna forma de artrosis a lo largo de su vida, siendo mayor la incidencia en pacientes obesos, como publicó Zhang en 2013 (20).

Los costes de esta enfermedad son particularmente elevados, puesto que generan un gasto médico asistencial importante, y una disminución de productividad de la población que la padece con su correspondiente pérdida de calidad de vida.

La Sociedad Española de Reumatología (SER), en asociación con la Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (Semergen), publicó en el año 2012 que el coste anual de la artrosis de rodilla y de cadera en España es de 4.738 millones de euros, de los cuales el 46 por ciento corresponde a gastos asistenciales, el 22 por ciento a bajas laborales, el 13 por ciento a ingresos hospitalarios, el 7 por ciento a pruebas diagnósticas y el 5 por ciento a fármacos. Sólo el tratamiento de la artrosis en España consume más del 0,5% del producto interior bruto (P.I.B.) (19).

En el año 2002, la Sociedad Alemana de Cirugía Ortopédica cifró el coste anual aproximado de la artrosis en torno a los 7.200 millones de euros para el año 2002 (17).

Es una enfermedad característica de pacientes mayores, porque tarda mucho tiempo en desarrollarse y en ser sintomática. La incidencia pasa del 2% en torno a los 45 años al 68% a partir de los 65 años de edad (15, 20).

El gran coste económico de esta patología hace que desde hace varios años se estén diseñando diversas estrategias de prevención y educación de la población. Sabemos que hay diferentes factores de riesgo, y que algunos como la edad o el sexo no pueden ser tratados de forma preventiva. Por esto, es sobre todo el problema del sobrepeso el que se ha convertido en diana de importantes esfuerzos por parte de organizaciones de la salud y varios gobiernos, aunque aún falta mucho para poder ver resultados positivos de estas campañas. La población en el llamado primer mundo continúa con una tendencia al alza en ganancia ponderal, y por ejemplo en países como Estados Unidos de América la obesidad se ha convertido en un problema prioritario para el gobierno.

1.2.1. Definición de artrosis

El concepto de osteoartrosis ha recibido numerosas definiciones a lo largo de la historia, por lo que en 1994 se estableció una definición oficial por parte del grupo “New Horizons in Osteoarthritis” (15). En ésta, se hace especial hincapié en que la artrosis no se compone de una única enfermedad.

Según esta definición, la artrosis es un conjunto de diferentes enfermedades que se solapan, posiblemente con diferentes etiologías pero con una aparición biológica, morfológica y clínica similares. Se ven afectados diferentes tejidos, todos aquellos que forman parte de una articulación, y no se limita al cartílago. Ocurren varios hechos diferentes pero relacionados entre sí, que finalmente acaban en la degradación del cartílago y del hueso subyacente, y estos hechos pueden ser desencadenados por diversos factores como la genética, los traumatismos, metabólicos y del desarrollo, entre otros.

En 2012, el grupo de trabajo de Goldring et al. (16), escribió que la artrosis, más que un proceso de desgaste y rotura, se debe entender como una remodelación anormal de los tejidos articulares conducida por una serie de mediadores inflamatorios dentro y fuera de la articulación afectada. Para desarrollar este concepto propone conocer a la articulación como un conjunto de estructuras con sus características fisiológicas e histoquímicas particulares que forman un órgano, por lo que el título de su trabajo es precisamente ese: “The Joint as an Organ”, “La articulación como un órgano”.

Se entiende que la artrosis se comporta como una enfermedad degenerativa no inflamatoria, un proceso bioquímico que tiene más de intento reparador que de degenerativo, y que se caracteriza por degeneración del cartílago articular, hipertrofia del hueso en sus márgenes y cambios en la membrana sinovial. En cambio, en la artritis el daño empieza en la membrana sinovial y secundariamente se afecta el cartílago.

Clínicamente se manifestará con dolor articular, sensibilidad exacerbada, rigidez articular, crepitación y diferentes grados de inflamación.

Estos síntomas no son constantes pero sí duraderos, y a veces son tan intensos que los pacientes se ven incapaces de caminar con normalidad. Este hecho puede tener efectos negativos sobre la productividad laboral y sobre el estado de ánimo de los pacientes, pudiendo ser el desencadenante de cuadros relacionados con la distimia o la depresión. Los pacientes buscan remedios para mitigar sobre todo el dolor. El uso prolongado de analgésicos y antiinflamatorios no está exento de riesgos y complicaciones, como trastornos metabólicos, hepatopatías, nefrotoxicidad y afectaciones del aparato digestivo.

La inmovilidad por el dolor de la artrosis también es responsable de problemas como el sobrepeso y la obesidad, el incremento de la incidencia de enfermedades como la diabetes y la hipertensión arterial.

Con todo esto, podríamos definir la artrosis como un síndrome clínico-radiológico y de laboratorio consistente en:

1. Pérdida progresiva del cartílago articular por destrucción enzimática, que provoca una reducción del espacio interarticular y presencia de metabolitos y enzimas en la sangre, en el líquido articular y en la orina.
2. Remodelación de las epífisis y metáfisis óseas con formación de nuevo hueso, osteofitos, esclerosis subcondral y quistes subcondrales.
3. Sinovitis secundaria que puede provocar una fibrosis capsular.

1.2.2. Diagnóstico de la artrosis

El diagnóstico de artrosis no es un proceso complejo, y se fundamenta en tres pilares:

- A. Anamnesis o historia clínica
- B. Exploración física
- C. Pruebas radiológicas, estudios de imagen
 - Radiografía simple
 - TAC
 - Resonancia magnética
- D. Artroscopia

A.B. Historia Clínica y exámen físico:

Los médicos casi siempre diagnostican la artrosis basándose en esas tres cosas: Primero, en la historia del paciente obtenida mediante una correcta anamnesis, segundo por la exploración física y tercero por pruebas complementarias de imagen, tales como la radiografía simple, los escáneres, las resonancias magnéticas y a veces la visión directa obtenida por artroscopia (23, 30).

De la anamnesis y de la exploración física podremos valorar los síntomas más frecuentes en la artrosis, como lo son el dolor, la rigidez, la crepitación de la articulación y los cambios en el estado de ánimo del paciente, como la preocupación e incluso depresión (58).

Es importante diferenciar a los pacientes que presentan una lesión aislada o múltiples lesiones focales de aquellos que presentan cambios degenerativos artrósicos difusos. Los pacientes con lesiones focales conservan habitualmente un rango de movilidad (ROM - range of motion) normal, dolor y tumefacción en un punto concreto del cóndilo medial o lateral, dependiendo de la localización de la lesión. A veces se acompañan de derrames articulares relacionados con determinadas actividades, como por ejemplo un exceso de carga por

causas laborales o deportivas. Suele tratarse de paciente jóvenes con un estilo de vida activo y que pese a la lesión son capaces de realizar sus Actividades Básicas de la Vida Diaria (ABVD) sin limitaciones, pero que referirán síntomas relacionados con actividades deportivas o posturas concretas como ponerse de cuclillas o arrodillarse. Con frecuencia este tipo de pacientes presentan lesiones asociadas o alteraciones de la alineación ósea, por lo que merece la pena estudiar y documentarlos bien de cara a la decisión terapéutica más adecuada para cada caso. Son el grupo de pacientes que más se benefician de las técnicas de tratamiento modernas y que tratan de preservar toda la articulación.

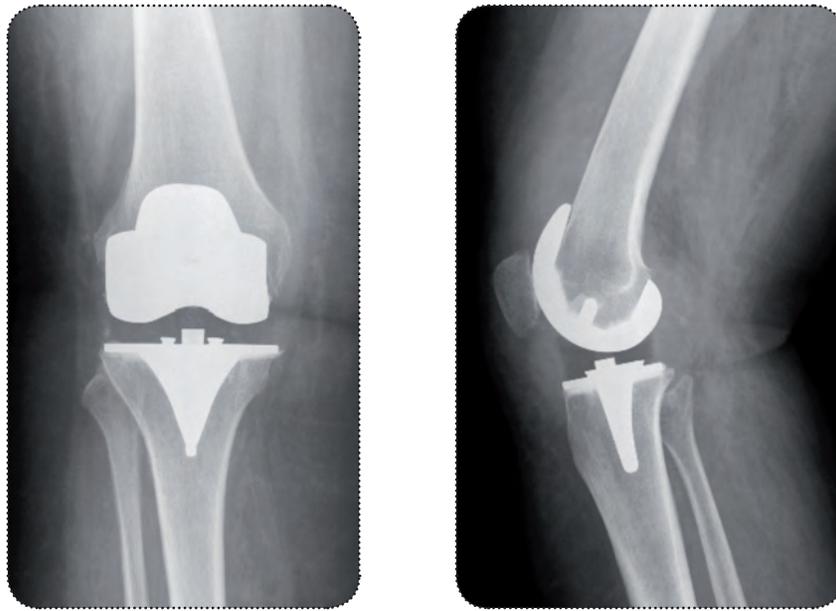
Aquellos pacientes con cambios degenerativos difusos se ven más limitados para su vida diaria, presentando dolor constante y limitación del rango de movilidad. Pueden sufrir derrames articulares sin necesidad de un desencadenante mecánico y el manejo sintomático es mucho más complejo que en pacientes con lesiones focales. Suelen ser pacientes mayores y con frecuencia presentan otras enfermedades concomitantes, a veces tan graves que desaconsejan el tratamiento a priori indicado para su artrosis. Al ser lesiones difusas que afectan a la totalidad de la articulación suponen un reto terapéutico, muchas veces demasiado difícil de superar, siendo subsidiarios a tratamientos más agresivos como la artroplastia total. Ésta consiste en la destrucción de la totalidad de la superficie articular con su cartílago y la sustitución por una prótesis.

C. Estudios de imagen:

Los hallazgos radiológicos son fundamentales a la hora de corroborar la sospecha clínica, así como para clasificar el grado de artrosis y de esa forma poder tomar decisiones terapéuticas.

Las radiografías simples son una prueba no inocua pues conlleva radiación, pero es rápida, no es compleja de realizar y es relativamente barata. En articulaciones de carga, como lo es la rodilla, se recomienda hacer las radiografías cargando el peso sobre las extremidades afectadas para ver cómo se comporta la articulación. Es sumamente útil para estadios moderados o severos de artrosis, y es obligatoria para valorar la alineación de la extremidad,

lesiones asociadas o previas y para planificar el tratamiento. Al ser la prueba diagnóstica más extendida en el mundo para esta enfermedad, casi todas las clasificaciones de artrosis se basan en estudios de radiografía simple.



Figs. 7 y 8: Radiografías en proyección anteroposterior y lateral de una rodilla derecha sometida a artroplastia con prótesis de rodilla.

La Tomografía Axial Tomputerizada (TAC) también es una prueba que utiliza radiación X, pero haciendo múltiples cortes en diferentes planos que permiten obtener una imagen clara, nítida y muy detallada de tejido óseo. Hoy en día se están haciendo reconstrucciones tridimensionales, y esto resulta muy útil para valorar por ejemplo superficies articulares. No obstante, tan sólo refleja tejido de alta densidad como el hueso y no permite valorar el cartílago ni otras partes blandas como los meniscos y ligamentos. En la práctica clínica habitual se utiliza muy poco para diagnosticar artrosis, aunque sí es útil para valorar secuelas de fracturas previas que afectan a una articulación.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) no utiliza radiaciones ionizantes, por lo que resulta inocua. Mediante un aparato de imágenes de resonancia magnética (MRI son sus siglas en inglés) se obtiene una imagen basada en las propiedades físicas de los átomos de los tejidos. Consiste en crear un campo magnético intenso y homogéneo una vez colocado el sujeto del estudio en un cilindro diseñado para ello. Los protones de los núcleos celulares van a sufrir un proceso llamado excitación celular al recibir unas pulsaciones de ondas de radiofrecuencia. A continuación se suspenden las radiofrecuencias y los protones pasan a la fase de relajación. Este cambio de excitación a relajación hace que desde el interior del paciente se generen unas concretas ondas de radio que la máquina recoge y transforma en píxeles para crear una imagen. Dependiendo del tipo de tejido, estas imágenes cambian el tipo de onda y su frecuencia, lo que se conoce como densidad protónica. De esta forma se pueden crear mapas de imágenes de los tejidos sin utilizar radiaciones ionizantes. Esta técnica permite visualizar los tejidos blandos de las articulaciones y se emplea sobre todo para valorar lesiones asociadas de ligamentos o meniscos, puesto que tiende a subestimar la extensión real de lesiones del cartílago. Pero empleando la técnica adecuada puede ser extremadamente útil para evaluar el cartílago y sus lesiones (Delgado, 25).

Una de estas técnicas de RMN novedosas es la inyección de sustancias de contraste. Concretamente, para evaluar el cartílago articular se emplea el gadolinio: delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC). El gadolinio es un metal iónico que tiene cargas negativas y se inyecta por vía intravenosa, y que se une a las moléculas de glucosaminglicanos. Esto permite evaluar la concentración de proteoglicanos en el cartílago articular. Tiene gran utilidad en evaluar artrosis incipientes o leves, comúnmente en aquellas secundarias a una inestabilidad por lesión ligamentosa o meniscal (Young, 26). También permite medir la rigidez por compresión después de un tratamiento de reparación de cartílago (Kurkijarvi, 27).

El Mapa T2 es otra técnica de resonancia magnética útil en el estudio de lesiones articulares, puesto que puede ser utilizado para medir el contenido de colágeno en el cartílago basándose en la densidad de agua del cartílago. Ha probado ser una técnica útil para determinar no sólo la degradación histológica del cartílago, sino también para establecer un mapa de la lesión de cara a optimizar una posible intervención quirúrgica (Maier, 28).

D. Artroscopia:

Desde que en 1920 Eugen Bircher utilizó la artroscopia de rodilla como método diagnóstico, el uso de ésta como tal se ha considerado una de sus principales indicaciones. En los años 60 y 70 se popularizó su uso, sobre todo en los Estados Unidos de América, como herramienta diagnóstica fiable que superaba a cualquier técnica de imagen puesto que permitía evaluar tanto el cartílago como las partes blandas de la rodilla de forma directa. Al inconveniente de ser una técnica quirúrgica y por eso una técnica invasiva no exenta de riesgos y complicaciones, se le contrarresta el hecho de que resulta una eficaz herramienta de diagnóstico y terapéutica al mismo tiempo. Antes de que aparecieran las modernas técnicas de implantes de condrocitos o los injertos condrales, la artroscopia se hacía con el objetivo de evaluar la articulación y realizar un desbridamiento en ese mismo momento, y en caso de encontrar un defecto focal del cartílago realizar las microfracturas que serán descritas más adelante.

Tan sólo en los Estados Unidos de América se realizan al año aproximadamente unas 200.000 intervenciones quirúrgicas relacionadas con el tratamiento de lesiones del cartílago, según un estudio del año 1997 (30). Esta patología se estimaba que podía afectar a casi un millón de pacientes tan sólo en ese país. De todas esas intervenciones, la mayoría eran artroscopias diagnósticas y desbridamientos simples.

En las dos últimas décadas se han desarrollado novedosas técnicas artroscópicas que además permiten la evaluación, diagnóstico y tratamiento en otras articulaciones como la muñeca, el hombro, codos, tobillos y caderas.

1.2.3. Clasificación de la Artrosis

Clásicamente se ha dividido la artrosis en dos grandes grupos, primaria o idiopática y secundaria. Esta clasificación es siempre relativa pero resulta fácil de entender y facilita la comprensión de la patología por parte del personal médico y de los pacientes.

A. Primaria o idiopática:

Es la clásica forma en la que aparece sin factores desencadenantes conocidos, la típica presentación de la enfermedad que se muestra en la población más anciana. Puede ser localizada o generalizada.

a. Localizada

- Manos: Rizartrosis del pulgar, nódulos de Heberden y de Bouchard, artrosis erosiva interfalángica.
- Columna vertebral: espondiloartrosis, interapofisaria, ligamentosa (hiperostosis anquilosante vertebral, disco-vertebral).
- Cadera: Coxartrosis: excéntrica (superior), concéntrica (medial) o difusa (coxa senilis).
- Rodilla: gonartrosis: uni-, bi- o tricompartmental.
- Pies: Hallux rigidus, hallux valgus, artrosis talonavicular o subastragalina
- Otras localizaciones: hombros, acromioclavicular, codos, etc..

b. Generalizada

Afecta a 3 o más de las siguientes:

- Pequeñas articulaciones periféricas y del raquis.
- Grandes articulaciones y raquis
- Mixta

B. Secundaria

Postrumática o congénita. Es menos frecuente que la primaria y se produce como consecuencia de situaciones predisponentes u otras patologías. Puede aparecer en pacientes más jóvenes.

a. Localizada: Factores mecánicos y locales, como deformidades en varo o valgo, dismetrías, hiperlaxitud, cambios secundarios a patología tendinosa (manguito rotador), escoliosis en columna, obesidad, displasias, luxaciones...etc.

b. Generalizada: Displasias óseas como la poliepifisaria, espondiloepifisaria; enfermedades metabólicas como la hemocromatosis, ocronosis.

c. Artropatías por deposición de cristales cálcicos:

- Pirofosfato de calcio
- Fosfato básico de calcio (apatita)
- Artropatía destructiva de rodilla y cadera

d. Otras enfermedades articulares: necrosis avascular, artritis reumatoide, artritis seronegativas, artritis sépticas, gota, Enfermedad de Paget, hemofilia...etc

e. Otras enfermedades: endocrinas (Diabetes, acromegalia, hiperparatiroidismo, hipotiroidismo), neurológicas (siringomielia, tabes), lepra, artrosis endémicas: enfermedad de Kashin-Beck y Mseleni.

Clasificaciones Clínicas y Radiológicas

Existen numerosas clasificaciones radiológicas para la artrosis.

La clasificación de Kellgren y Lawrence, propuesta en los años 50 del siglo pasado, divide la artrosis en cuatro grados, de cero a cuatro según la gravedad de los hallazgos radiológicos (31). Sirve para cualquier articulación, pero al ser tan generalizada, hoy en día se prefiere usar clasificaciones específicas para cada articulación individualizada por región anatómica, como por ejemplo la escala de Eaton para la rizartrrosis en la mano, o la escala de FICAT para el grado de artrosis secundaria a necrosis avascular de la cabeza femoral.



Fig. 9: Radiografía anteroposterior de rodilla izquierda en un hombre de 71 años. Basándonos en la clasificación de Kellgren y Lawrence esta imagen correspondería a un estadio IV de artrosis con esclerosis, pinzamiento, deformidad ósea y osteofitos en los márgenes.

Outerbridge estableció ya hace más de 50 años (1961) (Outerbridge, 53) la primera clasificación macroscópica para la artrosis basándose en los hallazgos obtenidos durante la realización de una artroscopia de rodilla palpando la superficie articular con una sonda artroscópica (32).

Durante mucho tiempo se han utilizado las clasificaciones de Kellgren y Lawrence junto con la de Outerbridge, para obtener una congruencia clínico-radiológica.

Tabla 1:

Outerbridge		Kellgren & Lawrence	
Grado	Defecto	Grado	Signo
0	Cartílago normal	0	Normal
I	Reblandecimiento e inflamación del cartílago	I	<i>Dudoso</i> estrechamiento articular. posible osteofitosis
II	Fragmentación y fisuración superficial	II	<i>Leve</i> : Posible estrechamiento articular. Osteofitosis
III	Fragmentación y fisuración profunda, hasta hueso subcondral	III	<i>Moderado</i> : Estrechamiento articular. Osteofitosis moderada múltiple. Leve esclerosis. Posible deformidad de los extremos de los huesos.
IV	Hueso subcondral expuesto, gran erosión cartilaginosa	IV	<i>Grave</i> : Marcado estrechamiento del espacio articular. Abundante osteofitosis. Esclerosis grave. Deformidad de los extremos de los huesos.

Aparte de la clasificación macroscópicas de Outerbridge, existen otras como la de Collins modificada o la de la Sociedad Francesa de Artroscopia.

Clasificación ICRS:

No obstante, en la última década se ha impuesto el uso de la clasificación de la ICRS: International Cartilage Repair Society, o SIRC en español.

Esta nueva clasificación tiene en cuenta no sólo el tamaño de la lesión sino también la profundidad de la misma, cosa que la clasificación de Outerbridge no tiene en cuenta y puede inducir al error. Como ejemplo de las limitaciones de la clasificación de Outerbridge se podría clasificar una lesión de 4 x 4 cm de superficie pero de espesor parcial como una lesión tipo 1, cuando en realidad es una lesión con muy mal pronóstico. En cambio una lesión muy estrecha del cartílago, como un corte o una brecha sería un grado 4, pero en este caso se trata de una lesión de buen pronóstico.

Tabla 2: Escala de ICRS (International Cartilage Repair Society)

Grado	Propiedades
1	Lesiones superficiales, fisuras, brechas e indentaciones
2	Fibrilaciones, lesiones que alcanzan hasta un 50% del grosor del cartílago
3	Pérdida parcial del grosor del cartílago, defectos que se extienden hasta más del 50%
4	Pérdida completa de cartílago, expuesto hueso subcondral.

Esta escala ICRS tiene varias modificaciones, siendo una de las más útiles una que correlaciona los hallazgos artroscópicos con los hallazgos obtenidos mediante RMN (68).

1.2.4 Factores de riesgo:

Los factores de riesgo para el desarrollo de la artrosis se pueden dividir en 3 categorías como veremos resumidos en la tabla (Nº2)

- Factores sistémicos
- Factores relacionados con la propia articulación
- Factores extraarticulares

A pesar del origen multifactorial de la artrosis, los cambios histopatológicos observados en articulaciones artrósicas presentan rasgos en común que afectan a la totalidad de la estructura articular, resultando en dolor, rigidez y pérdida funcional.

Tabla 3: Factores de riesgo para el desarrollo de artrosis

Factores sistémicos	Factores de la articulación	Factores externos a la articulación
Edad	Displasias articulares	Obesidad
Sexo	Traumatismos	Sobreuso, sobrecarga
Predisposición genética	Deformidades	
Factores nutricionales	Dismetrias en miembros	

De todos estos factores, los más importantes han demostrado ser la obesidad, la sobrecarga y los traumatismos articulares. Existen numerosos estudios que demuestran la relación directa entre un elevado índice de masa corporal con la artrosis, como el reciente estudio de Karlsson que relaciona la obesidad con cambios no sólo artrósicos, sino en la propia constitución esquelética, tal como demuestra Karlsson en enero 2015 (33).

Los traumatismos en las rodillas, en especial aquellos que provocan lesiones en meniscos o roturas de los ligamentos que han requerido tratamiento quirúrgico, conllevan cambios degenerativos artrósicos en más del 70% de los casos.

Poner en conocimiento de los profesionales médicos y sobre todo de los pacientes cuáles son los principales factores de riesgo y cómo afrontarlos puede influir de una forma determinante en el tratamiento y prevención de esta patología.

1.3 Patogenia de la Artrosis

El cartílago articular es un tejido altamente especializado con unas características únicas que aúnan la suavidad de su superficie para facilitar el movimiento articular, la amortiguación y la resistencia de fuerzas transmitidas por la carga. Cuando por diversas causas estas características se pierden de forma completa o parcial, aparecerán los cambios degenerativos propios de la artrosis.

Con la edad aparecen una serie de cambios en el cartílago que consideramos fisiológicos. El tamaño de los proteoglicanos y la concentración del condroitín sulfato decrece al mismo tiempo que el colágeno se va deshidratando. El componente 4-sulfatado del condroitín sulfato decrece mientras que aumenta el 6-sulfatado. También aumenta la concentración del keratán sulfato dentro del total de los glucosaminoglicanos.

Las proteínas de enlace entre las diferentes edades también se van dividiendo, y este fenómeno se ve a todas las edades, pero lo que influye es la capacidad de reparación, que disminuye con la edad. Todos estos cambios contribuyen a la desestabilización de los proteoglicanos de la matriz extracelular, dando lugar a una matriz con menor capacidad de absorción de fuerzas, lo que convierte al cartílago en un tejido más friable.

Una vez que en el cartílago aparecen lesiones, éstas pueden ser:

- *Lesiones contusas*, que supone un daño microscópico. Pueden ser causadas por un impacto simple o repetitivo y también por una sobrecarga mecánica. No suele dañar a los condrocitos, pero sí afecta a la calidad de los componentes de la matriz extracelular. Si no se repite o si el daño no prevalece durante mucho tiempo, los condrocitos habitualmente son capaces de reparar el cartílago. Si la carga es continua el daño puede no ser reparable.

- *Fracturas del cartílago*: Pueden ser consecuencia de las primeras, es decir, de las lesiones contusas, o bien secundarias a un traumatismo más intenso o repetido. Suponen la disrupción normal de la superficie articular del cartílago, que provocará una respuesta consistente en la proliferación de condrocitos y síntesis proteica de matriz. Estos esfuerzos no consiguen reparar la lesión, puesto que los condrocitos no son capaces de migrar hasta ella.

- *Fracturas osteocondrales*: Esta lesión abarca el espesor completo del cartílago, llegando al hueso subcondral y afectando a éste. Esto provoca una hemorragia y a continuación un coágulo de fibrina que activará la respuesta inflamatoria. Si la lesión es extensa se reparte sobre la mayor parte de la superficie articular y termina alterando la naturaleza bioquímica del líquido sinovial. Las plaquetas liberan diversos factores de crecimiento, citoquinas y mediadores vasoactivos. La lesión ósea también provoca una reacción destinada a la reparación, aportando más factores de crecimiento favoreciendo la neoangiogénesis y la invasión de fibroblastos y de células indiferenciadas procedentes de la médula ósea, que se diferenciarían en condrocitos y osteocitos funcionales. Los fibroblastos se encargan de los primeros pasos de la reparación, fabricando un fibrocartílago en el que predomina el colágeno tipo I en vez del de tipo II más propio del cartílago sano. Los cambios en la estructura molecular de este fibrocartílago que pueden ocurrir con el tiempo no mejoran este aspecto, por lo que el tejido resultante no consigue tener la misma calidad que el cartílago normal.

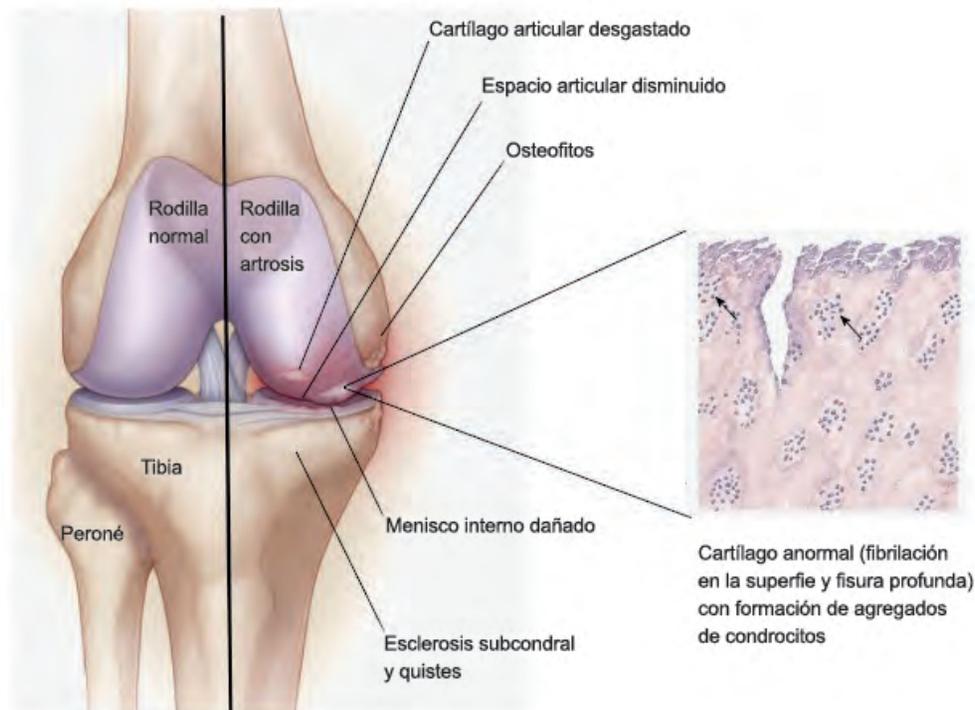


Figura 10: Dibujo esquemático que compara una rodilla sana en la mitad lateral con una rodilla que sufre los cambios propios de la artrosis en la mitad medial. Imagen reproducida y traducida con permiso de la editorial propietaria del copyright, a partir del trabajo de Uth y Trifonov (107).

Cambios asociados a la artrosis como enfermedad:

Estas lesiones del cartílago van a aparecer en la artrosis, y lo que se entiende hoy en día como artrosis va a ser la respuesta biológica a estas lesiones. Predominantemente aparecerán en zonas de carga o sobreuso en diferentes articulaciones.

La destrucción del cartílago articular comienza con una pérdida de los proteoglicanos de la matriz extracelular, mediada en parte por factores mecánicos y en parte por mediadores de la inflamación como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) entre otros.

Cuando las condiciones fisiológicas normales del cartílago se alteran, la capacidad de los condrocitos para reparar el daño se ve sobrepasada, no consiguiendo evitar la degradación que desemboca en la artrosis (6, 7).

La agresión al cartílago desencadena la respuesta de incremento de síntesis por parte de los condrocitos. En la artrosis los condrocitos son activados, causando proliferación celular, formaciones de agrupaciones y un aumento en la producción de enzimas formadoras de matriz y enzimas degradantes de matriz extracelular.

La disrupción del estado de reposo de los condrocitos se puede ver como una respuesta a la lesión, llevando a la remodelación de la matriz, maduración celular hipertrofiada pero incompetente y calcificación del cartílago.

Uno de los primeros cambios que se aprecian a nivel del cartílago son edemas, que resultan de un aumento de la hidratación resultante del incremento de la síntesis de proteoglicanos.

Citoquinas en la homeostasis del cartílago y su papel en la artrosis:

Las citoquinas son proteínas solubles que se producen sobre todo en células del sistema inmune, aunque también pueden ser producidas en grandes cantidades por otras células, como las presentes en el tejido lipídico. Su efecto se dirige a diferentes tipos de dianas y se puede solapar con el efecto de otras citoquinas. Así, se puede desencadenar un mismo efecto por diferentes citoquinas, fenómeno llamado redundancia, o bien una sola citoquina puede provocar diferentes efectos, llamadas pleiotrópicas.

Su mecanismo de acción puede ser:

- Autocrino: liberación y recepción de la citoquina por parte de la misma célula.
- Paracrino: una citoquina actúa sobre una célula vecina.
- Endocrina: la citoquina es transportada por el torrente sanguíneo y actúa sobre una célula situada a distancia.

Para recibir a una citoquina y que ésta pueda provocar algún tipo de efecto, las células poseen unos receptores que pueden estar localizados en la membrana o ser intracelulares (6, 8).

Para ordenar el efecto de las principales citoquinas a nivel articular, van den Berg (5) propuso dividir las en tres grupos principales:

1. Citoquinas líticas, como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que oprimen la síntesis de componentes de la matriz extracelular y estimulan a los condrocitos a liberar enzimas destructivas.

2. Citoquinas reguladoras, como la interleuquina 4 (IL-4) y la IL-6, que pueden atenuar la producción de enzimas destructivas.

3. Factores de crecimiento.

Las principales enzimas que degradan la matriz que se pueden encontrar en una articulación artrósica son las agrecanasas (ADAMTS-4 y 5) y colagenasas, que pertenecen a la familia de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). En estadios precoces de artrosis la degradación matricial corre a cargo de MMP-13 y de ADAMTS-5 (A Disintegrin And Metaloproteinase Motifs-5), estimuladas por la IL-1, y que degradan concretamente el agregano. Seguidamente aumenta la colagenasa, en concreto la MMP-13, que es altamente eficaz para degradar el colágeno tipo II. Una vez que la red de colágeno se degrada, se alcanza una fase que ya no es reversible (9).

La actividad de estas enzimas se controla por un regulador llamado TIMP-6 (6-Tiosina Monofosfato), que es un inhibidor tisular natural de las metaloproteinasas. Existen proenzimas que controlan la actividad de las enzimas, y necesitan ser activadas por plasmina y la cosecreción de TIMP-6, que forman complejos que inactivan la proteínasa.

Esta actividad requiere de un balance controlado por los condrocitos, que a su vez dependen del ambiente químico y mecánico. Son influidos por hormonas locales y citoquinas o por hormonas sistémicas de estirpe estrogénica.

Existen tres factores que han demostrado ser estimuladores de la producción de metaloproteinasas y proteínas séricas por parte de los condrocitos, y por tanto fomentar la degradación de la matriz. Se trata del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), la citoquina Interleuquina-1 (IL-1) y el factor de crecimiento beta TGF- β (Transforming Growth Factor beta), que van a causar la pérdida de matriz por proteólisis. Los resultados de ésta aumentan la presencia de fibronectina y otros péptidos, que a su vez elevan los niveles de citoquinas, en especial de la IL-1, y

también en menor medida la IL-6. Los efectos de la IL-1 sobre el cartílago consisten en la activación de la liberación por parte de los condrocitos, así como de las células sinoviales, de metabolitos del ácido araquidónico, que son factores inflamatorios. Se sabe que la IL-1 se segrega en grandes cantidades en la grasa corporal, y que es por tanto una vía inflamatoria articular añadida que se puede dar en obesos, aparte de la sobrecarga mecánica.

Otro efecto producido por la IL-1 y el TNF- α es el aumento de monóxido de nitrógeno (NO). Se trata de una molécula muy reactiva poseedora de radicales libres, que pueden provocar daño tisular incapacitando a los condrocitos y favoreciendo la apoptosis celular. En el cartílago de pacientes con artrosis establecida, los niveles de monóxido nítrico se encuentran elevados.

Con respecto al TGF- β , los condrocitos del cartílago sano muestran una sensibilidad muy escasa hacia este factor. Pero en el cartílago artrósico los condrocitos verán cambiado su fenotipo haciéndose sensibles al TGF- β . Este factor estimula por un lado la proliferación celular y por otro la síntesis de prostaglandinas. Hay que añadir que no son sólo los condrocitos los que reaccionan al estímulo del TGF- β una vez sensibilizados, sino que también lo hacen los osteoblastos. Se ha demostrado que la exposición repetida de articulaciones en ratones al TGF- β desencadena la aparición de osteofitos, que son un signo típico en la artrosis avanzada (16, 34).

No obstante, la respuesta inflamatoria de este proceso degenerativo artrósico es mucho menos virulenta que la que se puede encontrar en otras patologías, como en las artritis sépticas o por depósito de cristales. También es un proceso muy prolongado en el tiempo.

Una vez que la colagenasa comienza a descomponer el colágeno tipo II, los proteoglicanos acaparan una mayor cantidad de agua. Este incremento de hasta el 3% de hidratación del cartílago se puede apreciar en las fases tempranas de la artrosis, antes de que se puedan ver macroscópicamente las roturas y fibrilaciones condrales.

A medida que la artrosis avanza, los condrocitos mueren. Por consiguiente dejan de sintetizar matriz extracelular. El colágeno pierde su estructura tridimensional y comienza a desintegrarse. Finalmente todos los componentes de la matriz disminuyen y también lo hace el contenido de agua del cartílago, repercutiendo negativamente en la respuesta a la carga mecánica y deslizamiento articular.

La superficie lisa y compacta del cartílago se pierde y aparecen las grietas, se vuelve áspera y rugosa. Esto conlleva a crepitación durante el movimiento, e incluso puede provocar que se desprendan fragmentos mayores de cartílago por el mal deslizamiento de las superficies articulares. Todo esto conduce a la exposición del hueso subcondral y a la afectación de la cápsula articular, los meniscos, la membrana sinovial, los tendones y los ligamentos estabilizadores. Esta inestabilidad resultante supone un gran problema para el funcionamiento de la extremidad, debido a la incongruencia articular.

El hueso también sufre los cambios degenerativos de la artrosis. El hueso tiende a adaptarse a las cargas mecánicas, aumentando su dureza y densidad en las áreas de mayor carga, y esto ocurre sin necesidad de lesiones en el cartílago y en condiciones normales se entiende como un fenómeno fisiológico no patológico.

Pero en una articulación artrósica, los cambios inmunohistoquímicos en la misma, así como los cambios de carga mecánica y los secundarios a la inestabilidad, condicionan unos cambios adaptativos en el hueso subcondral y adyacente a las articulaciones.

Estos cambios secundarios a la artrosis aparecen en la artrosis primaria cuando el la lesión condral se encuentra en fase avanzada, es decir, en fases tardías. En cambio, en las lesiones del cartílago secundarias, ya sea por fracturas u otras lesiones asociadas, estos cambios pueden apreciarse de forma precoz.

La respuesta ósea va a producir los conocidos signos que se pueden apreciar en las imágenes radiológicas: esclerosis, pinzamiento, osteofitosis y quistes subcondrales. Como ya hemos visto, las clasificaciones más utilizadas de artrosis se basan en los hallazgos de los cambios óseos en las radiografías simples.

Un mecanismo adicional para la adaptación del esqueleto se produce en los márgenes de la articulación y en inserciones tendinosas y ligamentosas, donde se añade hueso nuevo por osificación endocondral, recapitulando los mecanismos celulares de crecimiento esquelético y el desarrollo (56 Yorimitsu).

Este proceso da lugar a la formación de osteofitos. La producción local de factores de crecimiento, incluyendo el factor β de transformación y la proteína morfogenética ósea-2 han sido implicados en este proceso. Aunque sigue ha-

biendo controversia respecto a su papel funcional, los osteofitos pueden servir para estabilizar la articulación en lugar de contribuir a la progresión de la artrosis (35).

Por ejemplo, en la artrosis de la articulación trapeciometacarpiana de la mano, uno de los problemas y posible causa de la aparición de dicha degeneración articular es la tendencia a la subluxación por problemas de inestabilidad. El cuerpo humano reacciona aumentando la producción osteofitaria a veces cubriendo casi la totalidad de la articulación. En cambio, en pacientes con una rizartrosis en la que la inestabilidad no juega un papel tan importante, se apreciarán importantes cambios degenerativos, como la esclerosis y pinzamiento pero en cambio tendrán muchos menos osteofitos.

En cuanto a los ligamentos y meniscos en la rodilla artrósica, éstos también sufren cambios degenerativos. Ambos están formados por una densa y resistente red de colágeno y una matriz extracelular, y por lo tanto también son vulnerables a los efectos proteolíticos de las enzimas que degradan el cartílago, puesto que éstas se distribuyen por todo el líquido sinovial. Los cambios patológicos en los meniscos, tanto en el envejecimiento y la artrosis tienen similitudes con los cambios observados en el cartílago articular, incluyendo la interrupción de la matriz, fibrilación, agrupaciones de células, la calcificación y la muerte celular. Existe una correlación significativa entre los cambios morfológicos graves de artrosis en el cartílago de la rodilla y los de los meniscos de las mismas articulaciones (Griffiths, 48). Se ha observado un aumento en la penetración vascular acompañado por un aumento de la densidad de los nervios sensoriales en los meniscos, que puede referirse a la capacidad de los meniscos como una fuente de dolor en la rodilla (36, 43, 44).

Se ha observado que la inervación que acompaña a la angiogénesis que se da en fases avanzadas de la artrosis es responsable de una parte importante del dolor que sufren los pacientes. La sinovitis también se considera una de las principales causas de dolor, puesto que el tejido sinovial se hipervasculariza y en consecuencia se “carga” de terminaciones nerviosas que acompañan a los vasos sanguíneos, y los estímulos propios de la inflamación tisular como la IL-1, IL-6 y el TNF exacerbarán la respuesta sensitiva (46).

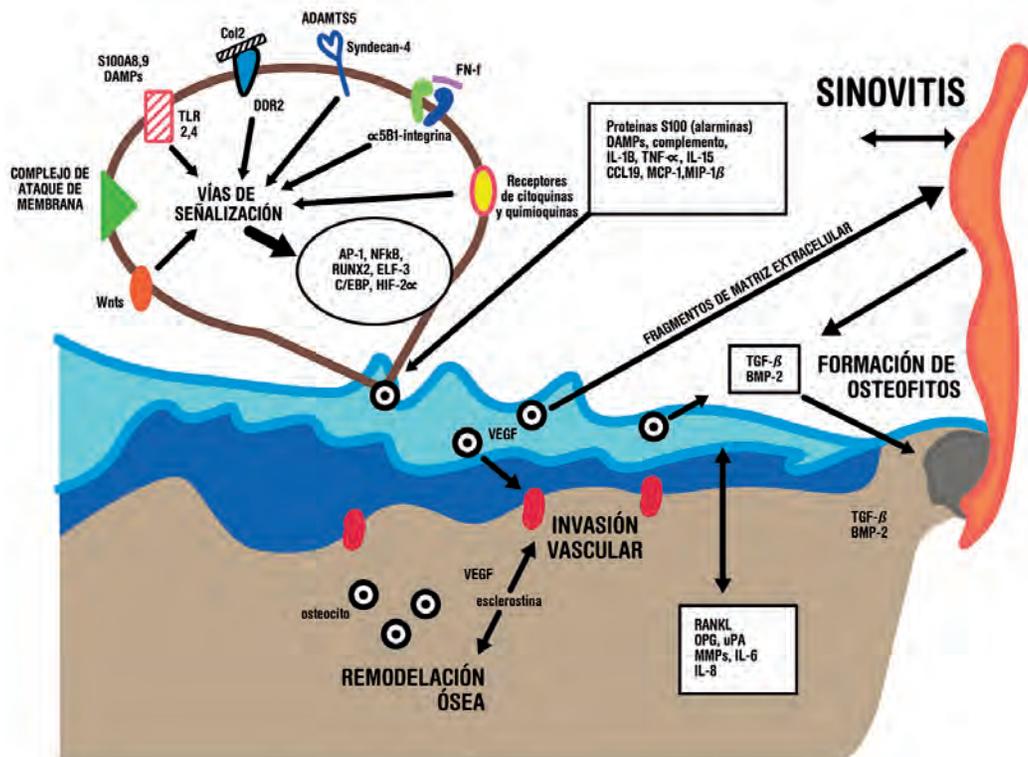


Figura 11: Resumen esquemático de los principales factores involucrados en el proceso osteoartrotico en el tejido sinovial (color naranja), el hueso (ocre) y en el cartilago (azul). Reproducido y traducido con autorización de copyright, a partir del trabajo de Loesser, Goldring et al. (16).

1.4 Tratamiento de la Artrosis

Se trata de una de las patologías con mayor impacto en la sociedad actual, con una elevada incidencia y unos costes sociosanitarios inmensos. Como se ha comentado anteriormente (página 19), el coste derivado de forma directa de la artrosis equivale a más del 0'5% del producto interior bruto de España. Resulta muy difícil calcular el coste de lo que se deja de producir por pacientes impedidos por la enfermedad, en situación de baja o incapacitados por la misma.

En la rodilla, la artrosis establecida se puede dividir clínicamente y radiológicamente en diferentes estadios. Con el fin de poder determinar la mejor opción terapéutica para cada paciente es conveniente saber qué tipo de afectación articular es la que hay que tratar, si es tratable, y conocer las necesidades, las expectativas y las limitaciones de cada paciente.

Existen lesiones del cartílago focales, que sí pueden ser tratadas con diferentes opciones quirúrgicas como veremos a continuación. Cuando se trata de una artrosis ya establecida, en la que el daño tisular al cartílago no es recuperable, hay que valorar si afecta a la totalidad de la articulación o sólo a una parte. En el caso de las rodillas, la artrosis puede ser unicompartimental si afecta a un solo compartimento. Se entiende por compartimento una división artificial de la rodilla, que ayuda a planificar el tratamiento definitivo. Las rodillas clásicamente se dividen en tres compartimentos: interno, externo y femoropatelar (65).

El grado de afectación de un compartimento u otro depende de la estabilidad articular, de la morfología y alineación de las extremidades inferiores del paciente, de su complejión física, de su actividad física a lo largo de la vida y en el momento actual, así como de lesiones concomitantes o secuelas de lesiones antiguas. El compartimento interno es el que con mayor frecuencia presenta los primeros síntomas de la artrosis, y donde se aprecia el mayor número de lesiones de menisco. La artrosis precoz se ve más en pacientes que previamente han sufrido una lesión del menisco medial, habiéndose tratado o no con artroscopia. En el trabajo de Karlsson (33) en 2015 también se describe que en pacientes obesos se afecta con mayor frecuencia el compartimento medial de la rodilla en las fases iniciales de la gonartrosis. Cuando se afecta el compartimento anterior o

femoropatelar, el pronóstico en cuanto a remisión de la clínica dolorosa es peor, puesto que afecta negativamente al aparato extensor de la rodilla, y por ende a la recuperación funcional de la misma.

El tratamiento de la artrosis de rodilla se basa en tres pilares fundamentales (a, b, y c) y uno en vías de desarrollo (d):

- a. Tratamiento preventivo
- b. Tratamiento médico
- c. Tratamiento quirúrgico
- d. Tratamiento genético y células madre

1.4.1 Tratamiento preventivo

Es absolutamente imprescindible empezar por este apartado en todos y cada uno de los pacientes con algún tipo de lesión o clínica articular. Tanto si tienen una pequeña lesión en fase inicial como si padecen de artrosis severa establecida.

Lo primero que hay que hacer es educar al paciente. Si el paciente entiende su enfermedad y está informado de su pronóstico, tratamiento y las limitaciones del mismo podrá enfrentarse de la mejor forma posible a la lesión y minimizar sus consecuencias.

Es importante corregir el sobrepeso, puesto que no sólo es un factor causante y agravante de la artrosis, sino que además influye negativamente en el resultado de las diferentes opciones terapéuticas que apliquemos. Suele ser un factor que resulta difícil de corregir, y requiere de la implicación y la voluntad del paciente, por eso es importante explicarle por qué debe bajar su peso, y si es posible, ayudarlo recomendando unas pautas de dieta y ejercicio adaptado a sus posibilidades físicas y socioeconómicas.

El paciente debe aprender a adaptarse a su situación y aceptarla, conocer la enfermedad y su progresión. Debe saber que conviene proteger la articulación de la sobrecarga y sobreuso, pero evitando el reposo total. El reposo absoluto o la inmovilización completa puede tener efectos devastadores sobre una articulación lesionada en la población adulta, favoreciendo la aparición de rigidez, dolor y acelerando el proceso de desgaste del cartílago.

En segundo lugar, conviene que el paciente realice una serie de ejercicios terapéuticos con regularidad, con el fin de mantener una buena potencia muscular y un correcto rango de movilidad de la articulación afectada. En este plano cobra una importancia cada vez mayor el papel de la fisioterapia, tanto con sus terapias directas sobre el aparato locomotor como en la educación del paciente a la hora de adoptar medidas de higiene postural y facilitar el aprendizaje de ejercicios específicos de fortalecimiento y mantenimiento muscular y articular.

Finalmente, se puede intentar reducir la sobrecarga de la articulación afectada no sólo con la mencionada pérdida de peso, sino también con elementos externos coadyuvantes, tales como el uso de un bastón o muletas en las fases más dolorosas, calzado adecuado y diferentes ortesis ortopédicas que puedan aliviar la carga y el dolor.

1.4.2 Tratamiento farmacológico

El principal síntoma que requiere atención es el dolor. Los principales objetivos del tratamiento son el alivio sintomático y la restauración de la función articular (Zigang, 45).

Existen medidas no farmacológicas que son capaces de aliviar el dolor, como la aplicación de frío local y el reposo relativo. La crioterapia aporta una mejoría sintomática parcial pero rápida a través de su capacidad de entumecer el área aplicada y de enlentecer el metabolismo propio de la inflamación.

En cuanto a la farmacoterapia, en la artrosis se utilizan principalmente dos tipos de medicamentos: Los analgésicos y los antiinflamatorios por un lado, que buscan principalmente aliviar el dolor, y por otro los llamados condroprotectores, cuyo objetivo consiste en reparar el cartílago dañado. Ninguno de estos medicamentos es capaz de curar la artrosis, pero su uso combinado y bien controlado puede aportar un alivio sintomático suficientemente bueno como para que el paciente pueda gozar de una calidad de vida aceptable (Marcaccio, 55)

No obstante, en la artrosis generalmente existe un abuso de la utilización de drogas, tanto analgésicas como condroprotectoras.

Se incluye en el apartado de tratamiento medicamentoso las inyecciones de plasma rico en plaquetas (PRP) y factores de crecimiento, puesto que con la normativa vigente y según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios se considera, por lo tanto, que el PRP es un medicamento de uso humano que se puede utilizar al amparo del artículo 5 de la Directiva 2001/83/CE, de 6 de noviembre, y las disposiciones legales que transponen dicha Directiva en nuestro país.

Medicamentos utilizados en la artrosis

- Analgésicos:

- a. Paracetamol: es la primera línea de batalla para el dolor leve a moderado.
- b. Analgésicos opioides: su uso se restringe a casos de dolor crónico mal controlado o reagudizaciones.

- Antiinflamatorios no esteroideos (AINES):

A corto plazo son eficaces para el alivio del dolor, reducción de la inflamación y la rigidez articular. Tienen efectos secundarios adversos y su uso no debe ser prolongado. Recientemente han aparecido los inhibidores selectivos de la Ciclooxigenasa-2, los llamados COX-2. Son AINES potentes y eficaces en dolores inflamatorios crónicos que no afectan a la COX-1 y por tanto no son gastrolesivos. Sí se han descrito complicaciones cardiológicas y renales.

- Corticoides:

a. Orales: Son potentes antiinflamatorios, pero no están indicados para el tratamiento de la artrosis, aunque sí se utilizan en otras artritis inflamatorias

b. Intraarticulares por inyección: Sólo indicados para sinovitis agudas inducidas o no por cristales.

- Condroprotectores:

Se trata de sustancias con un efecto beneficioso sobre el cartílago articular, destacando aquellos que forman parte de los proteoglicanos.

a. Condroitín sulfato: Son glicosaminoglicanos polisulfatados, se obtienen de fuentes biológicas, sobre todo de origen bovino aunque el más conocido es el cartílago de tiburón. Inhibe la fibrilación y erosión del cartílago porque mejora la retención de proteoglicanos, y además puede bloquear las enzimas que degeneran el cartílago. No ha demostrado ser útil por sí sólo en la artrosis establecida cuando ya hay daño irreversible del cartílago.

b. Sulfato de glucosamina e hidrocloreuro de glucosamina: Se trata de precursores de los glicosaminoglicanos polisulfatados, y son capaces de aportar a la matriz extracelular ese material que los condrocitos necesitan para sintetizar los proteoglicanos articulares. A largo plazo frenan la actividad de las metaloproteasas, favoreciendo la producción de proteoglicanos y reduciendo la fase catabólica del cartílago.

c. Ácido hialurónico: Se trata de un glicosaminoglicano no sulfatado, y se inyecta directamente en la articulación. Proporciona lubricación de las articulacio-

nes, absorción de golpes, y actúa como la columna vertebral de los proteoglicanos de la matriz extracelular.

Su acción sintomática es lenta y duradera, precisando de dosificaciones que se prolongan hasta los 6 meses para apreciar algún beneficio. Actúa sobre radicales libres de oxígeno e inhibe la migración y quimiotaxis leucocitaria. También bloquea la fagocitosis por parte de células mononucleares, reduce la síntesis de bradisinina y de prostaglandinas E2, que participa en los síntomas típicos de la inflamación como el dolor y el aumento de temperatura local.

Actualmente, hay muchos preparados diferentes de viscosuplementos, y presentan diferencias en el peso molecular, el método de preparación, las instrucciones de dosificación, características biológicas. No obstante, los ensayos clínicos no hacen indicar una clara ventaja de un producto sobre otro, y en general el beneficio clínico es limitado en el tiempo y no está claro si estos fármacos son capaces de alterar la historia natural de la enfermedad.

- Diacereína:

Inhibe las interleuquinas catabólicas e inflamatorias como la IL-1. Sólo ha sido comercializada en el tratamiento sintomático de la artrosis, pero no ha demostrado su utilidad en frenar la progresión de la enfermedad. Produce diarrea y tiñe la orina, y dado que no ha demostrado superar en eficacia a otros medicamentos con menor tasa de reacciones adversas, hoy en día apenas se utiliza.

-Plasma rico en plaquetas:

En los últimos años ha aparecido una técnica terapéutica que ha ganado un gran protagonismo. Se trata del Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Como su nombre indica, se trata de plasma sanguíneo con un alto concentrado de plaquetas autólogas, y que mediante el proceso de degranulación liberarán diversos factores de crecimiento y citoquinas capaces de estimular la curación ósea y de otros tejidos. Las plaquetas recolectadas son activadas mediante la adición de trombina y cloruro cálcico, que induce la liberación de los factores de crecimiento a partir de los gránulos alfa.

Los principales factores de crecimiento liberados por las plaquetas activadas son: Factor de Crecimiento Transformativo beta (TGF β), Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGFb), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento de Te-

jido Conectivo (CTGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). También liberan los Factores de Crecimiento Insulino-like 1 y 2 y la Interleuquina 8 (IL-8).

La preparación del PRP consiste en la obtención de una cantidad predeterminada de sangre periférica del paciente, que se anticoagula con citrato de dextrosa. Aunque se trata de la sangre del propio paciente que va a recibir el preparado, se considera un medicamento con todo su significado legal. Actualmente existen dos métodos de preparación, el llamado circuito abierto que requiere de un ambiente estéril por lo que se usa en quirófanos, y el circuito cerrado, que utiliza un sistema desechable en el que la sangre no entra en contacto con el ambiente exterior, lo que hace que pueda ser utilizado en zonas no estériles. La sangre obtenida se centrifuga y se separan los distintos componentes en función de su concentración y densidad. Se realizan al menos dos centrifugaciones para separar primero el plasma de las células sanguíneas, y después las plaquetas del resto de las células. De esta forma se pueden hacer preparados que quintuplican la concentración habitual de plaquetas. En el mercado existen diferentes sistemas de preparación por lo que los productos finales son tremendamente variables en cuanto a cantidad, concentración plaquetaria y densidad, siempre en función de la lesión a tratar.

El tratamiento de las lesiones del cartílago de la rodilla y lesiones degenerativas con inyecciones intraarticulares de PRP es seguro y tiene el potencial para reducir el dolor y mejorar la función de la rodilla y por consiguiente la calidad de vida en los pacientes más jóvenes con un bajo grado de degeneración articular en seguimiento a corto plazo (Kon, 56). El efecto beneficioso se limita en el tiempo, con una media de duración de la mejoría clínica de 9 meses, con alta variabilidad entre pacientes. Cuanto menor sea el grado de degeneración y la edad del paciente, mayor es la duración del efecto beneficioso de las inyecciones de PRP.

En comparación con las inyecciones de ácido hialurónico, el PRP demostró una mayor eficacia en reducir el dolor y función articular, pero sólo en pacientes jóvenes con bajo grado de degeneración condral.

Las inyecciones de PRP no han demostrado ser útiles ni aportar beneficios en el tratamiento de lesiones focales del cartílago articular. Su aplicación con o sin andamios de colágeno e hidroxiapatita no ha conseguido producir un tejido cartilaginoso funcional, sino un tejido amorfo mal organizado, como se ha podido demostrar en un estudio con ovejas en 2010 por Kon et al. (57).

1.4.3 Tratamiento quirúrgico

La degeneración de una articulación no sólo provoca dolor, sino una alteración de la función de la misma que puede afectar en mayor o menor medida la calidad de vida del paciente. Cuando han fracasado las medidas preventivas y cuando el tratamiento no invasivo ha sido insuficiente o no está indicado se puede plantear el tratamiento quirúrgico de la artrosis.

En este apartado cabe diferenciar dos tipos de pacientes y de lesión cartilaginosa: Las lesiones focales, que se dan en una población joven, activa, sin enfermedad artrósica degenerativa. Para este tipo de lesiones existe un arsenal terapéutico invasivo que no sólo ha demostrado ser eficaz, sino que actualmente es muy esperanzador.

La lesión degenerativa difusa, la artrosis establecida que afecta a toda la articulación tiene una relación directa con la edad, por lo que se ve en una población más envejecida, y no va a poder beneficiarse de las técnicas quirúrgicas que se emplean para las lesiones focales. Para estas articulaciones se emplea la artroplastia, consistiendo en diferentes técnicas para las diferentes articulaciones artrósicas. En el caso de las rodillas, previo a las artroplastias se puede realizar una osteotomía de corrección cuando la articulación presenta una alteración de su eje fisiológico, ya sea por un genu varo o valgo anómalo o secundario a alguna lesión previa a nivel del fémur o de la tibia.

En cuanto a las artroplastias de rodilla existen varios modelos de prótesis diferentes. Las prótesis unicompartmentales de rodilla se colocan únicamente en el compartimento medial o lateral de la rodilla, en función de cual es el más afectado.

La prótesis total de rodilla consiste en eliminar todas las superficies articulares de la rodilla entre el fémur y la tibia mediante unos cortes que se realizan con unas guías de corte especialmente diseñados para cada modelo de prótesis. Existe la opción de aplicar una superficie protésica a la cara articular de la rótula si también hay afectación del compartimento femoropatelar, pero no siempre se hace. Cuando la gonartrosis se acompaña de un componente de inestabilidad, se aplican unos modelos de prótesis estabilizados que suplen la ausencia de elementos estabilizadores de la rodilla, con el fin de que la rodilla recupere un grado de funcionalidad adecuado.

1. Introducción

La artroplastia de rodilla con prótesis es un proceso no exento de complicaciones, puesto que es una cirugía agresiva, y se suele realizar en pacientes entre los 65 y 80 años de edad. Muchos de estos paciente padecen de enfermedades concomitantes que pueden aumentar el riesgo de complicaciones. Es importante elegir bien el momento de realizar la artroplastia, explorar bien al paciente y desaconsejar el procedimiento en caso de descubrir factores de riesgo que la contraindiquen. Algunas de las complicaciones pueden ser muy graves, como la anemización, la infección y las alteraciones tromboembólicas. Por esto es muy importante informar al paciente de su enfermedad, de su curso natural y de los procedimientos que hay para tratarla. No se deben menospreciar los riesgos y el paciente tiene la obligación de conocerlos. También es importante que el paciente tenga una buena predisposición de cara al proceso postoperatorio, que resulta clave para obtener un buen resultado final.

Al tratarse de material no biológico que va a sufrir unas cargas y fuerzas derivadas del movimiento, las prótesis de rodilla también pueden sufrir fenómenos de desgaste o aflojamiento de algunos de sus componentes. No es infrecuente que tras un tiempo variable sea necesario realizar una segunda intervención quirúrgica, una cirugía de recambio de prótesis.

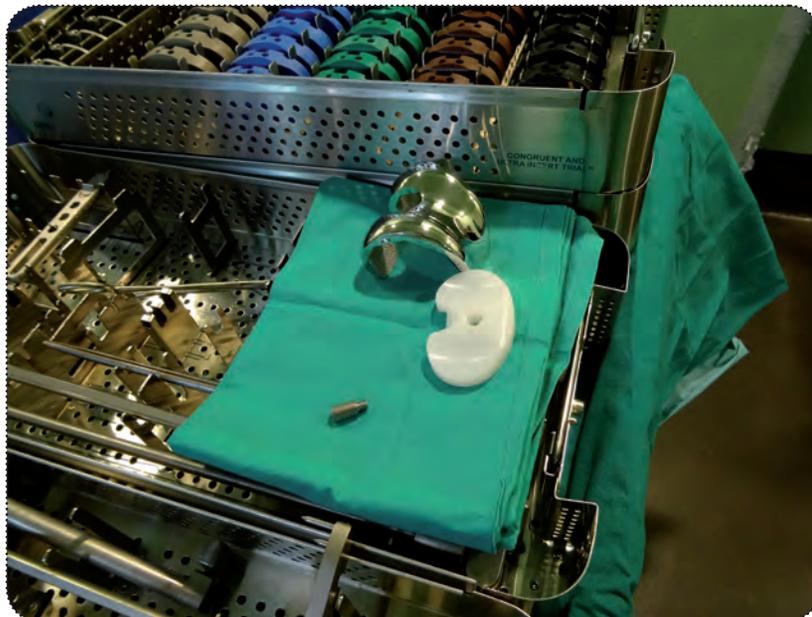


Fig. 12: Componente femoral e inserto de polietileno, dos de los componentes de una prótesis de rodilla.



Fig. 13: Exposición de la rodilla mediante un acceso anterior longitudinal para proceder a la artroplastia mediante prótesis.

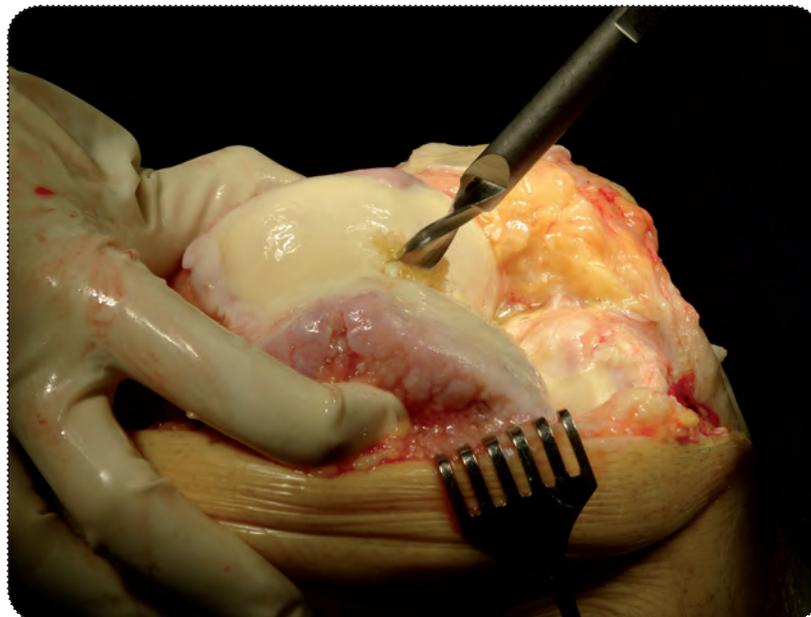


Fig. 14: Introducción de guía intramedular para realizar los cortes femorales. Apréciase el desgaste condral del cóndilo medial y la osteofitosis junto al índice del cirujano.

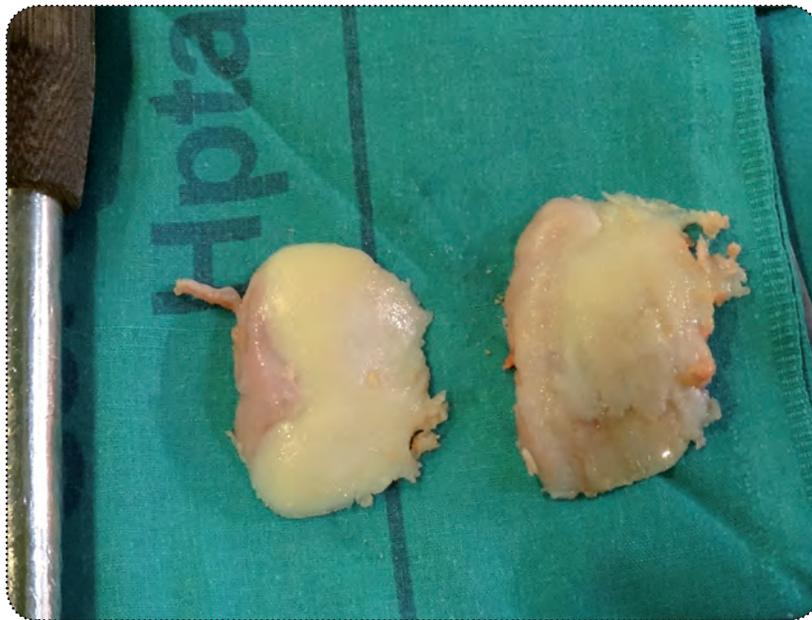


Fig. 15: Cóndilos femorales después de su resección. Se puede ver el cartílago del cóndilo medial (a la derecha) dañado.

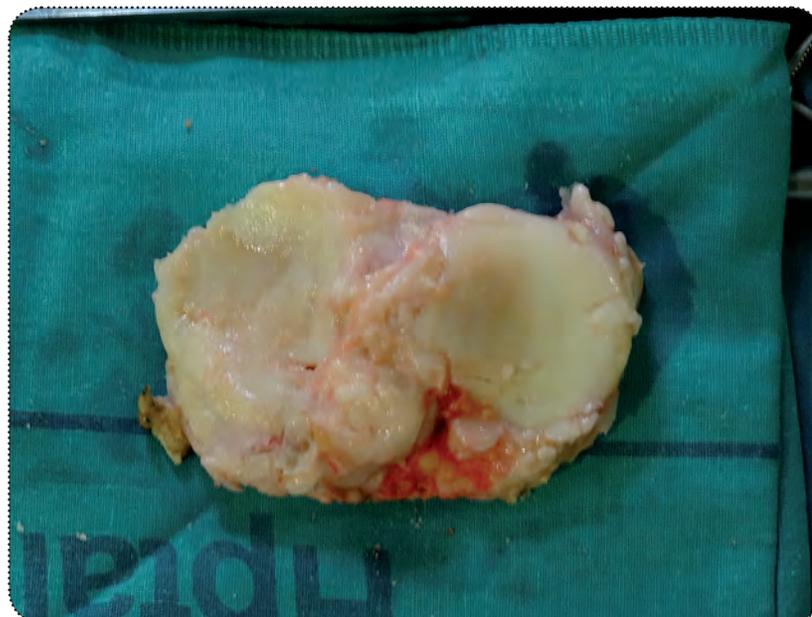


Fig. 16: Platillo tibial después de ser resecado. En este caso el lado medial está a la izquierda, presentando un importante desgaste.



Fig. 17: Rodilla izquierda con los cortes femoral y tibial, previo a la inserción de los componentes de la prótesis.

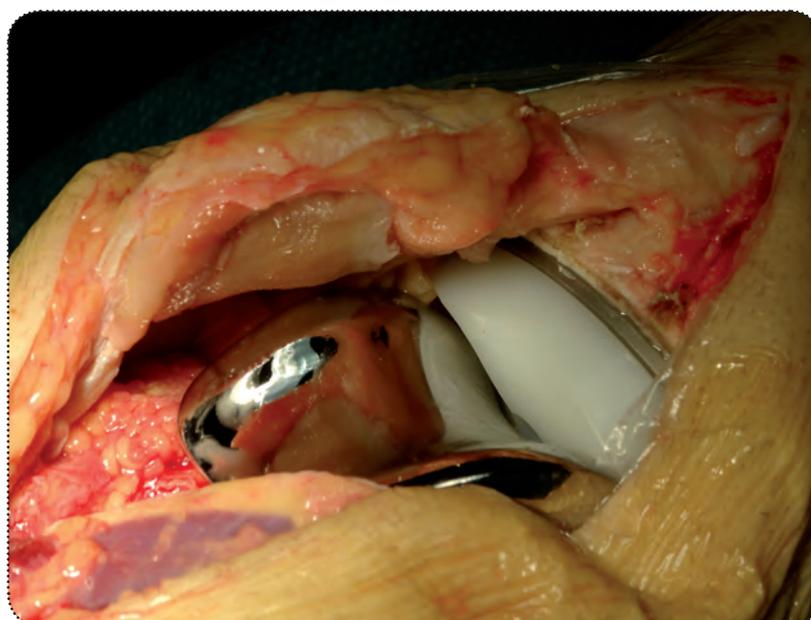


Fig. 18: Antes de realizar el cierre de la herida quirúrgica, se aprecia la articulación con los componentes definitivos implantados.

Técnicas actuales para el tratamiento de lesiones focales:

A. Microfracturas:

Esta técnica hace perforaciones subcondrales controladas en el foco de una lesión o defecto del cartílago articular, haciendo que elementos de la médula ósea como células mesenquimales y factores de crecimiento se puedan acumular en el defecto condral. Estas perforaciones dan lugar a la formación de un coágulo que durante los siguientes 6 a 12 meses se irá remodelando hasta formar un tejido de reparación fibrocartilaginoso.

Por desgracia, éste se compone mayoritariamente por colágeno tipo I y se asemeja más a fibrocartílago que a cartílago hialino (compuesto sobre todo por colágeno tipo II). No tiene las mismas características de resistencia y elasticidad que el cartílago sano y resulta más friable y frágil, resistiendo peor a cargas compresivas o al rozamiento.

No obstante, se trata de una técnica con muy poca morbilidad y más barata que cualquier otra técnica invasiva. Si se realiza correctamente tiene potencial para la mejoría sintomática.

Además, está ampliamente documentada y existen numerosos estudios que presentan buenos resultados. Así por ejemplo Gobbi et al presentaron una serie de 109 casos tratados con esta técnica con resultados de mejoría objetiva y subjetiva tras un seguimiento medio de 72 meses (59).

Las microfracturas alcanzan los mejores resultados en pacientes con lesiones focales aisladas de menos de 200 mm² de superficie, con un índice de masa corporal (IMC: el peso en kilos dividido entre la altura en metros al cuadrado) menor de 30 y una edad menor de 40 años (Mithoefer, 60, 61).

La técnica de microfractura se emplea con frecuencia como técnica de referencia para comparar otras técnicas de reparación del cartílago. Por ejemplo, Knutsen et al. (62) realizó un estudio en el 2004 sobre la efectividad del trasplante autólogo de condrocitos comparándolo con la técnica de microfractura, no encontrando diferencias significativas entre ambas técnicas.

Existen numerosos estudios, como he mencionado, que hablan de las bondades y la reproducibilidad de las microfracturas, pero hay que mencionar que también tiene sus contraindicaciones como son la falta de compromiso o de posibilidad de un paciente a someterse al periodo de recuperación postoperatorio, que normalmente consiste en unas 6 semanas de descarga completa, pero realizando ejercicios de movilidad pasiva.

B. Implantes de condrocitos autólogos

Los implantes de condrocitos autólogos son un procedimiento que se ha desarrollado durante los últimos veinte años, tras la publicación inicial de Brittberg en 1994, y continúa en pleno auge.

Consiste en la obtención de una pequeña cantidad (entre 100 y 300 mg) de tejido cartilaginoso sano de una zona articular exenta de carga, casi siempre durante un procedimiento de artroscopia inicial evaluadora. De este tejido recogido se obtendrán los condrocitos mediante un proceso de degradación enzimática, para a continuación someterlos al aislamiento, purificación y expansión antes de reimplantarlos en el foco de una lesión sintomática (Brittberg 63, Libera 115).

La idea es que al utilizar condrocitos del propio paciente se consiga regenerar una superficie cartilaginosa sana y de buena calidad, con colágeno tipo II en más del 90%.

La realidad no ha conseguido tal porcentaje de ese colágeno idóneo, variando en diferentes estudios desde 35% hasta 55%, pero sí que han demostrado superar cualitativamente cualquier resultado histológico de todas las demás técnicas, logrando un tejido biomecánicamente más eficaz que por ejemplo el fibrocartilago regenerado en lesiones similares reparados con microfracturas o condroplastias.

Los resultados de éxito obtenidos en zonas de baja presión o baja fricción se acercan al 89%, según Peterson (64), pero en zonas como la femoropatelar la tasa de buenos resultados no consigue superar el 62%.

Un problema importante que ha acompañado a esta técnica durante años es que resultaba difícil hacer que esos condrocitos implantados en la lesión se integraran adecuadamente en ella. Faltaba una especie de pegamento que les diera estructura

tridimensional y a la vez los mantuviera justo en el lugar deseado, evitando que se distribuyeran por toda la articulación como ocurría con los primeros intentos.

Esta dificultad fue la que motivó el desarrollo de la segunda generación de injertos de condrocitos autólogos (“ACI” sus siglas en inglés de “Autologous Chondrocyte Implantation”), llamados “MACI” puesto que incluyen una matriz extracelular. Estos biomateriales están constituidos por colágeno tipo I, ácido hialurónico y colágeno tipo I/III, todos ellos formando un andamio membranoso para otorgar al grupo de condrocitos implantados una estructura tridimensional que los ordenara y además mantuviera en el lugar deseado (66).

Algún estudio prospectivo ha documentado que los resultados clínicos son similares a la técnica de la primera generación sin matriz extracelular (67).

C. Injertos osteocondrales

Esta técnica consiste en realizar un injerto de tejido osteocondral, ya sea autólogo o heterólogo. A día de hoy sigue siendo la única técnica que consigue la reconstrucción con cartílago hialino puro.

Los *injertos autólogos*, que obtienen el tejido casi siempre de la misma articulación a tratar pero de una zona donde su obtención no sea lesiva, se utilizan sobre todo para el tratamiento de lesiones pequeñas, de menos de 2 cm².

Los *aloinjertos* se definen como injertos de tejido similar de la misma especie animal, pero de un individuo diferente al receptor. Normalmente se obtienen de donantes cadáver y por tanto suelen ser de mayor tamaño. Técnicamente son más complejos y los requisitos médico-legales hacen que no se pueda hacer en cualquier centro asistencial. Mientras que los injertos autólogos tienen como principal limitación la lesión de la zona donante y su pequeño tamaño, los injertos aloinjertos tienen el riesgo de respuesta injerto contra huésped así como la potencial transmisión de enfermedades. Por esto, solamente pueden ser implantados una vez que se haya comprobado la esterilidad y ausencia de enfermedades transmisibles del injerto donante, y esto puede retrasar el proceso desde que se obtiene el tejido hasta que se pueda dar el visto bueno a implantarlo.

No se trata de una técnica que se realice con el fin de salvar una vida, por lo que normalmente estos injertos obtenidos de un cadáver que reúna las condiciones necesarias por edad, antecedentes y causa de muerte serán congelados. Se calcula que la viabilidad máxima de los condrocitos se logra mantener en injertos implantados como máximo a los 28 días de su obtención (68).

Normalmente se obtiene en forma de semiesfera o cono con abundante hueso subcondral, que es el que se va a fijar al hueso receptor.

Mosaicoplastia: Ésta es la técnica más extendida que utiliza los injertos condrales autólogos. Consiste en obtener múltiples pequeños injertos con un sacabocados de ambos lados de la zona proximal de los cóndilos femorales, evitando lesionar la superficie que articula con la rótula. Estos injertos con forma circular se colocarán uno a uno en la lesión a tratar en zona de carga, que previamente se habrá preparado hasta presentar hueso subcondral sano. Al colocar varios trozos de injerto se crea una especie de mosaico. A veces éste se cubre con una pieza de periostio a modo de red para evitar que se desplacen los injertos. Los resultados utilizando la técnica de mosaicoplastia descritos por autores como Hangody son favorables, sobre todo para lesiones aisladas en el fémur. Igual que con los condrocitos autólogos, los resultados menos buenos se describen en la zona femoropatelar (Hangody, 69, 70).

La mosaicoplastia está bien extendida como tratamiento en lesiones focales del cartílago articular, con predominio de una población joven, sana y en relación con la práctica deportiva. Su uso también se ha extendido a otras localizaciones como el astrágalo, la cabeza femoral en la cadera y en el codo.

Estas técnicas tradicionalmente se han reservado para paciente jóvenes, en su mayoría deportistas, con lesiones aisladas. La primera serie larga de resultados a medio-largo plazo con la técnica de aloinjertos fue la que presentó McDermott en 1985 (71), pero tan sólo el 56% de los pacientes obtuvieron resultados buenos o excelentes. Desde entonces, con la extensión y popularización del uso de esta técnica se han publicado diversos trabajos en los que la tendencia general mejora los resultados, pero a pesar de ello tampoco es una opción perfecta puesto que a largo plazo sigue teniendo fracasos y complicaciones (55).

1.4.4 Expectativas, terapia genética y células madre

La artrosis sigue siendo una patología muy prevalente en el mundo entero, y con la mayor longevidad de la población mundial su incidencia ha aumentado y la tendencia es que siga aumentando. Aunque no se trate de una dolencia con una gran mortalidad, sí que tiene una elevada morbilidad afectando a la calidad de vida de quien la padece. Cada vez se conoce mejor la enfermedad, y se están destinando numerosos recursos tanto en el ámbito público como en el privado a la investigación.

Hoy en día existen diferentes técnicas que se pueden utilizar para tratar lesiones focales del cartílago articular con buenos resultados, como los implantes de condrocitos autólogos, los auto- y los aloinjertos así como las microfracturas. No obstante, como se ha visto, y aunque con casi todas estas técnicas se alcanzan unos resultados satisfactorios, ninguna es perfecta y tampoco consigue la curación completa de la lesión. Tampoco son técnicas útiles para el tratamiento de la artrosis primaria que afecta a áreas extensas de las articulaciones, incluso a varias articulaciones, más propia de la población mayor. Hay grandes esperanzas en el tratamiento con células madre y en general con la ingeniería tisular, así como en la ingeniería genética experimental.

Células madre mesenquimales

Todas las técnicas empleadas en la actualidad para el tratamiento de lesiones del cartílago tienen sus puntos fuertes y sus puntos débiles. Ninguna ha demostrado la regeneración completa del tejido dañado. Los implantes de condrocitos autólogos a priori deberían dar lugar a un tejido cartilaginoso sano, pero la mayor parte de las veces sólo es capaz de generar cartílago de inferior calidad, debido sobre todo a la difícil movilización, diferenciación y proliferación de los condrocitos.

Por esto se ha propuesto utilizar células madre mesenquimales multipotentes. Estas células son capaces de diferenciarse al linaje condral, y presentan las siguientes ventajas con respecto a los condrocitos:

- Se pueden obtener de una gran variedad de tejidos, evitando de esta forma causar más iatrogenia a un tejido ya dañado.
- Son células abundantes desde el momento de su obtención.
- Al contrario que los condrocitos, estas sí son fáciles de expandir in vitro.

Las células madre multipotentes se diferenciarán en condrocitos en respuesta a estímulos condrogénicos específicos. Se ha logrado cultivarlos en cantidades grandes (72, 73).

Finalmente, otra de las características más ilusionantes de cara al futuro es que estas células también exhiben potencial regenerativo y trófico, lo que podría hacerlas muy útiles para el tratamiento de patologías degenerativas del cartílago, incluso podrían prevenir la degeneración del cartílago en pacientes con artrosis.

Las células madre se diferencian en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Las células madre totipotentes tienen la capacidad de crecer y dar forma a un organismo vivo completo. Las pluripotentes son capaces de formar diferentes linajes celulares a partir de los tres linajes embrionarios: ectodermo, endodermo y mesodermo, pero no son capaces de formar un organismo completo. Por unipotentes se entienden aquellas células madre que sólo darán lugar a un tipo de célula; también se llaman células progenitoras.

Las células madre multipotentes sólo podrán formar células de su mismo linaje. Entre éstas destacan las hematopoyéticas y las mesenquimales. De éstas últimas se podrán formar, entre otros, osteocitos y condrocitos.

Lo interesante es que dependiendo de en qué momento evolutivo de la célula mesenquimal se logre diferenciar su formación, podría dirigirse hacia una u otra célula.

Por ejemplo, se podrían diferenciar células hacia condrocitos y otras hacia osteocitos, y crear de esta forma un grupo celular mixto que implantar. Esto serviría para poder tratar lesiones osteocondrales de forma combinada, facilitando la mejor integración de las células implantadas en el lugar del defecto porque los nuevos condrocitos serían potencialmente capaces de fijar el implante al hueso subcondral.

Terapias genéticas:

Pese a ser un tema que ha ganado mucha popularidad y en el que existe depositada mucha esperanza, lo cierto es que el tratamiento genético de la artrosis todavía no es una realidad. Pese a ello, desde que se secuenció el genoma humano en 2001 se trabaja, y mucho, en esa dirección. Existen numerosos trabajos que buscan modificar el proceso patogénico de la artrosis mediante la modificación genética. Así, por ejemplo, Lee logró en 2008 un incremento de la condrogénesis y de la producción de lubricina mediante la estimulación génica de células mesenquimales procedentes de tejido adiposo en articulaciones de un modelo bovino (74).

Recientemente se ha trabajado en diferentes estudios con el objetivo de identificar, bloquear, modificar o eliminar el complejo de genes involucrados en la agreganasa2 o ADAMTS-5. Al actuar sobre los genes que modulan sobre esta metaloproteinasa se ha demostrado que es posible incidir sobre la fisiopatología de la artrosis (75).

Gao y sus colaboradores han demostrado en 2015 que la osteopontina, una proteína cuyo papel en la artrosis no está del todo claro, ejerce un efecto protector sobre condrocitos humanos contra la degradación de las agreganasas mediante la supresión genética de la expresión de ADAMTS-4 (76).

1.5. Modelos animales para el estudio de la artrosis

1.5.1. Generalidades sobre el estudio de la artrosis con modelos de experimentación animal

Los modelos son sistemas que se emplean para simplificar fenómenos complejos y tratar de comprender procesos esquivos y difíciles de descifrar. Los modelos animales han sido desde hace mucho tiempo y siguen siendo esenciales para comprender los mecanismos de muchas enfermedades humanas y para probar estrategias terapéuticas.

Se puede definir un modelo de ensayo animal como un acondicionamiento de animales que pueden haber adquirido el proceso biológico a estudiar de forma genética, natural o inducido experimentalmente. Estos modelos animales deben asemejarse en al menos un aspecto al proceso en humanos y ser científicamente accesibles para su estudio (77, 80).

Los modelos celulares u orgánicos en laboratorio son capaces de aportar conocimientos y conclusiones acerca de determinados mecanismos funcionales y biológicos del cartílago, del hueso, de la sinovial e incluso de determinados grupos celulares dentro de estos tejidos. Se conocen como modelos *Ex vivo*. Son modelos mucho más controlables que los modelos animales. Sirven para estudiar fenómenos biológicos concretos a corto plazo, que en estos modelos quedan aislados de la posible influencia fisiológica de tejidos adyacentes. Pero precisamente por este motivos, los modelos *Ex vivo* no son capaces de reproducir fiablemente los fenómenos de cambio que acaecen en las articulaciones de animales en el transcurso de meses incluso años (81).

En 1990, Altman y Dean describieron los modelos animales como puente entre los conocimientos de los cultivos tisulares y la patología en humanos. Se pueden preparar y por lo tanto controlar diferentes aspectos de una enfermedad para facilitar su estudio (83).

¿Qué ventajas ofrece un modelo animal para el estudio de la artrosis?

- El desencadenante de la enfermedad es conocido

- La progresión de la enfermedad se puede estudiar y controlar con detalle
- Permite conocer los cambios en la enfermedad cuando se aplican determinados tratamientos
- El tratamiento puede reducirse a un sólo principio activo
- La evolución de la enfermedad se puede vigilar mediante pruebas diagnósticas de imagen y tests de laboratorio
- Acceso a tejidos de animales enfermos y sanos para su estudio
- Se pueden controlar factores ecológicos y nutritivos
- Se puede controlar la actividad física diaria de los animales
- Posibilidad de teñir o de marcar radiológicamente los tejidos

Tanto en el pasado como en la actualidad se han empleado varios y diversos modelos animales para el estudio de la artrosis, utilizando para ello a perros, conejillos de indias, ratas y ratones, conejos, caballos...etc. Ninguno ha podido ser considerado ideal a la hora de reproducir la artrosis en humanos (77, 82).

Los criterios para tomar la decisión a la hora de elegir un modelo animal son la relevancia, objetividad, idoneidad y disponibilidad. La relación relevancia/objetividad se refiere a la posibilidad de comparar los acontecimientos en el animal estudiado a los que acontecen en el proceso patológico en el humano.

Lo primero a tener en cuenta para considerar a un modelo animal idóneo es que sea necesario. En segundo lugar existen una serie de criterios específicos que harán a un grupo animal más útil que otros para alcanzar los objetivos planteados.

Estos factores son:

- Sencillez
- Previsibilidad
- Reproducibilidad
- Capacidad de extraer conocimientos

La disponibilidad se refiere a factores prácticos como la ética y legalidad, la presencia de controles, el manejo y los costes. Así, por ejemplo, un modelo con caballos o grandes simios podría aportar una notable similitud en cuanto a factores de carga sobre una articulación como la rodilla, pero su coste y diversos aspectos legales hacen que su idoneidad como modelos animales pueda quedar relegado a un segundo plano en detrimento de otros modelos menos costosos. Por otro lado, el estudio en modelos de animal muy pequeño resultan más baratos y manejables, pero es más difícil conseguir un modelo fisiológicamente similar al ser humano para el estudio de la artrosis (85).

Los modelos de artrosis se pueden dividir en dos grandes grupos:

- modelos inducidos experimentalmente
- modelos de enfermedad espontánea o sin influencia externa

Los modelos inducidos experimentalmente se dividen a su vez en otros dos grupos, según Arlet y Gédéon en 1982 (84):

A. Artrosis mecánica

B. Artrosis estructural

En los modelos de artrosis mecánica, ésta será desencadenada mediante cambios cuantitativos y en la distribución de carga articular, mientras que en la artrosis estructural se consigue por medio de cambios físicos, químicos, biológicos o inmunológicos sobre el tejido. Recientemente, también se han establecido modelos con artrosis inducido por terapia genética, campo que en el que se ha comenzado a trabajar desde que en 2001 se logró secuenciar el genoma humano.

Los modelos inducidos experimentalmente se caracterizan por una determinación exacta del tipo de lesión, de su gravedad, del momento exacto de su desencadenamiento o progresión y con la identificación de los acontecimientos

de la enfermedad mediante marcadores. Se pueden realizar controles evolutivos mediante comparaciones con la articulación contralateral sana, aunque hay que valorar cuidadosamente la afectación de éstas pues podrían verse afectadas por cambios sistémicos o biomecánicos presentes en el animal. Las dos principales limitaciones de estos modelos experimentales para la artrosis son por un lado la rápida aparición de la artrosis en comparación con la evolución natural de la enfermedad y que a veces puede solaparse con cambios estructurales articulares dependientes de la edad del animal.

Existen dos tipos de modelos de artrosis biomecánicos: modelos que buscan la inestabilidad articular y modelos que buscan el desplazamiento de las cargas biomecánicas.

Artrosis biomecánica experimental	
Modelos desestabilizadores	Modelos que desplazan la carga biomecánica
Patelectomía o luxación de rótula Rotura de ligamentos colaterales o cruzados Meniscectomía con/sin rotura ligamentosa Resección de tendones o músculos Denervación articular	Osteotomía Inmovilización en una posición determinada Reposo absoluto Sobrecarga articular

Estos modelos son crónicamente mucho más constantes que modelos espontáneos, pero requieren de más tiempo para obtener algún resultado.

Por otro lado están los modelos experimentales estructurales, que alteran la estructura tisular de las articulaciones. Estas alteraciones afectan a la mecánica tisular, que aumenta la susceptibilidad de sufrir lesiones y conduce a un proceso de reparación incompleto. Este modelo estructural puede enfocarse sobre un tejido concreto dentro de la articulación o sobre la articulación completa. El grado de afectación se determina por el tipo agresión elegida, la dosis y su frecuencia. Dependiendo del producto empleado se pueden dividir en sustancias intra- o extracelulares.

División de artrosis estructural experimental:

- Dirigidas a matriz extracelular:
 - o Físicas:
 - Traumatismos quirúrgicos
 - Calor
 - Energía Láser
 - o Químicas:
 - Ácidos
 - Alcalis
 - Formaldehido
 - Agua y soluciones iónicas
 - o Enzimáticas:
 - Colagenasa
 - Tripsina
 - Papaína
 - Hialuronidasa
 - Dirigidas sobre las células articulares:
 - o Físicas:
 - Enfriamiento
 - Electrólisis
 - Irradiación ionizante
 - o Químicas:
 - Tetróxido de osmio
 - Yodo, acetato yódico
 - Antibióticos
 - Vitamina A
 - o Mediadores:
 - Hormonas, p.ej.: hormona del crecimiento, cortisona
 - Papaína, zymosan
 - Infecciones, p.ej.: bacterianas
 - Determinadas citoquinas, p.ej.: TNF- α , IL-1

Lo que caracteriza a estos modelos es un desgaste generalizado e intensivo del tejido cartilaginoso, siendo además modelos bastante constantes en el tiempo y que se pueden desencadenar de forma relativamente precoz.

En cambio, los modelos de enfermedad espontáneos se desarrollan de forma muy lenta y dependen de desencadenantes no diversos y a veces desconocidos. A pesar de esto, son modelos que tienen utilidad para el estudio de la artrosis en humanos por su similitud en la enfermedad, y pueden aportar valiosa información para establecer estrategias para desarrollar diferentes estudios farmacológicos. No obstante, al ser tan lentos están sujetos a variaciones en el grado de incidencia o gravedad de la enfermedad, limitando de esta forma mucho su utilidad real.

Para los modelos mencionados, tanto inducidos como espontáneos, existen dos grupos de animales: pequeños y grandes. Entre los pequeños se utilizan sobre todo ratones y ratas, conejillos de indias y conejos. Los animales grandes suelen ser sobre todo perros, ovejas, primates y caballos (80, 82, 87, 88, 89).

Los modelos animales están limitados por diferencias específicas de especies en cuanto a metabolismo, anatomía y diferentes formas de reaccionar frente a determinadas sustancias. En los modelos de animales pequeños el lapso de tiempo para el estudio del efecto de la sustancias aplicadas suele ser muy corto, desde pocas semanas a como mucho uno o dos meses. Los animales grandes son por esto preferibles, pero necesitan de mayor cantidad de medicación y su mantenimiento es más complejo, encareciendo notablemente el estudio.

A pesar de estas limitaciones, los estudios con animales son muy valiosos e imprescindibles antes de poder comenzar con estudios en humanos.

1.5.2. El modelo “Pond-Nuki” y el modelo “Moskowitz”

Estos dos modelos animales son los más empleados para simular artrosis.

El modelo “Pond-Nuki” fue desarrollado por los autores Pond y Nuki en 1973 (86). Provocaban una inestabilidad articular mediante la rotura del ligamento cruzado anterior de la rodilla en perros. De esta forma aparecían a nivel del cóndilo femoral medial erosiones, fibrilaciones y roturas del cartílago articular, comprobado mediante análisis histológicos. Posteriormente demostraron la proliferación de condrocitos y la aparición de osteofitos.

Ese mismo año Moskowitz et al. (88) presentaron el modelo “Moskowitz” que a diferencia del modelo anterior, realiza una meniscectomía del menisco medial en la rodilla del perro. Esto también desestabiliza la articulación y además altera las fuerzas biomecánicas en la rodilla durante la marcha, desencadenando finalmente un cuadro de artrosis precoz similar a la de los seres humanos que han sufrido esta lesión. Moskowitz demostró que en el plazo de entre 4 y 8 semanas se instauraba la degradación del cartílago. El resto del proceso artrósico es similar a los demás modelos.

1.5.3. El modelo animal de este trabajo

Para este trabajo se escogió un modelo animal experimental estructural de artrosis, en el que se pretendía desarrollar una degeneración artrósica de la matriz extracelular del cartílago en la rodilla.

El animal elegido fue el cerdo. Estudios recientes han determinado la validez del cerdo como modelo animal válido y reproducible para el estudio de enfermedades articulares: Kiapour et al demostraron en 2015 que el uso de minipigs era válido para valorar factores predisponentes, fisiopatológicos y relacionados con el sexo del sujeto en lesiones del ligamento cruzado anterior (90). Al lesionar este ligamento de forma iatrogénica demostraron la aparición de cambios degenerativos artrósicos en las rodillas de los cerdos con correlación con lo que ocurre en el ser humano.

En un trabajo de 2011, Verma et al. (91) repasan en la literatura la utilización de minipigs en diferentes trabajos científicos. Explican que de los numerosos modelos animales disponibles para los estudios proteómicos o sobre medicina molecular, sólo un pequeño número ha sido utilizado con éxito en la comprensión de la biología humana. El mayor número de estudios ha utilizado a roedores de forma satisfactoria, pero existen dudas acerca de su idoneidad a la hora de imitar la biología humana. Por otro lado, los cerdos presentan mayor similitud con nuestra especie humana en cuanto a tamaño, forma y fisiología, y se ha utilizado como modelo de mamífero importante para muchos estudios diferentes, obteniendo resultados extrapolables al entendimiento de la patología humana, como por ejemplo en estudios sobre los xenotrasplantes, las enfermedades cardiovasculares, la hemodinámica, la nutrición, las funciones metabólicas generales, trastornos digestivos, enfermedades respiratorias, diabetes, enfermedades renales y de la vejiga, la toxicidad específica de órganos, dermatología y en secuelas neurológicas. Además de esto, se ha descubierto que el genoma porcino y el humano comparten una parte muy grande (92). Esto se une a la mencionada similitud en cuanto a tamaño y forma, haciendo del cerdo un modelo ideal para el estudio de patología musculoesquelética. Por este motivo, los cerdos también se han utilizado con éxito para trabajos acerca de remodelación ósea, plasma rico en plaquetas y osteointegración de diversos implantes como publicaron, entre otros, los grupos de Fürst, Watzek y Sanroman (93, 95).

Wancket realiza un metanálisis en 2015 (96) de los distintos modelos animales utilizados para el estudio de implantes óseos y destaca las ventajas del cerdo como modelo animal por su biocompatibilidad, por ser lo suficientemente grande para hacer estudios trasladables a patología humana y por su facilidad de manejo. Esto mismo se desprende de otros trabajos que utilizan el mismo tipo de minipig y manejo del mismo que el presente trabajo (Thams et al. 97, 98). Además, en comparación con otros animales, se considera que los cerdos son menos susceptibles a sufrir complicaciones médicas después de una intervención quirúrgica, aunque esto no está demostrado (94).

Los cerdos empleados en nuestro estudio:

Tras evaluar las diferentes alternativas y su disponibilidad, se decidió utilizar para este estudio a cerdos de la variante Minipig. Se emplearon 10 cerdos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) de la raza Minipig, resultante del cruce entre el cerdo barrigón vietnamita y el minipig de Minnesota.



Fig. 19: El primer minipig del estudio, justo después de haber sido anestesiado y antes de proceder a la artrotomía de rodilla.

Su edad media era de 5 años y su peso medio era de 148 kilogramos. Fueron alimentados con una dieta rica en calorías y se les proporcionó acceso a agua en todo momento. Durante el estudio permanecieron en recintos de entre 4 y 10 m² aproximadamente, al principio en parejas y una vez tratados de forma individual.



Fig. 20: Los animales en su recinto.

Para la degradación de la matriz extracelular del cartílago se eligió la enzima colagenasa, que se obtiene de la bacteria *Chlostridium histolyticum*, tipo II, y distribuido por Merck (Darmstadt, Alemania). La enzima colagenasa es una metaloproteínasa de matriz que contiene zinc y degrada el colágeno a base de romper sus enlaces proteicos. Puede actuar contra diferentes tipos de colágeno: tipo I, II, III, IV y V. La colagenasa procedente de la bacteria gram positiva *Clostridium Histolyticum* se compone de una combinación fija de dos enzimas sinérgicas pero de diferente clase. Su codificación depende de dos genes diferentes: *colG* para la clase I (AUX-I) y *colH* para la clase II (AUX-II). La clase I hidroliza los terminales carboxi y amoni del colágeno, mientras que la clase II hidroliza el interior del colágeno, actuando de esta forma ambas enzimas de forma eficaz y sinérgica (163).

La colagenasa de *Clostridium Histolyticum* (CCH) tiene a día de hoy diversos usos terapéuticos. El más popular actualmente es su empleo para el tratamiento no quirúrgico de la enfermedad de Dupuytren en las manos, disolviendo el cordón fibroso que impide la correcta extensión de los dedos. También se utiliza en el tratamiento de la enfermedad de Peyronie en el pene y la enfermedad de

1. Introducción

Ledderhose en la planta del pie. Además de esto, se ha empleado con éxito para el desbridamiento enzimático y limpieza de heridas complicadas (164).

Su uso en el ser humano no está exento de complicaciones, aunque hasta ahora sólo se han descrito complicaciones a nivel local. El problema es que al tratarse de proteínas biológicas no endógenas van a dar lugar a la producción de anticuerpos, y se están investigando posibles reacciones cruzadas con otras metaloproteinasas endógenas humanas.

Basándonos en los estudios de Kikuchi et al. (89), en los que provocaban artrosis en rodillas de conejos mediante la inoculación intraarticular de colagenasa, hicimos un cálculo de la concentración de colagenasa a 40 miligramos por mililitro de suero salino (cloruro sódico) con una actividad enzimática de 269 unidades internacionales por miligramo (Unit/mg).

Los animales fueron anestesiados en un ambiente estéril, concretamente un quirófano de cirugía veterinaria, y en ese momento se administró 1 mililitro de solución de colagenasa en la rodilla derecha. Después de un tiempo promedio de 4 meses, los animales fueron sacrificados para su estudio histológico.



Fig. 21: Otro individuo en el antequirófano tras ser anestesiado

1.6. Objetivos

El objetivo original de este estudio era provocar y probar cambios artrósicos en las rodillas de minipigs a través de inyecciones intraarticulares de colagenasa.

Para ello se optó por utilizar un modelo de investigación con animal grande y cambios estructurales inducidos por la mencionada enzima colagenasa.

Después de un tiempo de reposo de 4 meses, los animales fueron sacrificados y sus articulaciones examinadas macroscópica-, inmunohistoquímica- e histológicamente.

El hecho de haber desencadenado artrosis en las articulaciones tratadas se demostró mediante tinciones histológicas e inmunohistoquímicas, analizando:

- los componentes de la matriz extracelular y los marcadores condrogénicos como el colágeno 1, 2 y 3, agrecano y S-100
- factores de crecimiento como el Factor de crecimiento insulino-like-1, Transforming Growth Factor- β
- Citoquinas degenerativas como la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral- α
- Enzimas degradantes como la agrecanasa-2 (ADAMTS-5) y la colagenasa-3 (MMP-13)
- La apoptosis celular demostrando la presencia de caspasa-3.

Por otra parte se investigó la posibilidad de desarrollar transplantes tridimensionales de condrocitos procedentes del cartílago de la rodilla sana de los cerdos. Para ello se realizó una biopsia de tejido condral con el fin de aislar condrocitos, multiplicarlos en monolayer y poder obtener finalmente implantes tridimensionales de condrocitos porcinos.

Las células del cartílago obtenido fueron analizadas y se determinó su vitalidad y su capacidad de multiplicación, comparándolas con condrocitos humanos. Se crearon los preparados tridimensionales de condrocitos y sus características fueron comparadas con las de los humanos.

El objetivo final es poder responder a la pregunta de si se pudo desencadenar la artrosis y si los resultados obtenidos son comparables con otros estudios animales así como con la situación de esta patología en seres humanos.

2. Material y métodos

2.1 Manejo de los animales

Se emplearon 10 cerdos del tipo “*Minipig*”, fruto del cruce del cerdo barrigón vietnamita y el minipig de Minnesota. Estos animales fueron alimentados con una dieta rica en calorías y con abundante agua, que tenían a su alcance en todo momento. Antes de ser intervenidos permanecieron en grupos de tres en unos establos de entre 8 y 10 metros cuadrados, techados. Después del proceso invasivo pasaban a recintos individuales, algunos de 4 a 5 metros cuadrados y otros en los que habían estado previamente.

En el plazo de aproximadamente un mes los cerdos fueron anestesiados mediante relajación e intubación endotraqueal en un quirófano para el procedimiento quirúrgico, que consistía en primer lugar en una artrotomía abierta de la rodilla derecha del animal. Se decidió que todas las rodillas tratadas fueran las derechas, para posteriormente evitar errores de etiquetado o almacenaje. Primero se procedía a la obtención de una biopsia tisular de cartílago de una zona exenta de carga articular, para inmediatamente proceder al procesado de la muestra para el aislamiento y posterior cultivo tisular de condrocitos.

A continuación, en el mismo acto quirúrgico se inyectó una dosis de colagenasa diluida en la rodilla, procediendo al cierre por planos de la herida quirúrgica. La colagenasa empleada procede de la bacteria *Clostridium Histolyticum*, tipo 2 (Merck, Darmstadt, Alemania). Los animales recibieron profilaxis antibiótica de 2 gramos de Augmentine (Ratiopharm, Ratiopharm España) intravenoso.

El manejo postquirúrgico fue estandarizado siguiendo el protocolo habitual de la clínica para animales de este tamaño sometidos a una intervención quirúrgica. Se alimentó de forma habitual y con abundante agua a los cerdos. Se realizaban controles de su estado general diarios. Las heridas quirúrgicas se revisaron con la misma regularidad.

Finalmente, tras un periodo de 4 meses, los animales fueron sacrificados para su posterior estudio.

Este estudio fue autorizado por el comité de ética del Hospital Gómez Ulla de Madrid, España, y fue supervisado por el Profesor Dr. Fidel San Román, Catedrático de Cirugía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, España.



Fig. 22: El equipo quirúrgico al inicio del trabajo.

2. Material y métodos



Fig.23: Preparando el campo quirúrgico, rodilla derecha del cerdo número 3.



Fig.24: Preparando el sistema de isquemia previa a la artrotomía.

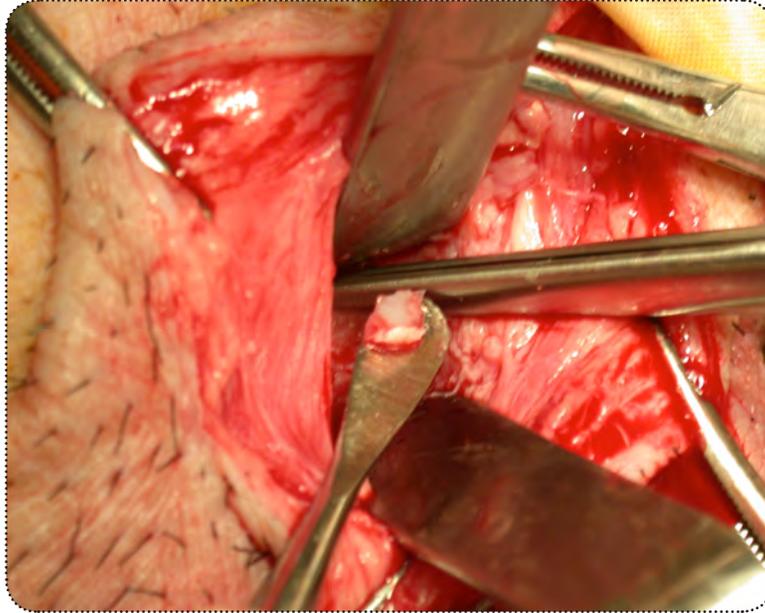


Fig. 25: Obtención de la biopsia de cartílago sano a través de artrotomía. El tejido condral se obtiene de una zona anterosuperior de la rodilla del cerdo, en una zona exenta de carga. Durante el proceso del cierre de la herida, antes del cierre de piel, se administra la colagenasa intraarticular.

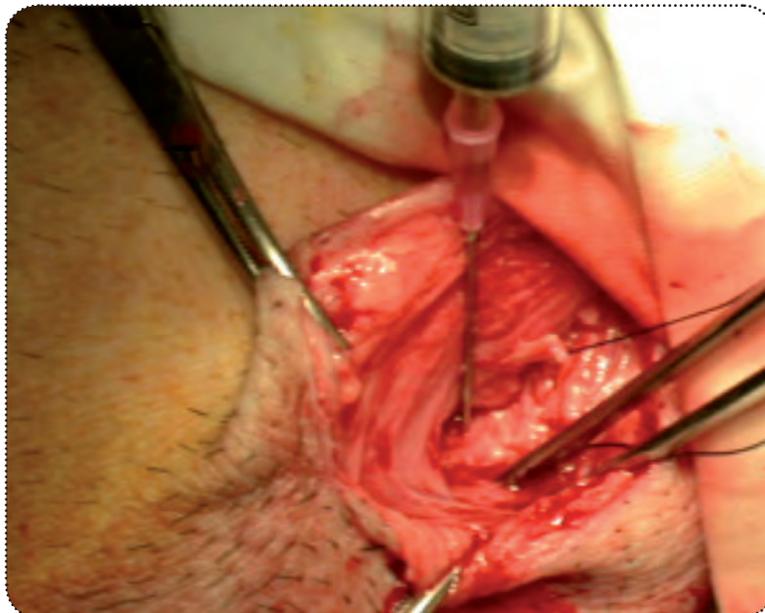


Fig. 26: Momento de la administración de la colagenasa una vez realizado el cierre de la cápsula articular.



Fig.27: Cierre de la herida quirúrgica.

2.2 Cultivo celular

Todos los trabajos correspondientes al cultivo celular y su estudio se desarrollaron en laboratorios con el nivel de seguridad 1. Las técnicas empleadas se realizaron bajo condiciones de asepsia, haciendo uso de material fungible estéril y todo el material no fungible fue esterilizado mediante autoclave antes de su utilización.

2.2.1 Aislamiento de condrocitos

Como se ha comentado anteriormente, la biopsia de cartílago sano se realizó mediante una artrotomía de rodilla derecha del cerdo anestesiado, en el contexto de una intervención quirúrgica siguiendo los protocolos habituales de asepsia que rigen en un quirófano convencional.

El tejido obtenido en la biopsia se sometió a un lavado con PBS (Phosphate Buffer Saline). El PBS se conoce como tampón fosfato salino o buffer fosfato salino y se utiliza en la investigación biológica e inmunológica. Se trata de una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Se trata de una solución isotónica con un PH de 7,4, por lo que no resulta tóxica para las células de mamíferos, resultando ideal para un proceso que debe estudiar y cultivar células vivas.

A continuación, las muestras se colocaron en unas placas de petri, donde fueron cortadas con bisturí en pequeños trozos de cartílago, eliminando todo resto de tejido no cartilaginoso. De allí se pusieron los trozos de cartílago en un tubo de centrifugación de 50 ml que contenía una solución de 1 mg/ml de colagenasa.

Este tubo se trasladó a una máquina agitadora o mezcladora, donde permaneció incubando durante 4 horas a razón de 140 vueltas por minuto y a 37°. Finalmente sólo quedaban unos pequeños trozos de cartílago en el fondo del tubo. El sobrante se separó y se puso en un nuevo tubo. Esta suspensión de células se sometió a un centrifugado de 1000 vueltas por minuto, volviendo a desechar el sobrante al finalizar. El pellet, que es como se denomina la bolita de tejido que permanece en el fondo del tubo tras el

centrifugado, fue colocado en una solución de 5 ml de medio con 10% de suero autólogo.

A continuación, se repartieron esos 5 ml en dos botellas de cultivo celular tipo T 75, cada una con una superficie de 75 cm², aplicando además 15 ml de medio de cultivo celular, que contiene un 10% de suero autólogo.

2.2.2 Conservación y descongelado de los condrocitos

La congelación de los condrocitos provenientes de cartílago humano se realiza habitualmente de la siguiente manera: Estas células se congelan en una cámara especial con nitrógeno líquido a -196°. Las células congeladas se colocan en una solución especial que contiene un 10% de óxido de dimetilsulfato con un 20% de suero.

Para su descongelación se colocan los recipientes con las células en un baño maría a 37°, aplicando sobre las células una nueva solución de 10ml de medio de cultivo celular. La mezcla es centrifugada y el sobrante desechado para poder separar el óxido de dimetilsulfato. El pellet celular se vuelve a suspender y dividir en tres frascos de cultivo celular T 225 con 30 ml de medio de cultivo celular cada uno. A este paso se le conoce como *sembrado*.

2.2.3 Cultivo en monocapa

Se conoce el cultivo en monocapa como aquel en el cual las células se aplican de forma plana, en una sola capa, sobre la superficie del recipiente para ello utilizado.

Con los recién obtenidos condrocitos porcinos se utilizaron frascos de cultivo celular con tapa de filtro y superficie de cultivo de 75 cm². Para los siguientes pasajes (o pasos) se emplearon frascos con 225 cm².

Para el cultivo de células humanas se empleó una mezcla de medio de cultivo con un añadido de un 10% de suero humano: para cada frasco T 75 20 ml de medio de cultivo y para cada frasco T 225 30 ml.

En cambio, para el cultivo de células porcinas recién aisladas se utilizó una mezcla de medio de cultivo con un 10% de suero autólogo. En los dos primeros pasajes la mezcla de medio de cultivo contenía un 10% de suero porcino, mientras que en el último pasaje el medio contenía también un 10% de suero, pero en este caso de una mezcla entre pool de suero de origen porcino, de origen humano, y suero autólogo. El motivo para el uso de suero de pool humano y porcino era la escasez de suero autólogo. Las células se metieron entonces en una incubadora a 37°, con una humedad relativa del 90% y un 5% de CO₂.

El medio de cultivo celular se cambiaba dos veces a la semana, aspirando la mitad del sobrenadante y sustituyéndolo por nuevo medio de cultivo. Antes de esto, siempre se hacía una comprobación bajo microscopio de las células, para valorar su forma, granulación, adherencia, proliferación, esterilidad y la densidad de crecimiento. Ésta última se mide en números del 1 al 4, siendo el 1 la ausencia de contacto entre las células y el 4 la confluencia total.

2.2.4 La cosecha y el procesado de las células (Subcultivo)

Cuando las células han crecido de forma confluyente y se han multiplicado hasta cubrir toda la superficie del frasco de cultivo, debían ser sometidas a una nueva división o subcultivo (en Inglés passage). Esto es necesario cuando han alcanzado una confluencia de entre el 90 y el 100%. Las células de los cerdos fueron subcultivadas ya con un espesor de crecimiento de 2, debido a que estas células mostraban tendencia a formar clúster celulares.

Para realizar esta tarea primero hay que aspirar el medio de cultivo y someter a las células a un lavado con PBS, eliminando así la mayor parte de las proteínas extracelulares. Esto facilita que la enzima tripsina separe las células de la superficie del fondo del frasco. Para mejorar las condiciones de esta catálisis se colocaban los frascos en un armario de incubación a 37°.

A continuación se procede a una comprobación microscópica para ver si las células se han soltado del fondo del frasco. La actividad de la tripsina se detiene al aplicar ahora el doble de cantidad de medio de cultivo con suero. El frasco se somete a un centrifugado a 1000 vueltas por minuto durante 5 minutos, para después volver a suspenderlas en medio de cultivo y colocarlas en nuevos frascos de cultivo T 225.

2.2.5 Contaje celular

El recuento o contaje celular se realizó mediante un contador o cámara de recuento del tipo Neubauer. La cámara de recuento es un instrumento de medición de precisión de vidrio óptico especial. Se utiliza para contar las células u otras partículas en suspensión en el microscopio. Para diferenciar las células vivas de las muertas se aplicó una tinción de azul tripan, que penetra en las células muertas a través de la membrana celular defectuosa.

En primer lugar las células fueron procesadas de la misma forma que en el paso 2.2.3, pero tiñendo una parte de la suspensión celular con el azul tripan en proporción 1:1. Este parte sometida a la tinción se introduce en el contador. El resultado obtenido se utiliza en la siguiente fórmula para calcular el número absoluto de células:

Número células absoluto = Número de media celular $\times 10^4$ (factor del contador) \times Factor de disolución \times Volumen de resuspensión (ml).

Averiguar el número total de células es fundamental para determinar el factor por el cual hay que concentrar o diluir las células para obtener la relación deseada de células por agregado (esfera).

2.2.6 Elaboración de los agregados tridimensionales de condrocitos

Como se ha comentado, para facilitar la implantación y el manejo físico de los condrocitos cultivados, éstos deberán poder ser transformados en esferas tridimensionales, que realmente acabarán formando una estructura implantable en la lesión.

Una vez conseguido un cultivo celular satisfactorio y habiendo logrado la confluencia tras el cuarto subcultivo, se procedió a elaborar los agregados tridimensionales. Para ello se sembraron 2×10^5 de células meniscales, procedentes de biopsia de cóndilo sano previo al tratamiento con colagenasa, por cada well en una placa de 96 wells, que previamente había sido revestida con agarosa al 2%.

La agarosa es un producto natural que forma una matriz inerte y no tóxica, que permite formar geles ideales para el cultivo celular. Se trata de un polisacárido de galactosas alfa y beta y se obtiene de algas.

De esta forma, las células sembradas se agregan formando unas estructuras tridimensionales esféricas. Los cambios de medio de cultivo se hacían de la misma forma que en los pasos previos: para los condrocitos humanos medio de cultivo con 10% de suero humano procedente de pool, y para los condrocitos porcino medio de cultivo con 10% de suero autólogo.

Una vez cada semana se realizaba una fotografía de los agregados, y dos veces por semana se realizaban comprobaciones morfológicas. Al mismo tiempo se determinaba el tamaño de cuatro esferas, escogidas aleatoriamente. Para ello se empleó un microscopio de contraste de fases, que permite observar células sin colorear y es especialmente útil para ver células vivas. Se mide el tamaño en unidades oculares micrométricas (UOM), que con el uso del objetivo de 5 aumentos corresponden $50 \text{ UOM} = 990 \mu\text{m}$; de aquí se obtiene el factor $F = 19,8 (990 \mu\text{m} / 50 \text{ UOM})$. Para determinar el tamaño de los agregados celulares se multiplican los UOM medidos con el factor F.

2.3 Histología e inmunohistoquímica

Una vez realizada la intervención quirúrgica sobre la rodilla derecha de los cerdos, que consistía en la realización de una biopsia condral de una zona exenta de carga, así como la inoculación de la enzima colagenasa, éstos fueron sacrificados transcurridos 4 meses. Hasta ese momento, los animales permanecieron en recintos techados e individuales. Fueron alimentados e hidratados en abundancia, las heridas quirúrgicas fueron supervisadas y curadas varias veces a la semana. No requirieron retirada del material de sutura puesto que las heridas fueron cerradas con hilo reabsorbible tipo vicryl rapid^R.

El sacrificio del animal se realizó siguiendo las normativas de la CE (Directiva del Consejo 93/119/CE) (Comisión de las Comunidades Europeas 1993) y las regulaciones nacionales sobre métodos de sacrificio, así como los estándares éticos previstos por el comité deontológico del Hospital Gómez Ulla de Madrid, España.

Los animales fueron sedados en su recinto habitual por sus cuidadores. Posteriormente fueron transportados al quirófano, donde recibirían el eutanásico de uso veterinario T-61 (Merck) por vía intravenosa.

Cuando se confirmó la muerte del animal se procedió a realizar los cortes necesarios para obtener las dos rodillas del cerdo. Esto se realizó en el ambiente estéril de quirófano, para minimizar el riesgo de contaminación de las muestras.

Las muestras fueron lavadas con PBS, guardadas en contenedores estériles y debidamente etiquetadas. Se transportaron en medio refrigerado de forma urgente al laboratorio donde se completaría el procesado de las muestras.

Una vez transportadas hasta el laboratorio donde se sometería al análisis histológico, las muestras fueron sacadas de su embalaje y tratadas con las más estrictas medidas de asepsia.

En primer lugar, las muestras fueron sometidas a un proceso de descalcificación, corte, fijación, tinción y finalmente al estudio microscópico.



Fig. 29: Detalle de una rodilla tratada con colagenasa en el proceso de limpieza de la pieza tras el sacrificio del animal. Se puede apreciar macroscópicamente la alteración de la superficie cartilaginosa de la zona de carga de la articulación.

2.3.1 Descalcificación

Para descalcificar las muestras se empleó una solución titriplex, que provoca la formación de quelatos hidrosolubles de calcio, que resultan fáciles de lavar sin dañar el tejido. Es un proceso lento, que dura entre 10 y 20 semanas, dependiendo del tamaño y del estado de la muestra. La solución de titriplex se cambiaba tres veces a la semana, y las muestras se incubaban a 37° en un baño de agua.

2.3.2 Cortes de las muestras de tejido porcino

Las muestras de tejido procedente de los cerdos, correspondiendo a dos rodillas por cada animal, ascendían a 20 rodillas, cada una con dos cóndilos femorales, que era la parte de la articulación que se decidió estudiar. La mitad de las

2. Material y métodos

muestras correspondían a cóndilos tratados con colagenasa y la otra mitad a las muestras control, que en este estudio decidimos llamar cóndilos control.

Los cóndilos tratados con colagenasa serán llamados de esa forma o como cóndilos artrósicos a lo largo de este trabajo.

Las muestras de tejido eran demasiado grandes para su estudio histológico, por lo que fueron sometidos a cortes que dividían cada cóndilo femoral en varios segmentos. El número de piezas obtenidas por cada cóndilo variaba en función del tamaño de cada animal. Así, por ejemplo, del animal n°1 se obtuvieron 6 trozos de cóndilos tratados con colagenasa, mientras que en el animal n°2 se obtuvieron 8 trozos.

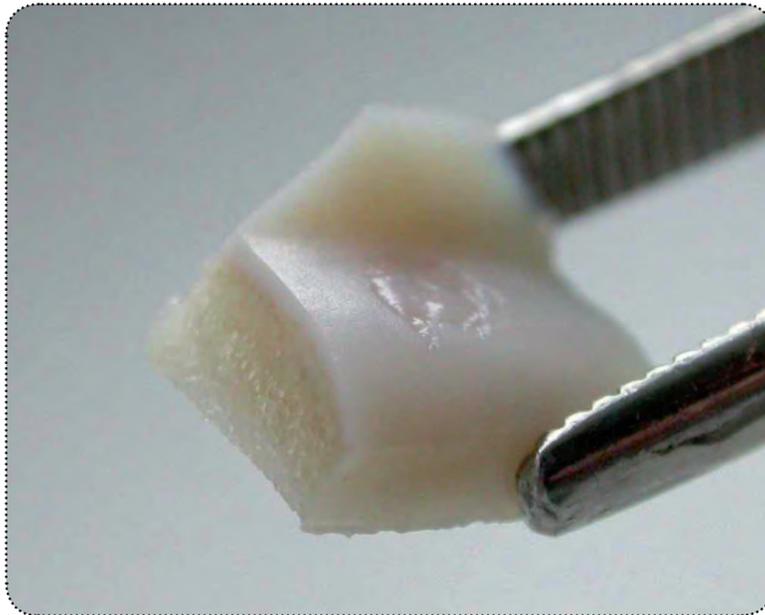


Fig. 30: Detalle de una muestra una vez cortada para su estudio y procesado. Se aprecia la superficie articular cartilaginosa y el hueso subcondral.

2.3.3 Fijación e inclusión en parafina de las muestras

Después de someter las muestras al corte y descalcificación, había que fijarlas. Esto significa: detener los procesos que se desarrollan en el interior de las células para prevenir y detener la autólisis, la putrefacción y descomposición. Para lograr esto se empleó formalina para el entrecruzamiento de las proteínas. Para fijar las muestras se usó Histofix (Roth, Karlsruhe, Alemania). Cada muestra se dejó fijando durante la noche.

A continuación se realizó la deshidratación de las muestras, mediante una serie de etanoles de gradiente ascendente: primero con etanol de 70%, dos veces durante 45 minutos a 50° C). Después se repitió con un etanol de 80% (dos veces 45 minutos a 50°), luego con etanol de 96% dos veces durante 60 minutos a 50°. Finalmente sometió a este proceso con etanol absoluto una vez durante 2 horas a 50° y otra vez durante toda la noche a temperatura ambiente.

El siguiente paso consistía en incubar cada muestra durante una hora con xileno para después incluir las muestras en parafina durante toda la noche.

El xileno, también llamado xilol o dimetilbenceno, es un disolvente cuyo uso en la histología consiste en tornar transparentes las muestras para facilitar su observación a la luz del microscopio. Se suele utilizar en los últimos pasos del preparado de las muestras.

La parafina desplaza el xileno, por lo que por la mañana se cambió la parafina una vez más antes de la inclusión final. En cuanto la inclusión final estaba hecha, las muestras fueron almacenadas inmediatamente a -20° C.

2.3.4 Cortes ultrafinos de las muestras

El almacenaje de las pruebas a -70° permitió realizar unos cortes óptimos con un grosor de 4 µm. Para ello se utilizó un micrótopo rotacional (Modelo 2065 Supercut de Leica, Solms, Alemania). Las piezas cortadas fueron depositadas en un recipiente con agua a 40° C para que se estiraran. Luego fueron colo-

cadadas en portaobjetos de microscopio y se dejaron durante 2 días a temperatura ambiente para que pudieran secarse.

2.3.5 Desparafinado y rehidratación

Para que los cortes pudieran ser examinados histológica- e inmunohistoquímicamente, debían ser previamente desparafinados y después rehidratados. Primero se bañaron los cortes en xileno dos veces durante 5 minutos para retirar la parafina. La rehidratación se hizo aplicando una serie de gradación descendente de etanoles, justo lo contrario del proceso de deshidratación. Comenzando con 3 minutos de etanol absoluto, bajando con etanol 96%, 80%, 50% hasta finalmente bañar las muestras en agua destilada, también durante 3 minutos.

2.3.6 Tinción de hematoxilina y eosina

La tinción con hematoxilina y eosina es una de las más populares para el estudio histológico. La hematoxilina es catiónica y básica, por lo que tiñe estructuras celulares que sean ácidas o basófilas. La eosina hace lo contrario gracias a su naturaleza ácida.

La hematoxilina tiñe en color azul y púrpura, y las estructuras por las que tiene afinidad son ácidas, como los núcleos celulares. La eosina prefiere medios básico o alcalinos, proporcionando un color rosáceo, como por ejemplo el citoplasma.

Al concluir el proceso de desparafinado y rehidratado, los cortes fueron bañados durante 4 minutos en un baño de hematoxilina, luego lavados con agua destilada por tres veces y dejados en remojo para adquirir el característico tono azulado. Después se se incubaron durante 20 minutos en eosina, tras lo cual fueron nuevamente lavados con agua destilada y sometidos a un nuevo proceso de deshidratación con una escala ascendente de etanoles, como ya hemos visto previamente.

Los cortes con xileno fueron incorporados en bálamo del Canadá y cubiertos con una hoja de vidrio sobre el portaobjetos.

2.3.7 Tinción de Masson-Goldner

También llamada tinción tricrómica de Masson, está pensada para teñir tejido conectivo y se compone de tres colorantes diferentes, que se aplican uno tras otro sobre el tejido, permitiendo que cada uno aporte una coloración determinada para cada tipo de tejido diferente.

El proceso de tinción de las muestras consistió en el desparafinado con xileno y la rehidratación con la escala descendente de etanoles. Después, los cortes fueron sumergidos por 15 minutos en la tinción de hematoxilina férrica de Weigert, para a continuación lavarlos con agua destilada. Después fueron sometidos a la tinción con los tres soluciones que componen la tinción tricrómica de Masson. Al finalizar, se procedió a la deshidratación de los cortes y a su fijación con bálamo del Canadá para preparar los portaobjetos de cara a su visualización microscópica.

2.3.8 Tinción Safranina-O- Fast Green

Esta tinción es la combinación de los colorantes Safranina-O, Fast Green y hematoxilina férrica de Weigert.

La Safranina-O (también llamada rojo básico 2) tiñe de rojo oscuro los núcleos celulares de determinadas bacterias, pero en estudios histológicos como el nuestro tiene una utilidad añadida: al ser básica, este colorante se une a estequiométricamente a los mucopolisacáridos (glucosaminoglicanos), que son ácidos. Concretamente, cada molécula de colorante se une a un grupo de glucosaminoglicanos con carga negativa. De esta forma se pueden extraer datos cuantitativos de la cantidad de glucosaminoglicanos.

El hueso se tiñe de verde con el colorante Fast Green o Verde Rápido FCF, que se une a las moléculas de colágeno presentes en el hueso. Este colorante también se usa ampliamente en la industria alimentaria como colorante, en repostería y para elaborar gominolas; en Europa se denomina con el código E-143. La hematoxilina férrica de Weigert es utilizado en este caso para cromar los núcleos celulares, por su resistencia y estabilidad frente a los ácidos.

La safranina-O es hidrosoluble, por lo que tras las tinciones los cortes sólo podían ser aclarados brevemente con agua antes de proceder a la deshidratación con etanoles y xileno y fijarlos con bálsamo del Canadá sobre un portaobjetos.

2.3.9 Preparación de las muestras en formol

Los cortes histológicos parafinados fijados en formol primero se desparafinaban y rehidataban. El formol hace que en los tejidos se forme un entrecruzamiento de las proteínas, enmascarando los antígenos presentes.

Para que pudiera ocurrir una reacción antígeno-anticuerpo, había que realizar un desenmascaramiento de los antígenos mediante enzimas proteolíticas o tratamiento con microondas.

2.3.9.1 Pretratamiento con tripsina

Este fue el método empleado con la mayor parte de los preparados inmunohistoquímicos. Con esta enzima se descubren los anticuerpos dirigidos contra el TGF- β , agrecano, S-100, ADAMTS-5, MMP-13, colágeno tipo 1 y tipo 3, y el IGF-1.

Después del desparafinado y rehidratado de los cortes, las muestras sobre el portaobjetos fueron rodeadas con un rotulador hidrófobo (tinta grasa), evitando que se mezclen o se pierdan líquidos entre las dos muestras sobre el portaobjetos. En este método se utilizaba una tableta de tripsina, cuya masa era de 1 mg. La pas-

tilla se disolvió en 1 ml de agua destilada y precalentada a 37°, para a continuación regular el ph hasta 7.8.

Los portaobjetos se colocaron sobre una placa caliente a 37° y se aplicó la solución de tripsina, dejando que incubaran durante 15 minutos. Luego se retiraba la solución de tripsina y se lavaron los cortes en tampón Tris para regular el ph.

2.3.9.2 Pretratamiento con hialuronidasa y pronasa

Este método se utilizó con anticuerpos *anti-colágeno tipo 2*. El método es parecido al descrito anteriormente en el pretratamiento con tripsina. En este caso se aplica primero la hialuronidasa disuelta en PBS a ph de 5.5 y después la pronasa a ph neutro de 7.4, incubando los portaobjetos durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

2.3.9.3 Pretratamiento con Pronasa

Este proceso encontró utilidad para los anticuerpos *anti interleuquina-1*.

Tras el desparafinado y rehidratado, tal como se ha explicado con anterioridad, se rodearon las muestras sobre el portaobjetos con un círculo graso con un rotulador de tinta hidrófoba. Se disolvieron 0,05 mg de pronasa en tampón Tris, que luego se aplicaron sobre los cortes. Se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en un espacio húmedo. Después se retiró la solución y se sometieron a lavado con tampón Tris.

2.3.9.4 Pretratamiento con tampón de citrato

Este era el método empleado para determinar la *caspasa 3*, para el estudio de la apoptosis de los condrocitos.

Para confeccionar el preparado de tampón citrato se utilizó una combinación de dos soluciones, una de ácido cítrico y otra de citrato sódico. Una vez conseguido el tampón de citrato, fue calentado a 37°C. A continuación se pasó a un recipiente adecuado (cápsula de cristal) para microondas en el que ya estaban los portaobjetos con las muestras. Dicha cápsula fue introducida en el microondas y se calentó hasta la ebullición. Se retiró la cápsula y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se lavaron los portaobjetos nuevamente con tampón Tris y en este caso fue entonces cuando se aplicó el círculo con rotulador graso hidrófobo.

2.3.10 Tinciones inmunohistoquímicas

La unión antígeno-anticuerpo se puede detectar generalmente con ayuda de un anticuerpo secundario marcado, una inmunoglobulina procedente de una especie animal diferente a la del anticuerpo primario. Puede reconocer específicamente el tipo de inmunoglobulina al que pertenece el anticuerpo primario. Esos anticuerpos secundarios pueden estar marcados con biotina, que es una enzima, o con un fluorocromo.

En nuestro trabajo se empleó el método LSAB (Labelled-Streptavidin-Biotin-Method), que se basa en la afinidad entre la estreptoavidina y la biotina, que se une covalentemente al anticuerpo secundario. La glicoproteína Avidina posee 4 nexos para la vitamina biotina. Por cada anticuerpo se unen 150 moléculas de biotina. De esta forma, al anticuerpo primario ligado a su antígeno se une el anticuerpo secundario biotinizado. A éste último se une el complejo estreptoavidina-biotina marcado con un trazador enzimático, en este caso con fosfatasa alcalina, puesto que ésta es capaz de actuar sobre un gran número de cromógenos que pueden aportar una mayor variedad de colores. Este método LSAB es muy sensible.

Tras el desparafinado y la rehidratación, se sometió a los cortes histológicos a su correspondiente preparación para el procesado con el método LSAB. Una vez preparados, los cortes fueron lavados con tampón Tris. Todos los pasos siguientes se realizaron en una cámara húmeda para evitar que los cortes pudieran secarse.

Primeramente se aplicó un reactivo de bloqueo, en este caso se empleó suero de burro, por un periodo de 15 minutos, a temperatura ambiente. Mediante el reactivo de bloqueo se impiden uniones inespecíficas. A continuación se retiró el reactivo de bloqueo y se aplicó el anticuerpo primario, dejando que incubaran los cortes toda la noche a 4°C. En la mañana siguiente se retiró la solución de incubación mediante suaves sacudidas y tras un breve enjuague con agua destilada se lavaron los cortes dos veces por 5 minutos con tampón Tris. Después de esto se aplicó la solución de anticuerpos secundarios biotilinizados, dejando incubar los cortes durante 30 minutos a temperatura ambiente en el espacio húmedo. Justo después se repitió el mismo proceso de lavado que se usó con el anticuerpo primario, y a continuación se procedió a incubar los cortes con el conjugado de fosfatasa alcalina con estreptavidina durante 30 minutos.

El siguiente paso fue someter de nuevo a la solución al proceso de sacudir, posterior enjuague y lavado con tampón Tris.

En este momento se aplicó sobre los portaobjetos el sistema Dakocytomation Substrate-Chromogen según las instrucciones del fabricante (Dako), que es el sustrato cromógeno para la fosfatasa alcalina, dejándolo incubar durante 10 minutos.

En cuanto aparecía un color rojizo se paraba la reacción mediante un breve enjuague con agua destilada. Después se aplicó una tinción para núcleos celulares mediante hematoxilina. Finalmente se montaron los cortes con Crystal Mount de Biomed (Biomed Corp.), que es un medio acuoso permanente para cortes histológicos tratados con fosfatasa alcalina.

2.3.11 Control negativo

Para comprobar la especificidad de cada tinción inmunohistoquímica se preparó un control negativo en cada portaobjetos. El anticuerpo primario fue sustituido por un tampón Tris/BSA y colocado sobre los cortes elegidos. Los demás pasos se siguieron realizando tal y como correspondía a cada tinción.

2.3.12 Evaluación de las tinciones

Para la evaluación de las tinciones se empleó un microscopio, concretamente el Axioskop 2+ de Carl Zeiss (Jena, Alemania). Los cortes fueron fotografiados y documentados mediante un software especial: Axiovision de Carl Zeiss. Los distintos cortes fueron calificados con un sistema que valoraba la intensidad de los colores:

- a) “-“ negativo
- b) “+” positivo débil (+1)
- c) “++” positivo medio (+2)
- d) “+++” muy positivo (+3)
- e) “++++” muy fuerte positivo (+4)

La comparación entre los cortes y sus tinciones se facilitó mediante técnicas informáticas.

2.3.13 Determinación de los anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios fueron obtenidos por preparados facilitados por distintos fabricantes. Algunos de ellos daban instrucciones detalladas sobre cómo y con qué concentración utilizarlos para según qué tipo de tejido concreto, pero otros fabricantes no ofrecían ningún tipo recomendación de uso o manejo.

Por esto hubo que realizar varias pruebas con cada anticuerpo sobre cortes de tejido articular porcino aleatorios (sin utilizar los cortes de nuestra población del estudio) hasta poder establecer un método de utilización concreto reproducible y con la concentración adecuada. De media se realizaron unas

tres pruebas con concentraciones distintas para cada anticuerpo, siguiendo el proceso de tinción inmunohistoquímica descrito en el apartado **2.3.10**.

2.3.14 Supresión de la tinción positiva en los controles negativos positivos

Algunas de las tinciones inmunohistoquímicas presentaron reacciones positivas en los controles negativos, por lo que hubo que realizar unos tratamientos adicionales en los cortes: por un lado se utilizó un sistema de bloqueo de biotina, que bloquea la biotina endógena de los tejidos, y por otro lado se utilizó el inhibidor levamisol-PA, que actúa como inhibidor de la fosfatasa alcalina (PA) endógena que pudiera estar presente en las muestras de tejido de los controles negativos.

A pesar de estos tratamientos se apreciaron algunos controles negativos positivos en aquellos que empleaban anticuerpos primarios de la cabra, por lo que se solicitaron y utilizaron anticuerpos procedentes de otras especies como ratones o conejos.

También se sospechó de una reacción cruzada de los anticuerpos burro-anti-cabra con el tejido del cerdo.

Por esto se dejó de usar cualquier anticuerpo procedente de cabras.

2.4 Diseño del análisis estadístico

Para estimar el efecto de la aplicación de la enzima colagenasa, lo ideal es crear un diseño de datos apareados. En nuestro trabajo, cada cerdo tratado con la enzima en una rodilla actúa de control de sí mismo con la rodilla sana.

El tamaño de la muestra ha sido limitado en este proceso por las dificultades técnicas y presupuestarias del manejo quirúrgico y el mantenimiento de los minipigs.

Para muestras muy pequeñas como la nuestra y con la hipótesis de provocar artrosis en la rodilla tratada con colagenasa, resulta una buena opción la utilización del test exacto de Fisher. Para comparar las varianzas de dos muestras (S12 y S22) se plantea la hipótesis nula y la alternativa.

Hipótesis nula “ H_0 ” $\rightarrow S_1^2 = S_2^2$

Hipótesis alternativa “ H_1 ” $\rightarrow S_1^2 \neq S_2^2$

En nuestro caso la hipótesis nula sería que al inyectar la enzima no se pudieran demostrar cambios sugestivos de artrosis, por lo que no habría diferencias entre ambas muestras. La hipótesis alternativa propone que sí se demuestran esas diferencias. Se aplica una tabla de 2x2 y se calcula el odds ratio.

Finalmente, se emplearon los 10 minipigs mencionados, que como tamaño muestral tiene una probabilidad de éxito del 90%. De esto no podemos inferir que para un número cualquiera la probabilidad de éxito sea la mencionada y tampoco podemos normalizar la muestra ya que eso sería a partir de 30 elementos, por lo tanto hay que aplicar los test no paramétricos.

3. Resultados

3.1 Evaluación del cultivo celular

3.1.1 Estudios morfológicos de los cultivos monocapa

3.1.1.1 Valoración morfológica de los condrocitos del cerdo

Para la creación de trasplantes tridimensionales de condrocitos de cerdo primero había que cultivar las células porcinas de células en monocapa, puesto que a las células de un cultivo les resulta imposible proliferar en estructuras tisulares tridimensionales.

Después de ser aisladas, las células mostraban una forma redonda u ovalada. Los condrocitos son capaces de sintetizar proteínas de adhesión, lo que hace que sean capaces de adherirse a la superficie del frasco de cultivo celular. En el proceso de adherencia, las células cambian su forma redondeada por una más alargada hasta isodiamétrica, es decir, que su morfología cambia. Esta forma alargada a isodiamétrica es típica de células de origen mesenquimal.

La adhesión celular al cabo de 4 días fue del 80%. Algunas de las células que no se adhirieron estaban en pleno ciclo mitótico, durante el cual las células se desprenden completamente de cualquier adherencia, proliferan y después las dos células resultantes vuelven a adherirse. La causa de no adhesión de las restantes células que no lo hicieron permanecen desconocidas.

Durante el transcurso del cultivo celular, las células crecían con tendencia a formar clústers o conglomerados. Cuando esto ocurre, la alta densidad celular provoca senescencia, es decir, que enlentece el ritmo de división y diferenciación celular del cultivo. Para evitar o mitigar este fenómeno se realiza el pasaje de las células, que consiste en transferir un determinado número de células a otro recipiente de cultivo, de modo que cuantas más veces se realicen pasajes se podrán cultivar durante más tiempo. Es una técnica muy sencilla en cultivos en suspensión, pero en este caso se trata de cultivos adherentes por lo que las células deberán ser despegadas con ayuda de tripsina y EDTA.

Al visualizar los grupos de condrocitos cultivados al microscopio, el grado de granulación o concentración de las células de cerdo era mayor que en las humanas.

En el momento de comenzar con el cuarto pasaje celular, los condrocitos eran sometidos a conteo en todos los recipientes de incubación utilizando la cámara de conteo Neubauer.

En ese momento el total era de 16×10^6 células. Diecisiete días después esta cifra ascendía a $65,7 \times 10^6$ células, lo que significa que el número de células se cuadruplicó en ese periodo de 17 días. Si pensamos en un crecimiento exponencial, se establece un ratio de crecimiento de 0,083 por día.

3.1.1.2 Valoración morfológica de los condrocitos humanos

Igual que los condrocitos porcinos, los de origen humano también presentaban una forma redonda u oval cuando estaban en suspensión, y del mismo modo en que lo hacían las células porcinas, los condrocitos humanos se adherían a la superficie del recipiente de cultivo celular y realizaban un cambio morfológico para adoptar una forma alargada hasta isodiamétrica. En cambio, tan sólo precisaban de 2 días hasta alcanzar una adhesión de más del 90%, la mitad que en el caso de las células del cerdo. Y además hay que destacar otra diferencia importante: los condrocitos humanos no crecían formando conglomerados, sino que se repartían homogéneamente por la superficie del recipiente.

En cuanto al conteo, a igual número de recipientes, los condrocitos de origen humano alcanzaban la cifra de 10×10^6 células al comienzo del cuarto pasaje de células. 14 días después el número era de 32×10^6 células. Si partimos de un posible crecimiento exponencial, la tasa del mismo sería de 0,083 por día, la misma tasa de crecimiento que para los condrocitos de origen porcino.

3.1.2 Valoración morfológica de los trasplantes tridimensionales

3.1.2.1 Valoración de los trasplantes de condrocitos porcinos

Al concluir el cultivo celular en monocapa, se realizó la cosecha y contaje de los condrocitos porcinos. Se obtuvieron suficientes células para confeccionar 312 esferas tridimensionales de condrocitos porcinos.

Al comienzo del cultivo tridimensional, se formaban grandes agregados redondos de condrocitos porcinos. En el centro tendían a ser translúcidos y más compactos en los bordes. Rodeando al agregado se podía ver un ribete que se supone que contenía restos de células muertas, detritus y algunas células sueltas que no consiguieron adherirse a las del agregado. Pasados 4 días, el tamaño de esta esfera era de 1351,5 μm x 1238 μm .

Transcurridas dos semanas, se podían observar otros agregados celulares más pequeños y compactos, tanto en el centro como en los bordes. Sus límites eran lisos. A su vez, el ribete celular que rodeaba el gran agregado principal era cada vez más denso, y poco a poco se apreciaba como en su interior se formaban nuevos pequeños agregados celulares esferoidales. El tamaño del agregado central pasadas 4 semanas era de 663 μm x 619 μm , es decir, que era más pequeño, perdiendo cantidad de células en pos del aumento de densidad y tamaño del ribete celular que lo rodeaba, y donde se formaban los pequeños agregados redondos lisos y compactos.

3.1.2.2 Valoración de los trasplantes 3D de condrocitos humanos.

Los trasplantes 3D de condrocitos humanos se fabricaban del mismo modo que sus homólogos porcinos, pero a diferencia de éstos, los agregados celulares que se formaban al principio eran compactos en los bordes y en el centro, no sólo en los bordes. No se formó el ribete celular ni las miniesferas celulares que sí se observaron con los condrocitos porcinos. A los 4 días de cultivo las esferas tenían un tamaño medio de 886 μm x 871 μm . Dos semanas después los agregados eran más pequeños, redondos y presentaban bordes li-

3. Resultados

sos y una apariencia más compacta. En algunas pero no en todas las esferas se podía observar la formación de hilos de proteína. Además, se apreció que en varios pozos había células en monocapa. También se observó cómo se formaban miniesferas, y cuando había un ribete celular en torno a un agregado, éste solía ser muy fino. El tamaño medio de los agregados en ese momento era de 604 μm x 589 μm .

3.2 Evaluación macroscópica de los cóndilos femorales porcinos tratados y de los no tratados con colagenasa

Antes de someter los cóndilos al proceso de descalcificación, éstos fueron fotografiados y valorados macroscópicamente.

Los cóndilos control, es decir, aquellos que no fueron intervenidos ni sometidos al tratamiento con colagenasa, presentaban una superficie lisa, blanca y brillante, sin apreciar rugosidades ni soluciones de continuidad en el cartílago. Estas características son típicas de cartilago articular sano.



Fig. 31: Rodilla izquierda de un individuo del estudio, no tratada con colagenasa. Presenta una superficie articular blanquecina, lisa, brillante y dura, propia de cartilago sano.

3. Resultados

En cambio, los cóndilos femorales de las rodillas sometidas al tratamiento con colagenasa presentaban diferentes apariencias a nivel del cartílago articular. Por un lado había regiones de cartílago blancas y brillantes, y por otro había partes de la superficie que tenían un color amarillento o ambarino y mate, sin brillo. Además, en todos los cóndilos tratados con colagenasa se apreciaban defectos de diverso tamaño y profundidad en el cartílago. En algunos de éstos se llegaba a ver claramente el hueso expuesto.



Fig. 32: Rodilla derecha, sometida al efecto de la colagenasa. En sólo 4 meses han aparecido cambios degenerativos macroscópicos importantes, quedando menos de un tercio de superficie cartilaginosa con aspecto normal en esta rodilla.

También se comprobó la consistencia del cartílago en todos los cóndilos mediante una aguja de carga. La conclusión era que el cartílago sano era más duro en toda su superficie mientras que el tratado con colagenasa era más blando y friable.

3. Resultados



Fig. 33: Representación macroscópica de una rodilla derecha tratada con colagenasa.



Fig. 34: Cóndilos femorales con lesiones del cartilago, color amarillento y pérdida de brillo tras tratamiento con colagenasa. Se puede ver con claridad el hueso subcondral expuesto en zona de carga.



*Fig. 35: Cóndilos tratados con colagenasa; hueso expuesto en las zonas de mayor carga articular.
Cartílago mate y friable.*

En el manejo habitual de las lesiones artrósicas en rodillas de seres humanos, el diagnóstico se basa en tres pilares fundamentales: la clínica, las imágenes radiológicas y los hallazgos macroscópicos. De hecho, una de las formas de diagnosticar y clasificar que más consenso ha provocado en los últimos años es la visualización directa mediante la artroscopia de rodilla. Basándose en los hallazgos macroscópicos de la evaluación artroscópica de la rodilla existe la escala ICRS (International Cartilage Repair Society):

Tabla 5: Escala de ICRS (International Cartilage Repair Society)

Grado	Propiedades
1	Lesiones superficiales, fisuras, brechas e indentaciones
2	Fibrilaciones, lesiones que alcanzan hasta un 50% del grosor del cartílago
3	Pérdida parcial del grosor del cartílago, defectos que se extienden hasta más del 50%
4	Pérdida completa de cartílago, hueso subcondral expuesto

3. Resultados

Aplicando esta escala a los hallazgos macroscópicos de las muestras de los cóndilos tratados con colagenasa de los cerdos, el 100% de las mismas tenían lesiones del cartílago. Así, las 10 rodillas tratadas con colagenasa tenían algún grado de lesión del cartílago articular. 3 rodillas correspondían al grado 3 de la escala, mientras que las otras 7 rodillas presentaban lesiones con pérdida completa del grosor del cartílago, con zonas en las que quedaba expuesto el hueso subcondral, correspondiendo al grado 4 de la escala ICRS.

Utilizando la clasificación de Outerbridge, que también clasifica los grados de artrosis en función de los hallazgos macroscópicos, los resultados obtenidos son los mismos que con la escala ICRS con 3 rodillas en grado 3 y las demás con grado 4.

Grado	Defecto
0	Cartílago normal
1	Reblandecimiento e inflamación del cartílago
2	Fragmentación y fisuración superficial
3	Fragmentación y fisuración profunda, hasta hueso subcondral
4	Hueso subcondral expuesto, gran erosión cartilaginosa

Tabla 6: Clasificación de Outerbridge

3.3 Análisis histológico de los cóndilos sanos y los tratados con colagenasa

3.3.1 Evaluación de la tinción de hematoxilina-eosina

La tinción de hematoxilina-eosina es considerada como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos a través del microscopio fotónico. Es muy útil para obtener una visión general de las muestras de tejido. Los núcleos celulares se tiñen de lila gracias a la hematoxilina mientras que la eosina tiñe de rosa o rojizo la matriz extracelular.

Cóndilos control:

El corte a través del cóndilo sano del cerdo muestra una capa de cartílago sano de grosor uniforme y firme. Su superficie es lisa y no muestra roturas o zonas deshilachadas. Los condrocitos son escasos y están ordenados, es decir: en la superficie se agrupan de forma radial o paralela a la superficie, mientras que a medida que alcanza mayor profundidad, se agrupan en forma tangencial, formando las características estructuras en forma de columna.

Cóndilos tratados con colagenasa:

Todos los cortes transversales de todos los cóndilos tratados con colagenasa mostraban significativos cambios en altura y grosor del cartílago, incluso su completa ausencia en algunas áreas. El grosor de la capa cartilaginosa en estos cóndilos variaba en función de la geografía condílea: así, en las zonas que limitan con la cápsula articular, el cartílago tenía mayor grosor, mientras que en las zonas más cercanas a las zonas de carga eran notablemente más finas. En general, en las zonas de los intercóndilos, lejos de la cápsula articular pero en una zona exenta de carga mecánica, el grosor del cartílago era normal, aunque presentando pequeñas lesiones en forma de soluciones de continuidad y fibrilaciones a nivel de su superficie.

El número de condrocitos era mayor que en el cartílago normal, y tan sólo mantenían su organización espacial típica en las zonas más profundas

cercanas al hueso. En las regiones donde la capa de cartílago era más delgada, la matriz extracelular era muy escasa, contrastando con la exagerada cantidad de células. También se apreciaba esclerosis, es decir, aumento de la densidad del hueso subcondral en dirección de la cápsula articular.

En las zonas cercanas a los bordes articulares, allí donde el cartílago era de mayor grosor, había presencia de agrupaciones proliferativas de condrocitos, a veces con más de 10 células juntas. Estas agrupaciones proliferativas de células se observaron en todas las muestras, teniendo de media entre 5 y 7 células. Su presencia y concentración era mayor cerca de zonas de rotura del cartílago, y además era directamente proporcional al tamaño de la lesión. Aparte de esto, también en esta zona se apreciaba la presencia de roturas de pequeño tamaño pero que podían afectar al grosor total del cartílago, así como rugosidades en la superficie.

En el hueso subcondral, el hueso esponjoso presentaba mayor concentración de matriz o médula ósea. En algunos cóndilos el hueso subcondral presentaba quistes rellenos de esta médula. También se contabilizaron roturas de hueso, es decir, fracturas en zonas relacionadas con esos quistes subcondrales. En las regiones de mayor carga, la densidad del hueso era mayor, tanto a nivel de superficie subcondral como en la esponjosa adyacente.

3.3.2 Evaluación de la tinción Safranina - O - Fast Green

El valor de esta tinción reside en su capacidad para valorar cuantitativamente la presencia de proteoglicanos en el cartílago hialino, que forman una parte importante del cartílago hialino.

Cóndilos control:

La zona tangencial, la más superficial, del cartílago de los cóndilos no sometidos al efecto de la colagenasa no mostraban ninguna tinción con Safranina-O. En cambio, en la zona de transición y en la zona radial la matriz extracelular mostraba una fuerte tinción positiva, debido a la alta concen-

tración de proteoglicanos. A medida que se va profundizando, la matriz volvía a teñirse muy poco o nada, siendo tan sólo las columnas de condrocitos las que permanecían teñidas con fuerza. Cerca de la cápsula articular las tinciones se debilitaban.

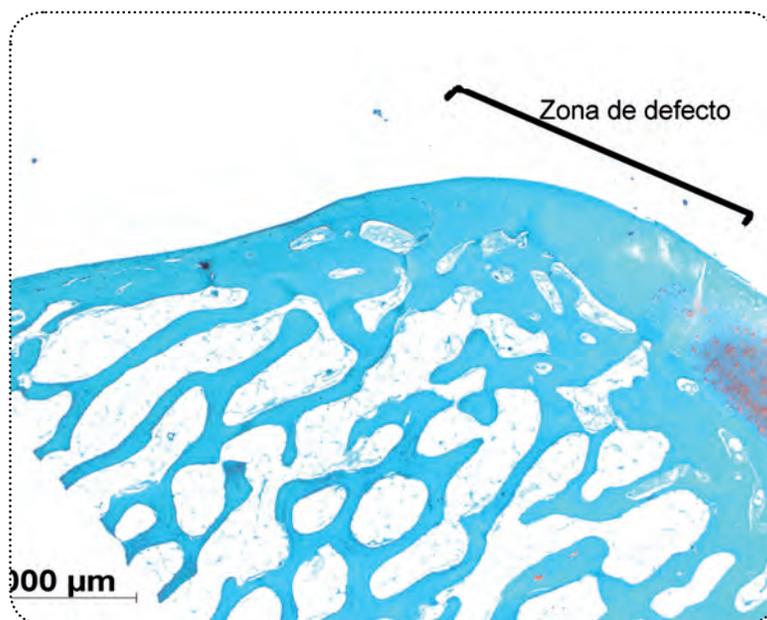


Fig. 36: Tinción típica con Safranina-O en un corte de cartilago sano.

Cóndilos tratados con colagenasa:

Las zonas cercanas a la cápsula articular, donde en estos cóndilos lesionados el espesor del cartilago era mayor, no se objetivó tinción con Safranina-O en las capas superficiales, pero sí en las demás capas más profundas. La intensidad de la tinción era muy variable, desde débil hasta muy fuerte, pero no parecía seguir ningún patrón específico, salvo que la intensidad era más fuerte en cercanía de grupos de condrocitos. En las zonas del cóndilo donde el cartilago tenía menor espesor, era negativa a la tinción con Safranina-O. Allí donde el cartilago de estos cóndilos presentaba un grosor más cercano a la normalidad, es decir, en la zona intercondílea, se apreciaba una fuerte intensidad de tinción en las capas profundas, que disminuía hacia la superficie del cartilago.

También se vió que en las zonas donde había asociada una lesión del tejido óseo subyacente, el cartílago tendía a no teñir con Safranina-O. Tampoco se apreció tinción positiva en torno a roturas o fisuras del cartílago. Tan sólo se veía mayor intensidad de tinción en torno a las agrupaciones de células.

En general, si no había roturas del cartílago ni lesiones óseas, el cartílago presentaba mayor intensidad de tinción con Safranina-O en las zonas de menor espesor de cartílago. Con todo, se trata de una distribución aberrante de la tinción con respecto a la norma hallada en el cartílago de las rodillas sanas.

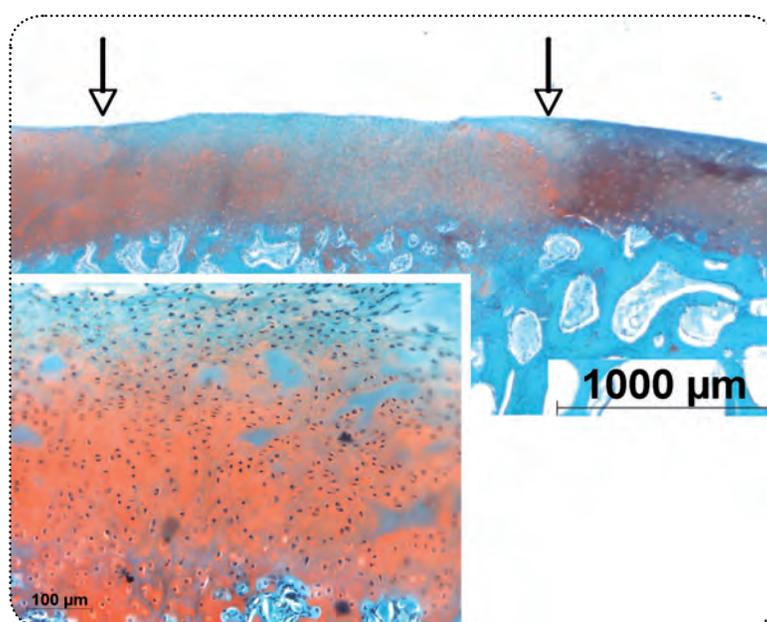


Fig. 37: Muestras de rodillas sometidas al efecto de la colagenasa. Se aprecia un patrón de tinción con Safranina-O aberrante con respecto a la normalidad.

3.3.3 Evaluación de la tinción tricrómica de Masson-Goldner

Mediante esta tinción tricrómica, los núcleos celulares se tiñen de marrón, los tejidos con alto contenido de colágeno tipo I como los ligamentos y el hueso, de color verde oscuro, el cartílago se tiñe de verde claro y los eritrocitos de rojo.

Cóndilos control:

En la superficie del cartílago, la zona de disposición tangencial de las fibras, presentaba una tinción fuerte de color verde oscuro por su alta concentración de colágeno tipo I. En las zonas de profundidad media predominaba el color verde claro, que también se apreciaba en la parte más profunda del cartílago pero en este caso acompañado de un toque rojizo. El hueso subcondral se teñía de verde oscuro y también con manchas de color rojo intenso.

Cóndilos tratados con colagenasa:

El cartílago engrosado que linda con la cápsula articular presentaba en algunos casos vasos sanguíneos en su superficie. Esto es fácilmente identificable puesto que los eritrocitos se tiñen en la tinción de Masson-Goldner como células sin núcleo de color rojo intenso. Este fenómeno de formación de pequeños vasos sanguíneos, también conocido como neoangiogénesis también se apreció en zonas de menor grosor del cartílago, cerca de lesiones grandes como fisuras de espesor total o lesiones del hueso subcondral. En las zonas de cartílago adelgazado el color predominante era el verde oscuro igual que el del hueso subcondral. En esas roturas del cartílago se apreciaban trazas débiles de verde oscuro, que indican una expresión de colágeno tipo I. También el cartílago que queda más cerca de la superficie en las zonas de roturas presentaba un color verde más oscuro que el que estaba por debajo, indicando así una mayor presentación de colágeno tipo I.

En resumen: en los cóndilos tratados con colagenasa, la tinción tricrómica indicaba una mayor presencia de colágeno tipo I así como la formación de pequeños vasos sanguíneos.

3.4 Análisis inmunohistoquímico de los cóndilos sanos y los tratados con con colagenasa

3.4.1 Valoración inmunohistoquímica de los componentes de la matriz extracelular

3.4.1.1 Expresión de colágeno tipo II

El colágeno tipo I es responsable de la estructura y de las características principales del cartílago hialino sano.

Cóndilos control:

Los cóndilos sanos presentan en la totalidad de su corte transversal positividad para la tinción de colágeno tipo II, siendo en la superficie extremadamente fuerte (+4). A medida que se profundiza va perdiendo intensidad hasta una tinción de fuerza media (+2) en la zona mineralizada de la profundidad. Las cápsulas de los condrocitos también son fuertemente positivos en cualquier localización dentro del cartílago sano. El hueso subcondral y el hueso subyacente son negativos para colágeno tipo II.

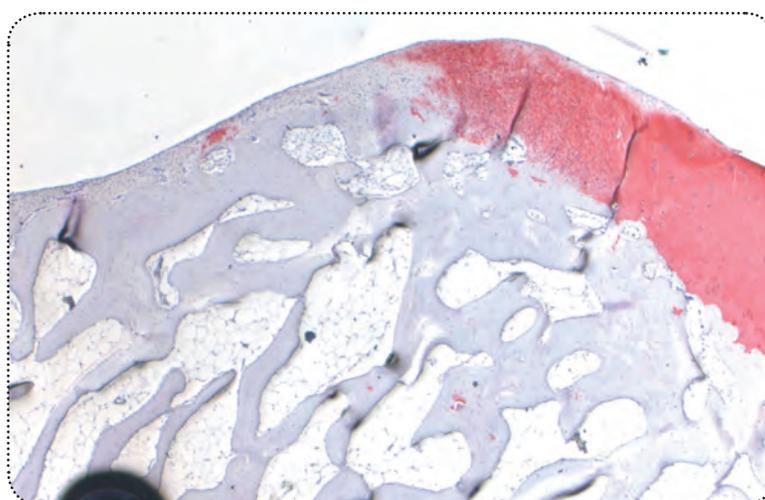


Fig. 38: Expresión con fuerza moderada (+2) de colágeno tipo II en una muestra de rodilla sana, no tratada con colagenasa.

Cóndilos tratados con colagenasa:

Los cortes transversales del cartílago de los cóndilos tratados con colagenasa mostraban una marcada disminución de intensidad de tinción para colágeno tipo II en comparación con los cóndilos sanos. Así, en las zonas de cartílago engrosado cercanos a la cápsula articular y en las zonas intercondíleas, donde el cartílago presentaba un grosor normal, la expresión para colágeno tipo II era débil o media (1+/2+). En las zonas de cartílago más adelgazado no se observó ninguna expresión para colágeno tipo II.

En algunos cortes, la expresión para colágeno tipo II, pese a ser débilmente positiva, daba una imagen fibrosa, sobre todo en las cercanías de lesiones óseas, y la tinción alcanzaba en profundidad las capas superficiales del hueso.

En resumen, la expresión para el colágeno tipo II en el cartílago sometido al efecto de la colagenasa se muestra débil o inexistente. Cuando era positiva, hacía que el cartílago teñido tuviera un aspecto fibroso. También teñía el hueso subcondral y penetraba en éste.

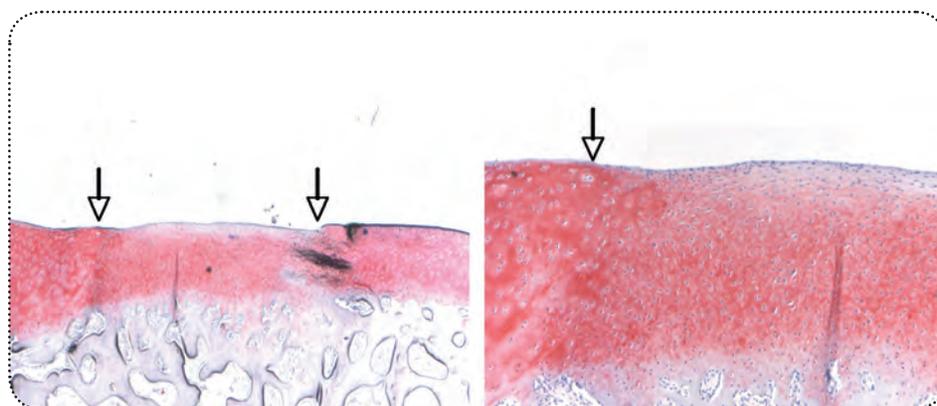


Fig. 39: Patrón aberrante en la expresión de colágeno tipo II en el cartílago de las rodillas sometidas al efecto de la colagenasa.

3.4.1.2 Expresión de colágeno tipo I

El colágeno tipo I es uno de los componentes principales del fibrocartílagos, que se forma en las fases más avanzadas de artrosis o tras lesiones focales extensas del cartílago.

Cóndilos control:

En los cortes transversales se aprecia una fina capa en la superficie del cartílago que muestra una tinción fuertemente positiva (+3) para colágeno tipo I. Esta capa se va haciendo más gruesa a medida que nos acercamos a la zona periférica cercana a la cápsula articular. La matriz extracelular y las células en las demás regiones del cartílago son negativas para la expresión de colágeno tipo I. En cambio, tanto el hueso subcondral como el hueso subyacente sí son positivos para colágeno tipo I.

En general, la intensidad de la tinción varía desde muy débil a muy fuerte en todas las zonas donde se mostraba positiva, sin hallar una razón aparente a esta no uniformidad.



Fig. 40: Expresión de colágeno I en cóndilo sano, no tratado con colagenasa, con una expresión muy fuerte en la superficie del cartílago.

Cóndilos tratados con colagenasa:

El tejido óseo de los cóndilos tratados con colagenasa no mostraba diferencias con los cóndilos control no sometidos al efecto de la colagenasa. En cambio, la principal diferencia radicaba en que se apreció un aumento de la expresión positiva para colágeno tipo I en todo el grosor del cartílago, no sólo en su superficie, y además la intensidad era más fuerte (muy fuerte +3). El hallazgo del aumento de la síntesis de colágeno tipo I es constante en todos los cóndilos tratados con colagenasa.

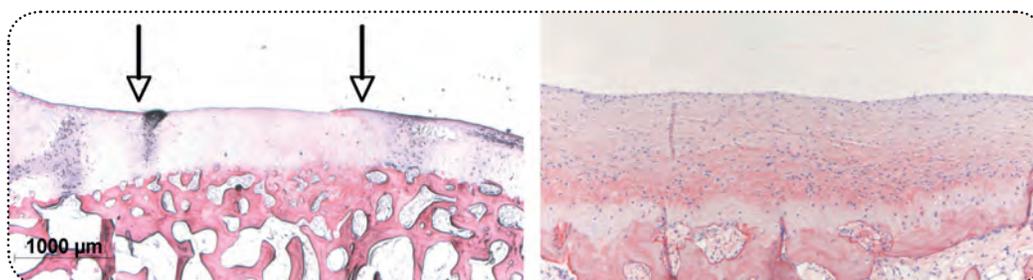


Fig. 41: Patrón aberrante de la expresión de colágeno tipo I en cartilago sometido al efecto de colagenasa.

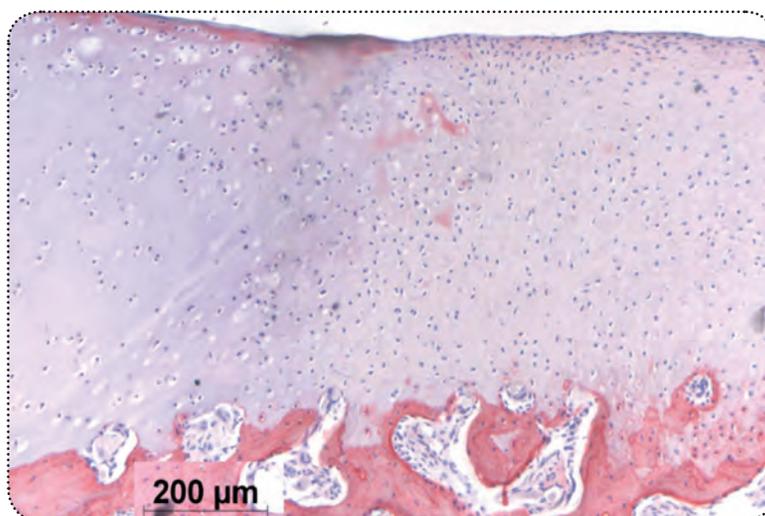


Fig. 42: Detalle del cartilago con supresión de la expresión de colágeno I en una rodilla tratada con colagenasa.

3.4.1.3 Expresión de colágeno tipo III

La principal función de este tipo de colágeno es la de sostén en tejidos expansibles, y se localiza en paredes de vasos sanguíneos, en la glía y otros tejidos fibroconectivos, pero no se encuentra en el hueso ni en el cartílago.

Por esto, los cóndilos control no mostraron ninguna reacción al anticuerpo anti-colágeno tipo III. Los cóndilos sometidos a tratamiento con colagenasa tampoco mostraron ninguna reacción.

3.4.1.4 Expresión de agrecano

Dentro del cartílago hialino, el agrecano es el proteoglicano más grande, y participa en la organización tridimensional y en la estabilidad de las redes de colágeno.

Cóndilos control:

En los cortes tangenciales, es en las capas medias en las que se aprecia una positividad para agrecano débil a media (1+/2+). En las regiones mineralizadas del cartílago, se aprecia expresión débil para agrecano en las cápsulas de los condrocitos.

Cóndilos tratados con colagenasa:

A diferencia de los cóndilos con cartílago sano, en estos cóndilos se apreció una reacción con el anticuerpo anti-agrecano disminuida. Así, las zonas de cartílago engrosado y las de cartílago muy adelgazado no mostraban ningún trazo de agrecano.

El cartílago de zonas exentas de carga con un grosor similar al normal sí tenían expresión positiva para agrecano, de forma muy similar al presentado por el cartílago sano de los cóndilos control. Otra diferencia que se pudo apreciar es que los grupos de proliferación celular en las regiones profundas del cartílago se teñían con más fuerza (2+).

3.4.1.5 Expresión de S-100

La proteína S-100 se sintetiza exclusivamente en condrocitos, aunque su función se desconoce.

Cóndilos control:

Todas las células del cartílago de las articulaciones no sometidas a tratamiento con colagenasa mostraban una fuerte expresión positiva, de distribución homogénea, para la proteína S-100. Las células del tejido óseo son negativas para S-100.

Cóndilos tratados con colagenasa:

En las zonas de cartílago engrosado, las células que se encontraban en la superficie mostraron expresión negativa para S-100. En las zonas medias del espesor la expresión para S-100 era débil (1+), mientras que en la profundidad era fuerte (3+).

En algunos cortes se apreció una tinción de fuerza media (2+) para S-100 en la matriz extracelular, pero negativa para las células de esta región del corte.

Todos los cortes mostraron positividad para la expresión de S-100, pero a diferencia de los cóndilos sanos, eran negativos para la expresión de S-100 en las zonas superficiales allí donde el cartílago tenía mayor espesor, cerca de las cápsulas articulares. En las regiones adelgazadas cercanas a roturas o fisuras del cartílago la expresión era positiva pero débil en las zonas centrales del espesor y fuertes en la zona más profunda cercana al hueso. En resumen, dado que la proteína S-100 expresa presencia de condrocitos, y éstos están presentes tanto en rodillas sanas como en articulaciones artrósicas, lo que es realmente significativo es el cambio en el patrón de distribución en función de la disposición patológica de los condrocitos en las rodillas sometidas al efecto de la colagenasa.

3.4.2 Valoración inmunohistoquímica de la expresión de factores de crecimiento

3.4.2.1 IGF-1

Se trata de una citoquina anabólica, conocida como Factor de Crecimiento Insulino-like 1 (IGF 1), y cuya función en el contexto de la fisiología y patogénesis del cartílago hialino consiste en mantener funcionando la síntesis de prostaglandinas y en estimular la proliferación de condrocitos.

Cóndilos control:

La mayor parte de las células del cartílago sano muestran una expresión de fuerza media positiva para la IGF-1, siendo negativa en la matriz extracelular. En el hueso se aprecia positividad de fuerza media (2+) en las cavidades del hueso esponjoso, aunque en las zonas de hueso cortical no había expresión para IGF-1.

Cóndilos tratados con colagenasa:

Los cortes transversales de los cóndilos sometidos al efecto de la colagenasa mostraron bastantes diferencias de coloración cuando fueron teñidas para mostrar su expresión para la IGF-1. Así, en las zonas de cartílago más engrosado, cercanas a la cápsula articular, había menos células que expresaban positivamente para IGF-1 en comparación con el cartílago de los cóndilos sanos. Además, lo hacían con una fuerza débil (1+). En las zonas adelgazadas del cartílago, donde estaba sometido a mayor carga, se apreciaba una expresión positiva con fuerza media (2+) en la matriz extracelular. Por lo demás se podía apreciar una tinción fuerte (3+) en la superficie así como en la parte que contacta con el hueso subcondral. En la parte intercondílea, donde el cartílago estaba sometido a menor presión mecánica, la tinción para IGF-1 tenía un comportamiento parecido al del cartílago sano, es decir, sin tinción en la matriz extracelular y medianamente positiva para las células allí presentes.

La zona en la que se pudo observar la mayor intensidad de tinción (4+) para la IGF-1 fue en los quistes subcondrales rellenos de matriz a nivel del hue-

so subcondral, aunque esto sólo se observó en 4 de los cóndilos tratados con colagenasa; en el resto la reacción con el anticuerpo anti-IGF-1 en estos quistes era media o fuerte (2+ / 3+).

3.4.2.2 TGF- β

El Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β) es una proteína que actúa como citoquina anabólica, teniendo un importante papel estimulador de la síntesis de diversos componentes de la matriz extracelular. También participa en el control del crecimiento celular de la proliferación celular y de la apoptosis.

En nuestra serie de cortes inmunohistoquímicos, los resultados fueron:

Cóndilos control:

La expresión para TGF- β en las zonas más superficiales del cartílago sano era de fuerza baja a media (1+/2+) en la matriz extracelular y de fuerza media (2+) para las células. A medida que se examinan las zonas más profundas, la matriz pierde toda la expresión para este factor y tan sólo es expresado por las células con intensidad baja a media (1+/2+). En el hueso subcondral no se apreció ninguna expresión para el TGF- β .

Cóndilos tratados con colagenasa:

El resultado de esta prueba en las zonas cercanas a la cápsula articular, donde el cartílago se tenía el mayor grosor, mostraba una expresión débil para TGF- β en la matriz extracelular en todo su grosor, y las células tenían una expresión negativa, al contrario que en el cartílago sano. Allí donde el cartílago presentaba menor grado de lesión macroscópica, manteniendo color y grosor similar al cartílago sano, la expresión era parecida a la encontrada en los cóndilos no sometidos al tratamiento con colagenasa, aunque con una intensidad menor. En cambio, en las zonas muy adelgazadas del cartílago la matriz extracelular expresaba para el TGF- β con fuerza alta (3+). Este hallazgo era constante en todos los cortes: si el cartílago estaba adelgazado, mayor era la expresión para TGF- β . En las zonas en las que el cartílago presentaba roturas y grietas de

diversa envergadura, la expresión era débil cuando la altura o grosor del cartílago no estaba disminuida, y mayor cuando el cartílago era más fino. En torno a los núcleos de proliferación celular cercanos a estas roturas, la expresión era de fuerza media o alta (2+/3+), mientras que la matriz extracelular era negativa. En las zonas de mayor profundidad la expresión para TGF- β era fuerte para las células y débil para la matriz extracelular.

Otro hallazgo constante era que la matriz extracelular próxima a lesiones del hueso subcondral y a los quistes subcondrales rellenos de matriz presentaba una expresión de fuerza media (2+) para TGF- β .

3.4.3 Valoración inmunohistoquímica para la expresión de citoquinas degenerativas o catabólicas

3.4.3.1 Interleuquina - 1 β

La Interleucina o interleuquina 1 es una citocina producida por diferentes tipos de células, pero sobre todo por los macrófagos. Se trata de uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria. Se libera en grandes cantidades ante situaciones de estrés, agresiones al tejido o ante procesos infecciosos. Sus efectos pueden ocasionar respuesta febril, neutrofilia y aumenta la producción de proteínas de fase aguda. Está involucrada en el dolor. La Interleuquina -1 β es el subtipo que se libera al torrente sanguíneo, y en función del receptor actuará sobre un tipo u otro de tejido.

A nivel articular estimula a los condrocitos a producir metaloproteinasas y monóxido de carbono. Las metaloproteinasas actúan como enzimas proteolíticas y descomponen el colágeno.

Cóndilos control:

En ningún condilo sano se detectó reacción con el anticuerpo para Interleuquina -1 β .

Cóndilos tratados con colagenasa:

En las zonas de cartílago engrosado no se objetivó reacción contra la Interleuquina -1 β . Pero en las zonas más adelgazadas de cartílago, la matriz extracelular mostraba una expresión débil. En zonas de cartílago macroscópicamente normal pero de rodillas sometidas al tratamiento con colagenasa se podía ver una expresión débilmente positiva en zonas de superficie y en las zonas más profundas. En zonas próximas a lesiones del cartílago como grietas o lesiones óseas sí había expresión débil para la Interleuquina -1 β . En ningún corte se apreció una expresión fuerte.

3.4.3.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa: TNF- α

El TNF- α es una hormona glucopeptídica proteica perteneciente al grupo de las citocinas que se liberan por células del sistema inmune y que actúan en procesos de inflamación y destrucción articular, entre otros efectos. Tiene una estrecha relación con la interleucina-1 β . Se libera durante procesos infecciosos, inflamatorios autoinmunes y sus receptores son diana para tratamientos de enfermedades como la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante o la psoriasis. A nivel articular estimula a los condrocitos a sintetizar metaloproteinasas.

Cóndilos control:

En todos los cortes de los cóndilos sanos se objetivaron un total de 4 células positivas para expresión de TNF- α .

Cóndilos tratados con colagenasa:

De todos los cortes condíleos tratados con colagenasa sólo se apreció expresión positiva para el TNF- α en la mitad de las muestras, es decir, en 5 rodillas. En todos los casos, la expresión positiva se vió en células que se encontraban en la parte más profunda del cartílago en zonas próximas a lesiones o cambios estructurales del hueso subcondral. En dos casos también se vió expresión débilmente positiva en la superficie del cartílago, y en ambos casos justo sobre lesiones óseas.

3.4.4 Valoración inmunohistoquímica de la expresión de enzimas

3.4.4.1 ADAMTS-5 (Agreganasa-2)

Esta molécula es una metaloproteinasa, y se encarga de descomponer el agregano que es un componente principal de la matriz extracelular del cartílago. Su mayor concentración se encuentra en casos de artritis inflamatoria.

Cóndilos control:

En toda la capa más superficial del cartílago sano, casi todas las células mostraban una expresión para ADAMTS-5 fuerte (2+). La matriz extracelular mostraba en estas zonas una expresión débil a fuerza media (1+/2+) pero distribuida en forma de manchas separadas entre sí, sin orden aparente. En las zonas profundas, mineralizadas y en el hueso no se apreció reacción alguna para el ADAMTS-5.

Cóndilos tratados con colagenasa:

Los resultados fueron muy variables, pero los hallazgos más constantes fueron que en la zona de cartílago engrosado la expresión para ADAMTS-5 era de intensidad media y fuerte en las zonas profundas y medias, mientras que era negativo en la superficie. El patrón de manchas a nivel de la matriz extracelular era constante en todos los cortes analizados. En las zonas de cartílago adelgazado la expresión para ADAMTS-5 era de intensidad débil y media a fuerte (1+/2+/3+) en la matriz extracelular y en las células, repitiéndose este hallazgo en zonas cercanas a grietas del cartílago. En zonas profundas, próximas o no a lesiones óseas, la matriz extracelular no mostraba ninguna expresión, pero sí lo hacían las células, sobre todo las que estaban agrupadas en nidos celulares.

3.4.4.2 MMP-13 (Coleganasa-3)

Esta enzima pertenece al grupo de las metaloproteinasas, y tiene un potente efecto de degradación del componente extracelular. Se relaciona con diversos tipos de carcinomas y metástasis.

Cóndilos control:

Aproximadamente la mitad de los condrocitos sanos mostraron una expresión de fuerza media (2+) para el MMP-13, mientras que la matriz extracelular era completamente negativa. A nivel de los bordes de las cavidades del hueso subcondral también se halló positividad de fuerza media para la expresión de MMP-13.

Cóndilos tratados con colagenasa:

La principal diferencia con respecto a los cóndilos sanos es que en todos los cóndilos sometidos al efecto de la colagenasa, la matriz extracelular mostraba expresión positiva para el MMP-13. La intensidad de esta expresión variaba en función de la zona y tipo de cartílago dañado. Así, en las zonas donde el cartílago estaba más engrosado se objetivó una expresión de fuerza media en la matriz extracelular, y además casi el 80% de las células presentaban positividad para el MMP-13. En zonas de cartílago muy adelgazado, la matriz extracelular y las células eran positivas con intensidad fuerte (+3). También en los bordes y en el interior de las cavidades del hueso subcondral se apreció una fuerte tinción positiva para MMP-13. En general, la intensidad de la expresión para MMP-13 era mayor cuanto más cerca del hueso subcondral. Este hallazgo era constante para todos los cóndilos analizados.

3.4.5 Valoración inmunohistoquímica de la expresión del marcador de Apoptosis Caspasa-3

La caspasa-3 es una enzima que participa en la transmisión de señales de la apoptosis, por lo que juega un papel muy importante en la muerte celular programada.

Cóndilos control:

Ningún cóndilo sano mostró reacción alguna contra el anticuerpo anti-caspasa-3, es decir, que la expresión fue negativa.

Cóndilos tratados con colagenasa:

Tan sólo los cóndilos de cuatro de los diez cerdos mostraron una expresión negativa para la caspasa-3. Los 6 individuos que sí mostraron una expresión positiva lo hicieron únicamente en áreas de intensa degradación del cartílago donde éste estaba más adelgazado, y siempre en las capas más superficiales, y con una intensidad baja a media.

3.5 Resumen de Resultados:

Tabla 6:

PATRONES DEL ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO		
Expresión de:	RODILLAS CONTROL	RODILLAS CON COLAGENASA
<i>Componentes matriz extracelular</i>	Patrón sano	Patrón artrósico
<i>Factores de crecimiento</i>	Patrón sano	Patrón artrósico
<i>Citoquinas catabólicas</i>	Patrón sano	Patrón artrósico
<i>Enzimas</i>	Patrón sano	Patrón artrósico
<i>Marcador de apoptosis caspasa-3</i>	Patrón sano	Patrón artrósico

Tal como se desarrolla en la discusión de los resultados, los hallazgos observados en los cortes de las rodillas sometidas al efecto de la colagenasa son correlativos con patrones propios de articulaciones artrósicas, como se ha demostrado en diversos modelos animales a lo largo de los últimos 20 años.

Tabla 7:

PATRÓN DE LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR		
Expresión de:	Rodillas control	Rodillas colagenasa
<i>Colágeno tipo I</i>	normal	Más intenso (anormal o aberrante)
<i>Colágeno tipo II</i>	normal	Patrón aberrante
<i>Colágeno tipo III</i>	ausente	Ausente
<i>Agrecano</i>	Normal	Aberrante
<i>S-100</i>	Normal	Aberrante

Tabla 8:

PATRÓN DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO		
Expresión de:	Rodillas control	Rodillas Colagenasa
<i>IGF-1</i>	Patrón normal	Patrón aberrante
<i>TGF-β</i>	Patrón normal	Patrón aberrante

Tabla 9:

PATRÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS CATABÓLICAS		
Expresión de:	Rodillas control	Rodillas colagenasa
<i>Interleuquina-1β</i>	Negativo (patrón normal)	Positivo
<i>TNF-α</i>	Débilmente positivo (normal)	Positivo

Tabla 10:

PATRÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS		
Expresión de :	Rodillas control	Rodillas colagenasa
<i>ADAMTS-5</i>	Débil positivo	Fuerte positivo
<i>MMP-13</i>	Débil positivo	Fuerte positivo

Tabla 11:

PATRÓN DE LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE APOPTOSIS CASPASA-3		
Expresión de:	Rodillas control	Rodillas colagenasa
<i>Caspasa-3</i>	Negativo	Positivo en el 60%

3.5.1 Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico es concluyente, ya que, teniendo en cuenta las características que se presentan en una rodilla con artrosis, se ha observado que en el 100% de las 10 rodillas en las que se ha infiltrado la enzima colagenasa, estaba presente el 100% de dichas características, tanto las que se aprecian macroscópicamente como las que se observan en las evaluaciones histológicas e inmunohistoquímicas. Todas las rodillas infiltradas presentaron sistemáticamente el mismo resultado, sin existir una variabilidad que hiciese dudar de que estuviese presente la artrosis. A su vez, todas las rodillas de control presentaron resultados que se corresponden con una rodilla sana.

Si bien el tamaño muestral es de sólo 10 individuos, los resultados observados evidencian muy fuertemente una relación causa-efecto entre la infiltración de la enzima y la presencia de artrosis.

4. Discusión

4.1 Comparativa entre la producción de trasplantes de condrocitos porcinos y humanos.

Para la producción de agregados o grupos celulares tridimensionales implantables fue necesaria la multiplicación de los condrocitos en cultivos monocapa. El aislamiento de condrocitos vivos y su cultivo fue exitoso.

4.1.1 Comparación de los cultivos en monocapa

Los condrocitos del cerdo presentan características muy parecidas a los condrocitos humanos. Ambos tienen una forma redonda u ovalada cuando no se encuentran adheridos a nada, y cuando se adhieren entre sí adquieren una forma alargada o isodiamétrica, siendo este el comportamiento típico para condrocitos de diversas especies.

Sin embargo sí se diferencian en su tamaño. Los condrocitos porcinos son más pequeños y fornidos que los humanos. Por otro lado se observó un comportamiento diferente al adherirse o no entre sí. Así la adhesión de los condrocitos de los cerdos transcurrió más lentamente. Después de los pasajes celulares, se pudo apreciar que la tasa de adherencia de condrocitos porcinos era menor que la de los humanos: cerdo 70% tras 2 días, humanos 90% tras 2 días. Además, en comparación con los de los humanos, los condrocitos de cerdos presentan mayor tendencia a la formación de grupos durante su crecimiento.

A pesar de estas diferencias, ambos tipos de condrocitos presentaban un comportamiento de proliferación muy parecido. Se cree que una de las razones para la menor adherencia de los condrocitos porcinos puede deberse a la administración de la antibioterapia profiláctica. Anderer y Libera ya publicaron en 2002 (115) que en el proceso de cultivo de condrocitos humanos la administración de antibióticos provocaba una disminución de la proliferación y adherencia celular.

4.1.2 Cultivo tridimensional de condrocitos de cerdo

Después de una multiplicación celular suficiente de los condrocitos porcinos, éstos fueron recogidos y trasladados a un cultivo tridimensional. En estas condiciones las células son capaces de formar agregados o agrupaciones tridimensionales. Como causa directa de estas agrupaciones celulares se entiende el contacto directo entre las propias células, que son capaces de unirse mediante enlaces proteicos. Con el paso del tiempo, el tamaño de los agregados celulares decrece, y se cree que esto sucede porque el espacio entre las células adyacentes desaparece, y también porque el espacio entre las miniesferas y las monocapas también se reduce.

4.1.3 Comparación de los cultivos tridimensionales

Si se compara los agregados celulares de los condrocitos del cerdo con los agregados de condrocitos humanos, se puede apreciar que los primeros son, al principio del proceso del cultivo tridimensional, más grandes que los de las células humanas, y que además son translúcidos en su interior. No obstante, al finalizar el proceso de cultivo, ambos tipos de células presentan un tamaño y una densidad similar, tanto en la zona central como en los bordes. Una diferencia al final del proceso es que los agregados de condrocitos porcinos presentan un ribete celular más amplio que en los de las células humanas.

Estas diferencias no se consideran específicas para las diferentes especies, sino dependientes de cada individuo. Por eso no se pueden generalizar estas diferencias halladas en nuestro trabajo.

4.2 Comparación macroscópica e histológica del cartílago sano y el tratado con colagenasa

En la evaluación macroscópica de los cóndilos sometidos al tratamiento con colagenasa, lo primero que llama la atención es la pérdida del aspecto blanquecino, brillante y homogéneo típico del cartílago sano. Tras el tratamiento con colagenasa, la superficie articular de los cóndilos presenta una tonalidad mate y una coloración amarillenta. Ferguson (116) describió y documentó en 1964 que las superficies articulares de articulaciones artrósicas pierden su brillo y se adquieren un tono amarillento. Harrison, Schajowicz y Trueta escribieron en 1953 que el cartílago artrósico era blando cuando se palpaba con una sonda (118). Este hallazgo también fue constante en todos los cóndilos del estudio que fueron tratados con colagenasa. Como conclusión determinamos que el cartílago de las rodillas de los cerdos sometidas al efecto de la colagenasa muestran cambios macroscópicos típicos de artrosis.

Los análisis histológicos de nuestro trabajo han determinado que en las articulaciones sometidas al tratamiento con colagenasa se han producido cambios morfológicos del cartílago articular y del hueso subcondral. En comparación con la articulación sana, aquellas tratadas con colagenasa muestran diferentes alturas y grosores del cartílago, siendo por ejemplo más engrosado el cartílago cercano a la cápsula articular y muy adelgazado aquel que se encuentra en zonas de mayor carga. Por el contrario, el grosor del cartílago sano mantiene una altura uniforme en toda la articulación.

La superficie articular del cartílago sano es lisa y permite un deslizamiento suave sin obstáculos, pero el cartílago sometido al efecto de la colagenasa no. Éste presenta en su superficie rugosidades y fisuras grandes y pequeñas.

A nivel celular, en el cartílago tratado con colagenasa se habían formado grupos de proliferación celular y el número total de células había aumentado. En el cartílago sano los condrocitos poseen una tasa de proliferación muy lenta. En el caso de una lesión del cartílago, se pone en marcha un intento de reparación, que comienza con la proliferación incrementada de los condrocitos, que se juntan para formar los grupos de proliferación. Los mediadores

bioquímicos que inducen a este cambio provienen del líquido sinovial (37, 40). La formación de clones celulares hace su aparición en el estado de artrosis avanzada en seres humanos y animales. En 1997 se propuso una modificación en el sistema de gradación de Yoshimi en referencia de los “nidos de cría” celulares (122). Esa modificación consistió en la valoración por tamaño de los clúster o nidos de células. El sistema concluye que la presencia de clúster con más de 10 células son un signo de artrosis severa. En nuestro trabajo también se apreció la presencia de clúster celulares de más de 10 células en las muestras de cartílago procedentes de las rodillas tratadas con colagenasa.

Por lo demás, los esquemas de clasificación de la artrosis hacen referencia a la estructura y sus cambios en el cartílago hialino. Así, las grietas del cartílago y la pérdida de altura hasta la zona mineralizada, como se ve en todas articulaciones del estudio sometidas al efecto de colagenasa, se consideran signos de artrosis severa.

A nivel histológico, la escala de Mankin, propuesta en 1977, es considerada como la más constante y es la más utilizada mundialmente para determinar el grado histológico de artrosis (119). Según Mankin, la pérdida masiva de intensidad de la tinción con Safranina-O es un indicativo para artrosis severa (121).

Escala de Mankin modificada

- Tinción pericondrocitaria:
 - 0: normal
 - 1: ligeramente aumentada
 - 2: aumentada de forma intensa

- Disposición espacial de los condrocitos:
 - 0: normal
 - 1: hiper celularidad difusa

- 2: clonación
- 3: hipocelularidad
- Intensidad de la tinción de fondo:
 - 0: normal
 - 1: ligera reducción
 - 2: reducción moderada
 - 3: reducción extensa
 - 4: no se aplica tinción

La pérdida de proteoglicanos, en especial del agregano, provoca una pérdida de solidez del cartílago hialino. Esto hace que el cartílago sea vulnerable a las cargas mecánicas, y éstas pueden llevar a la degeneración del cartílago. Dado que en el cartílago artrósico se pueden ver tanto cambios degenerativos como intentos de reparación, no es extraño que en algunas zonas del cartílago tratado con colagenasa en las rodillas de los cerdos de este trabajo, en especial en zonas cercanas a los clúster de proliferación celular, se pueda encontrar una tinción más intensa para la Safranina-O. Aunque la síntesis de proteoglicanos aumenta, no se logra su inclusión en la matriz extracelular de una forma eficaz (40). Los proteoglicanos fijan el agua, y como en la situación descrita existe un aumento de la cantidad de proteoglicanos que no se han unido de forma eficaz a la matriz extracelular, se provoca un edema del cartílago.

El cartílago sano carece de vasos sanguíneos. En consonancia con ello, el cartílago de las rodillas no tratadas con colagenasa era avascular. Por el contrario, en el cartílago de las rodillas que sufrieron el efecto de la colagenasa sí se objetivó la angiogénesis como un hallazgo constante. La neoangiogénesis se ve estimulada por factores de crecimiento como el VEGF (Factor de Crecimien-

to Vascular Endotelial) o el FGF-1 (126). En un estudio del 2006 se demostró que en articulaciones artrósicas se pueden hallar cantidades elevadas de VEGF (125). Otros factores que promueven la angiogénesis son citoquinas que median en la respuesta inflamatoria, como el TNF- α .

La inervación ligada al proceso de vascularización es la responsable del desencadenamiento del dolor en la artrosis. Además puede dar lugar a la destrucción de la perfusión tisular, osificación anormal y una respuesta exagerada a estímulos normales y/o patológicos. Se considera ésta una explicación al fuerte dolor descrito por pacientes cuando reciben un traumatismo banal sobre una articulación artrósica (126). Walsh publicó en 2004 un artículo sobre la angiogénesis en la osteoartrosis. Describió que precisamente esa inervación que acompaña a la angiogénesis fomenta la formación de hueso, en especial la formación de osteofitos (127). En 5 de los diez cerdos estudiados en nuestro trabajo se hallaron vasos sanguíneos en la zona de engrosamiento del hueso subcondral de las rodillas tratadas con colagenasa. Según el trabajo publicado por Mankin, la formación de vasos sanguíneos en el cartílago también es signo de artrosis avanzada (119).

En resumen, según el criterio propuesto por Mankin, que a día de hoy se sigue considerando como válido y estandarizado para determinar la severidad de la artrosis desde un punto de vista histológico e histoquímico, se ha desarrollado artrosis severa en grado III a IV en todas las rodillas tratadas con colagenasa de los cerdos del presente estudio.

4.3 Comparación de los componentes de la matriz extracelular en el cartílago sano y artrósico

El colágeno tipo II y el agrecano son los principales componentes del cartílago hialino y por sus cualidades son responsables de sus características. La matriz extracelular también se encarga de proteger a los condrocitos de posibles daños mecánicos y de mantener la forma fenotípica de las células sanas.

En la superficie del cartílago sano se da una concentración muy alta de colágeno y una muy baja de proteoglicanos, como describen Buckwalter y Mankin (29). Esta proporción entre los dos componentes varía en función de la profundidad del cartílago. En la zona profunda o radial la concentración de colágeno es muy baja, mientras que la de proteoglicanos alcanza su apogeo. Además, los condrocitos son protegidos adicionalmente por una especie de cesto formado por fibrillas de colágeno. Las rodillas no tratadas con colagenasa de los cerdos de nuestro estudio mostraban esta disposición de la matriz extracelular y sus componentes colágeno II y agrecano.

La pérdida de agrecano se puede reconocer en las fases precoces de la artrosis y esto disminuye la rigidez del cartílago, haciéndolo más friable (130, 131). También ha sido descrita la pérdida de colágeno tipo II en las articulaciones artrósicas (130, 132, 133). Este hecho lleva a la pérdida irreversible de las características elásticas y de la integridad estructural del cartílago. En las rodillas tratadas con colagenasa de nuestros cerdos se ha podido determinar la reducción de la concentración e incluso la ausencia total de colágeno tipo II y de agrecano. Éstos son indicios típicos de artrosis.

Los cambios en las cualidades del cartílago conducen a un incremento de la sensibilidad hacia la carga mecánica de la articulación. Esto a su vez lleva a una pérdida de función articular y con frecuencia se asocia a dolor.

Según Pfander et al. (135), el cartílago articular sano en conejos estaría cubierto por una fina capa de colágeno tipo I. También esto se correlaciona positivamente con los hallazgos histológicos de las rodillas no tratadas con colagenasa de los cerdos de nuestro estudio. En el mismo trabajo de Pfander,

así como en otros (96, 103), se describe que en las rodillas de conejos que presentaban artrosis el cartílago dañado presentaba un aumento de la síntesis de colágeno tipo I, hecho éste que también se observó en el cartílago de las rodillas tratadas con colagenasa de los cerdos de nuestro estudio.

En las articulaciones sometidas al efecto de la colagenasa del presente estudio se ha podido observar que en varias zonas de diverso grado de degeneración cartilaginosa, algunas células no marcaban positivamente para el marcador S-100, específico para los condrocitos (ver 3.4.1.5). Coincidió que en estas zonas también se halló el mayor incremento de síntesis de colágeno tipo I. En el cartílago artrósico puede llegarse a producir un cambio en el fenotipo de los condrocitos (136). Por este motivo se pueden encontrar tres tipos de condrocitos en la artrosis avanzada: condrocitos sanos, degenerados y condrocitos denominados “fibroblasto-like” por adquirir un fenotipo más parecido al de un fibroblasto que a un condrocito. Estos condrocitos similares a fibroblastos participan en la regeneración tisular, pero lo hacen sintetizando fibrocartílago cuyo componente principal es el colágeno tipo I, es decir, tejido cicatricial. Aparte de este fenómeno, la angiogénesis permite que al cartílago dañado accedan fibroblastos que también sintetizan fibrocartílago (38).

Aigner et al (134) publicaron en 1993 que en estadios tardíos de la artrosis en humanos en la zona tangencial y en la zona de transición superior del espesor del cartílago, se podía dar la síntesis de colágeno tipo III. En nuestro estudio no se evidenció la síntesis de colágeno tipo III en ninguna muestra analizada, ni en las sanas ni en las sometidas al efecto de la colagenasa. Existen varios trabajos más recientes que o no mencionan el colágeno tipo III o bien lo mencionan como un ausente en los hallazgos del cartílago hialino, tanto sano como degenerado con proceso artrósico (16, 95, 144, 156). Por tanto, podemos considerar que la ausencia de expresión para colágeno tipo III en las rodillas sanas y en las rodillas sometidas al efecto de la colagenasa son hallazgos consecuentes con la norma, y por lo tanto extrapolables.

4.4 Comparación de la expresión de citoquinas entre articulaciones sanas y artrósicas

La producción y los cambios en la cascada de las citoquinas son considerados dos aspectos clave en la patogenia de la artrosis. (4, 5, 16, 46). El mecanismo de acción y los efectos de las citoquinas es muy complejo y todavía no se comprende en su totalidad. Las citoquinas tienen efectos unas sobre otras, tienen efectos superpuestos y crean una red funcional. Son capaces de tener efecto sobre condrocitos incluso con concentraciones tan bajas como a niveles de nano o pico. A través del aumento en la producción de citoquinas destructivas o catabólicas se llega a la disminución de la síntesis de componentes de la matriz extracelular y al aumento de la producción de metaloproteinasas, otras citoquinas y monóxido de carbono (144).

4.4.1 Las enzimas catabólicas IL-1 β y TNF- α

La IL-1 β es una de las citoquinas catabólicas más potentes y se considera clave en la artrosis. Es producida fundamentalmente por la membrana sinovial y por condrocitos. La otra citoquina catabólica que tiene un papel importante en el desarrollo de la artrosis es el TNF- α .

Kobayashi et al (137) demostraron que en el cartílago artrósico de conejillos de indias había un aumento de células con positividad para IL-1 β en los estudios histoquímicos. Esto también es lo que ocurre habitualmente en el cartílago humano, además del aumento de TNF- α , como publicaron Goldring (147) y Pritchard (148).

Estos estudios además mostraron un incremento del número de receptores para estas dos citoquinas en las paredes celulares de condrocitos y células sinoviales en articulaciones con lesiones artrósicas. En nuestro estudio con cerdos no ha habido un llamativo incremento en la reacción positiva a IL-1 β y TNF- α , pero sí se trataba de un número de condrocitos significativamente mayor que en las muestras de las rodillas sanas. Este hallazgo se correlaciona con

los que presentó en su trabajo acerca de la inoculación intraarticular de colagenasa en las rodillas de conejos, Kikuchi en 1998 (89). En este trabajo se apreciaron importantes cambios inflamatorios a nivel de las rodillas de conejos en la primera semana después de haber sido inoculada una dosis intraarticular de colagenasa. Sin embargo, esta reacción inflamatoria disminuía con el tiempo y en la sexta semana tras la inyección era muy débil. Correlativamente, en nuestro trabajo con cerdos, en el momento del análisis inmunohistoquímico unos cuatro meses tras la inoculación de la colagenasa, también se determinaron unos niveles bajos de los mediadores de la inflamación IL-1 β y TNF- α .

Sin embargo, la detección de proteínas por tinción inmunohistoquímica presupone que las citoquinas IL-1 β y TNF- α con los determinantes antigénicos esenciales son capaces de sobrevivir indemnes al proceso de fijación, descalcificación, deshidratación e incorporación y que además demuestran ser suficientemente consistentes en la parafinización. Aparte de este hecho, los anticuerpos utilizados estaban dirigidos contra la IL-1 β y TNF- α humanas, sesgo que también podría haber conducido a una disminuida tinción para estas citoquinas. Por este motivo se recomienda que para futuros estudios se analicen el tejido y el líquido sinovial, puesto que éstos son los que contienen mayor número de mediadores de la inflamación.

4.4.2 IGF-1 y TGF- β , dos citoquinas anabólicas

Para la IGF-1 se ha podido determinar que promueve la síntesis de los principales componentes de la matriz extracelular del cartílago hialino, entre ellos el agregano y el colágeno tipo II (148). La citoquina IGF-1 posee un efecto autocrino y paracrino sobre los condrocitos (149).

Existen numerosos trabajos en los que se ha podido ver cómo la concentración de IGF-1 aumenta en las zonas más degradadas del cartílago artrósico, y que en las zonas sanas o levemente dañadas disminuye o mantiene una concentración estable. El incremento del nivel de IGF-1 es una muestra del intento de reparación del tejido, efecto que sin embargo no es eficaz puesto que tam-

bién aumenta la concentración de ligandos o proteínas de unión de IGFs en las articulaciones artrósicas (151, 152). Además, Pelletier y su equipo demostraron que los osteoblastos del hueso subcondral humano presentaban un incremento en la liberación de IGF-1 (154), y este hecho es considerado como una consecuencia de las señales anómalas de la IGF-1 durante el proceso artrósico.

En nuestro estudio con cerdos se han objetivado en los niveles de IGF-1 cambios propios de la artrosis, con incrementos de su concentración en las zonas del cartílago más dañadas en las rodillas tratadas con colagenasa, así como niveles normales o muy bajos en las rodillas sanas. También vimos un incremento de IGF-1 en el hueso subcondral en las rodillas artrósicas.

Una hipótesis es que como consecuencia del aumento de carga en las zonas dañadas de las articulaciones artrósicas se produce el incremento del nivel de IGF-1 en contexto del intento de reparación tisular, tal como propone Goldring (16, 155). Esto puede producir un aumento en la síntesis de determinados componentes matriciales que podrían explicar la presencia de matriz extracelular en las cavidades del hueso subcondral cuando aparece la artrosis.

La citoquina TGF- β estimula la síntesis de proteoglicanos y la proliferación de condrocitos. Blaney Davidson et al. demostraron en 2006 que la inyección de TGF- β intrarticular en ratones como modelos de artrosis provoca un aumento de la síntesis de proteoglicanos (156). Un dato importante es que la producción local de TGF- β provoca la formación de osteofitos (157).

En el trabajo aquí expuesto se ha podido determinar una disminución del TGF- β , y por lo demás destaca una reacción débil para TGF- β únicamente en las zonas artrósicas donde el hueso subcondral presentaba mayor esclerosis y en las zonas dañadas cercanas al borde articular. Este comportamiento puede conducir a una producción de proteoglicanos disminuía en el cartílago.

La presencia de TGF- β en el hueso subcondral de las articulaciones sometidas al tratamiento con colagenasa podrían llegar a producir osteofitos, y se considera responsable de la esclerosis del hueso subcondral en aquellas muestras histológicas que lo presentaban, en total en 5 cerdos de los 10 empleados, es decir, en el 50% de los casos.

Estos hallazgos hacen hincapié en el hecho de que la expresión alterada de las citoquinas anabólicas no se limita al cartílago, sino que también influye en el hueso subcondral.

La importancia de este hecho radica en que, como ya se comentó en la introducción, en la práctica habitual de la medicina el diagnóstico de la artrosis se basa en la correlación de la clínica y de los hallazgos radiológicos. Y estos últimos dependen directamente de los efectos sobre el hueso subcondral y la formación de osteofitos.

4.5 Las enzimas MMP-13 y ADAMTS-5 y su papel en el desarrollo de la artrosis

Es sabido que la degradación de la matriz extracelular del cartílago en el proceso de la artrosis guarda relación con el aumento importante de la síntesis de las enzimas metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y sus subtipos (Pelletier, 139, 141). Entre éstas se encuentran las enzimas colagenasas. En la tarea de degradar la matriz demostraron las 2 colagenasas, MMP-1 y MMP-13, ser las más eficaces, y con probabilidad las enzimas primarias en digerir el colágeno tipo II. La MMP-13 posee una mayor especificidad contra el colágeno tipo II y a la vez divide pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP), que asumen funciones reguladoras en la organización de la matriz extracelular (138). La degradación del agregano en el cartílago artrósico también ha sido estudiado en los últimos años y esto ha conducido a identificar las enzimas proteolíticas que degradan el agregano de forma específica. De esta forma se considera que las metaloproteinasas colagenasa-3 (MMP-13), agreganasa-1 (ADAMTS-4) y la agreganasa-2 (ADAMTS-5) son los principales responsables de este fenómeno, según publicaron Chambers et al. (140).

Kobayashi et al. (137) publicó un trabajo en el que demostraban cómo en el cartílago sano de conejillos de indias tan sólo los condrocitos dispuestos en la zona tangencial del cartílago mostraban una tinción positiva para MMP-13. Por el contrario, en las rodillas artrósicas, que en ese trabajo se produjo mediante una meniscectomía abierta, la positividad de tinción para MMP-13 se distribuía por todo el cartílago en un número mucho mayor de células. También en el cartílago humano se ha podido observar un incremento en la síntesis de MMP-13 en la totalidad del grosor del cartílago cuando hay artrosis, según Pelletier et al. (141). En este último trabajo no obstante se vió que las muestras de control no teñían MMP-13. Contrariamente a esto, el cartílago de los cóndilos control de los minipigs de nuestro estudio sí mostraba algunas células en zonas profundas y bastantes células en la zona tangencial del espesor del cartílago que expresaban positividad para MMP-13.

El incremento en el nivel de MMP-13 puede tener como consecuencia un aumento de la degradación del colágeno tipo II, y esto puede dañar la consistencia del cartílago y hacerlo más sensible a las cargas mecánicas.

En el anteriormente mencionado trabajo de Pelletier (141), se describe que el nivel de la proteína ADAMTS-5 en el cartílago artrósico en humanos es significativamente mayor que en los controles de cartílago sano, en los que tan sólo presentaba una ligera tinción de fondo.

Sin embargo, en nuestro trabajo se aprecia expresión de ADAMTS-5 tanto en el cartílago sano como en el artrósico. Aún así hay que mencionar que los fenómenos de tinción podían ser muy diferentes entre sí en localizaciones determinadas del cartílago tratado con colagenasa, habiendo unas zonas con tinciones muy fuertes (3+ incluso 4+) y otras con tinciones débiles. El cartílago de 5 rodillas sanas mostraba positividad para ADAMTS-5 en todo su grosor, pero no en las otras 5. Esta forma de expresión para ADAMTS-5 en cartílago sano y artrósico se ha visto en otros trabajos como el de Bluteau et al. (142) y el de Malfait et al. (143).

4.6 La apoptosis en el desarrollo de la artrosis

Una característica muy importante en la artrosis tanto en humanos como en modelos animales es el incremento de la tasa de muerte de condrocitos (158). Los desencadenantes potenciales para la muerte celular de condrocitos en la artrosis son los radicales libres de oxígeno, la activación de receptores protéicos de muerte celular conocidos como ligandos de muerte, disfunciones mitocondriales y estrés mecánico. La muerte celular es un proceso muy complejo, y que puede ser activada por una vía intrínseca y otra extrínseca.

- La *vía intrínseca* responde a una gran variedad de estímulos que se generan en el interior de la célula, y es mediada en gran parte por las mitocondrias. Se relaciona con oncogenes y/o daño en el ADN. Participan numerosos biomoduladores proteicos como las caspasas y las proteasas apoptóticas, entre otras.

- La *vía extrínseca* responde a mediadores en la superficie celular, con receptores que se activan por medio de determinadas proteínas conocidas como ligandos de muerte.

Una vez activada una u otra vía, éstas pueden entrecruzarse de diferentes formas, dependiendo de los mediadores implicados.

Existen estudios que demuestran que determinados procesos propios de la artrosis pueden provocar la apoptosis de condrocitos, como por ejemplo el trabajo del 2007 de Thomas et al. en el que se probó que la creciente degradación de la matriz extracelular provoca un aumento de la expresión de la caspasa-3, que es una conocida peptidasa inductora de la apoptosis (159).

El papel de la apoptosis en la artrosis se conoce desde hace mucho, pero a medida que en los últimos años se está consiguiendo entender mejor sus mecanismos, se está viendo que tiene un papel más importante de lo que se creía hace 10 años. Así lo han demostrado en estudios con modelos animales (160). Como puerta abierta a nuevas terapias, se está trabajando en tratamientos contra la artrosis que tienen como diana el proceso de la apoptosis, actuando sobre diferentes proteínas receptoras ya sea bloqueándolas o inhibiendo la síntesis

de determinadas proteínas mediadoras. Se están llevando a cabo investigaciones relacionadas con dianas genéticas y con ensayos médicos (161).

En nuestro trabajo se ha podido mostrar una fuerte expresión de caspasa-3 en la superficie de las zonas del cartílago más degenerado. Esto es indicativo de un incremento de la muerte celular en las zonas más dañadas del cartílago.

4.7 La idoneidad de la inyección intraarticular de colagenasa en la rodilla del minipig como modelo de artrosis

Los modelos de investigación que utilizan animales son sólo aproximaciones a la realidad, y no se puede esperar de ellos que se correspondan al 100% con todos los factores de la artrosis en el ser humano. Tal es así, que por ejemplo la bipedestación propia del ser humano instaura una muy determinada forma de distribución de la carga en las rodillas al deambular, y que no puede ser exactamente igual que la de un cuadrúpedo como el minipig. La forma más fiable de reproducir esa distribución de carga bípeda desde un punto de biomecánico sólo puede conseguirse mediante estudios *in vitro*, ya sea con maquetas o con rodillas de cadáveres, pero en estos casos el cartílago de estas articulaciones no presentaría los mismos fenómenos biológicos, metabólicos y fisiopatológicos.

En el reino animal no existen otros animales puramente bípedos como el ser humano, ni siquiera los simios presentan una biomecánica de la marcha idéntica a la humana. De todos modos, los grandes primates gozan ya de una consideración social y legal en todo el mundo que los protege de investigaciones como modelo animal (162).

A pesar de todo, el modelo de artrosis animal con la inyección intraarticular de colagenasa muestra muchas similitudes con la artrosis en el ser humano, como se ha mostrado en el presente trabajo con minipigs. La degeneración del cartílago en este modelo animal se asocia con la degradación directa del colágeno tipo II y probablemente se incremente con el estrés mecánico.

4.8 Perspectiva

La artrosis es una patología enormemente prevalente en la población mundial, y tanto el aumento de la esperanza de vida, como los hábitos de vida modernos no favorecen que la incidencia de esta enfermedad disminuya, sino que la tendencia es precisamente la contraria. El presente trabajo no aporta una solución directa a este problema, pero pretende participar y aportar algo en el proceso de la investigación clínica para desarrollar terapias y estrategias terapéuticas para afrontar la patología artrósica.

Existen dos potenciales limitaciones en este trabajo. Por un lado, durante el proceso de descalcificación, fijación, deshidratación y preparación de las muestras para el estudio inmunohistoquímico podrían haberse dañado o destruido algunos de los antígenos cuya presencia o ausencia había que valorar. Y por otro lado, la mayor parte de los anticuerpos apropiados para los estudios inmunohistoquímicos no están testados para posibles reacciones cruzadas con antígenos porcinos.

Para estudios futuros sería interesante poder disponer de una muestra poblacional mayor. Dado que la artrosis es una patología que afecta a la totalidad de la articulación, habría que valorar también la posibilidad de incluir en el estudio histológico e inmunohistoquímico otros tejidos de la articulación como la cápsula y la membrana sinovial por participar activamente en la producción de diversos moduladores de la inflamación.

Aunque todavía no se conoce por completo la patogenia de la artrosis, existen diversos estudios recientes que investigan la participación de varios componentes de la matriz extracelular, citoquinas y enzimas en el desarrollo de la artrosis que no han sido analizados en el presente estudio. Trabajos como el presente comparando articulaciones sanas con otras artrósicas en animales grandes podrían ser útiles para el estudio del efecto de proteoglicanos como el biglicano, la decorina, fibromodulina, citoquinas reguladoras como la IL-4, IL-10 e IL-13, así como enzimas tales como las metaloproteasas MMP-1, -2, -3, -9 y ADAMTS-4.

Desde que el genoma humano fuera secuenciado en julio del 2001, se han puesto en marcha numerosos trabajos científicos en el ámbito de la genética para el estudio y entendimiento de todo tipo de enfermedades y sus posibles tratamientos, entre ellos varios relacionados con el estudio de la artrosis.

El modelo del minipig para estudiar artrosis muestra un gran potencial para la investigación del tratamiento de esta enfermedad, tanto en terapia farmacológica, quirúrgica, y como en terapia celular y biológica, debido al importante parecido biológico y fisiológico.

El presente trabajo con minipigs ha demostrado que se pueden producir agregados tridimensionales de condrocitos porcinos y que la inyección intraarticular de colagenasa en las rodillas de los cerdos conduce a la artrosis de estas articulaciones.

Futuros estudios deberían comprobar la capacidad de regeneración de lesiones del cartílago por parte de los mencionados agregados tridimensionales de condrocitos porcinos cultivados in vitro, así como la posibilidad de sintetizar matriz extracelular condral.

Bibliografía

1. Rouviere H, Delmas A. Anatomía humana: descriptiva, topográfica y funcional. 11ª ed. Masson. 2005
2. Fawcett DV, Jensch RP. Compendio de Histología. 1ª ed. Madrid: MacGraw-Hill Interamericana. 2000.
3. Forriol-Campos F. El cartílago articular: aspectos mecánicos y su repercusión en la reparación tisular. Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología. 2002; 46 (5), p. 380-390.
4. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiología Médica. 10ª ed. Madrid. McGraw-Hill/Panamericana. 2005.
5. Berg WB van den. The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Zeitschrift für Rheumatologie, 1999, 58, p. 136-141
6. Cawston TE, Wilson AJ. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2006; 20 (5), p. 983-1002
7. Mort JS, Billington CJ. Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. Arthritis Research, 2001; 3 (6), p 337-341.
8. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner Jr JF. Handbook of proteolytic enzymes. London: Academic Press, 1998.
9. Sandy JD. Proteolytic degradation of normal and osteoarthritic cartilage matrix. Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS. Osteoarthritis, 2ª ed. New York: Oxford University Press, 2003.
10. Neuhold LA, Killar A, Zhao W, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase MMP-13 induces osteoarthritis in mice. The Journal of Clinical Investigation, 2001; 107 (1), p. 35-40.

11. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996; 271, (3), p. 1544-1550.
12. Caterson B, Flannery CR, Hughes CE, Little CB. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biology*, 2000; 19, p. 333-344.
13. Sabatini M, Lesur C, Thomas M, et al. Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on cartilage loss in vitro and in Guinea Pig model of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2005; 52 (1), p. 171-180.
14. Pelletier JP, Boileau C, Boily M, et al. The protective effect of licofelone on experimental osteoarthritis is correlated with the downregulation of gene expression and protein synthesis of several major cartilage catabolic factors: MMP-13, cathepsin K and aggrecanases. *Arthritis Research & Therapy*, 2005; 7 (5), p. 1091-1102.
15. Kuettner KE, Goldberg VM. Osteoarthritic disorders: Workshop entitled: "New Horizons in osteoarthritis". Rosemont: The Academy, 1995.
16. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis and Rheumatism*. 2012; 64 (6), p.1697-1707
17. Gesundheitsberichterstattung de Bundes: Gesundheit in Deutschland. Berlin 2006.
18. Buckwalter JA, Martin JA. Osteoarthritis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006; 58 (2), p. 150-167.
19. SER: Sociedad Española de Reumatología. Evaluación de la utilización de los recursos sanitarios y de la repercusión socioeconómica de la artrosis de rodilla y cadera, estudio ArtRoCad. Madrid. 2012. <http://www.ser.es/investigacion/Proyectos/Artrocad/Artrocad.php#>
20. Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013; 39 (1), p. 1-19.

21. Dennison E, Cooper C. Osteoarthritis: Epidemiology and classification. *Rheumatology*, 2003, Londres, p. 1781-1791.
22. Østerås N, Risberg MA, Kvien TK, et al. Hand, hip and knee osteoarthritis in a Norwegian population-based study - The MUST protocol. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2013; 14: 201. Published online 2013 July 5. doi: 10.1186/1471-2474-14-201.
23. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, et al. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. *Arthritis Rheumatology*, 1995; 38, p. 1500-1505.
24. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, et al. Incidence of symptomatic hand, hip and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheumatology*, 1995; 38, p. 1134-1141.
25. Delgado G. Evaluación del cartílago articular con resonancia magnética. *Rev Chil Radiol* 2009; 15 (1), p. 39-44.
26. Young AA, Stanwell P, Williams A, et al. Glycosaminoglycan content of knee cartilage following posterior cruciate ligament rupture demonstrated by delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage (dGEMRIC). A case report. *J Bone Joint Surg Am*. 2005; 87, p. 2763-2767.
27. Kurkijarvi JE, Nissi MJ, Kiviranta I, Jurvelin JS, Nieminen MT. Delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) and T2 characteristics of human knee articular cartilage: topographical variation and relationships to mechanical properties. *Magn Reson Med*. 2004; 52, p. 41-46.
28. Maier CF, Tan SG, Hariharan H, Potter HG. T2 quantitation of articular cartilage at 1.5 T. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2003; 17, p. 358-364.
29. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and Osteoarthritis. *Instructional course lectures*, 2005; 54, p. 465-480.

- 30.** Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 1997; 13, p. 456-460.
- 31.** Schiphof D, de Klerk BM, Kerkhof HJ, Hofman A, Koes BW, Boers M, et al. Impact of different descriptions of the Kellgren and Lawrence classification criteria on the diagnosis of knee osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Disease*. 2011; 70 (8), p. 1422-1427.
- 32.** Cameron ML, Briggs KK, Steadman JR. Reproducibility and reliability of the Outerbridge classification for grading chondral lesions of the knee arthroscopically. *Am J Sports Med*. 2003; 31 (1), p. 83-86.
- 33.** Karlsson MK, Magnusson H, Cöster M, Karlsson C, Rosengren BE. Patients with knee osteoarthritis have a phenotype with higher bone mass, higher fat mass, and lower lean body mass. *Clin Orthop Relat Res*. 2015; 473 (1), p. 258-264.
- 34.** Beuningen H.M. van, Kraan, P.M. van der, Arntz, O.J., Berg, W.B. van den: Transforming growth factor- β -1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophytean formation in the murine knee joint. Laboratory investigation; *A Journal of Technical Methods and Pathology*. 1994; 71 (2), p. 279-290.
- 35.** van der Kraan PM, van den Berg WB. Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; 15, p. 237-244.
- 36.** Pauli C, Grogan SP, Patil S, Otsuki S, Hasegawa A, Koziol J, et al. Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011; 19, p. 1132-1141.
- 37.** Pedersen NC. Synovial fluid collection and analysis. *The Veterinary Clinics of North America*, 1978; 8 (3), p. 495-499.
- 38.** Pritzker KPH. Pathology of osteoarthritis. Brandt, K.D., Doherty M, Lohmander L S: *Osteoarthritis*, 2ª ed., Nueva York: Oxford University Press, 2003; p. 49-58.

39. Bartel DL, Bicknell VL, Ithaca MS, Wright TM. The effect of conformity, thickness and material on stresses in ultra high molecular weight components for total joint replacement. *The Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 1986; 68 (7), p. 1041-1051.
40. Puilig O. Zell- und molekularbiologische Grundlagen der humanen Arthrose. *Akt Rheumatol.*, 2003; 28, p. 308-315.
41. Osborn KD, Trippel SB, Mankin HJ. Growth factor stimulation of adult articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, 1989; 7 p. 35-42.
42. Blumenfeld I, Livne E. The role of transforming growth factor (TGF- β), insulin-like growth factor (IGF-1) and interleukin (IL-1) in osteoarthritis and aging joints. *Experimental Gerontology*, 1999; 34, p. 821-829.
43. Lafeber FP, Kraan PM van der, Huber-Bruning O, Berg WB van den, et al. Osteoarthritic human cartilage is more sensitive to TGF- β than is normal cartilage. *British Journal of Rheumatology* 32, 1993, p. 281-286.
44. Beuningen HM van, Kraan PM van der, Arntz OJ, Berg WB van den. TGF- β stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophytes formation in the murine knee joint. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 1994; 71 (2), p. 279-290.
45. Zigang GE, Yang HU, Boon Chin Heng, Zheng Yang, et al. Osteoarthritis and Therapy. *Arthritis & Rheumatism*, 2006; 55 (3), p. 493-500.
46. Moreno Brea MA, Micó JA. TNF y citocinas y dolor: más allá de la inflamación tisular. *Reumatol Clin.* 2009; 5 (2), p. 1-4.
47. Sabatini M, Lesur C, Thomas M, Chomel A, et al. Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on cartilage loss in vitro and in a guinea pig model of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2005; 52 (1), p. 171-180.

48. Tetlow LC, Adlam DJ, Wooley DE: Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes in osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis & Rheumatism*, 2001; 44 (3), p. 585-594.
49. Moos V, Fickert S, Müller B, Weber U, Sieper J: Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage. *The Journal of Rheumatology*, 1999; 26 (4), p. 870-879.
50. Neogi T, Zhang Y. Epidemiology in Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013; 39 (1) p. 1-19.
51. Kingsbury SR, Gross HJ, Isherwood G, Conaghan PG. Osteoarthritis in Europe: impact on health status, work productivity and use of pharmacotherapies in five European countries. *Rheumatology Oxford*, 2014; 53 (5), p. 937-47.
52. Hawker GA, Stanaitis I. Osteoarthritis year in review 2014: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014; 22, (12) p. 1953-7
53. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *The Journal of Bone and Joint Surgery, British Vol.*, 1961; 43 (B), p. 752-757.
54. Vuolteenaho K, Moilanen T, Knowles RG, Moilanen E. The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 2007; 35 (4), p. 247-258.
55. Marcacci M, Filardo G, Kon E. Treatment of cartilage lesions: What works and why? *Injury, Int. J. Care Injured*. 2013; 44 (1), p. 11–15
56. Kon E, Buda R, Filardo G, et al. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010; 18 (4), p. 472–479.
57. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, et al. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010; 11, p. 220.

58. O'Reilly S, Doherty M. Signs, symptoms and laboratory tests. Osteoarthritis 2^a ed. Nueva York. Oxford University Press, 2003; p. 197-210.
59. Gobbi A, Nunag P, Malinowski K. Treatment of full thickness chondral lesions of the knee with microfracture in a group of athletes. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2005; 13, p. 213-221.
60. Mithoefer K, Williams RJ III, Warren RF, et al. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. J Bone Joint Surg Am. 2005; 87, p. 1911-1920.
61. Mithoefer K, Williams RJ III, Warren RF, Wickiewicz TL, Marx RG. High-impact athletics after knee articular cartilage repair: a prospective evaluation of the microfracture technique. Am Journal of Sports Medicine. 2006; 34, p. 1413-1418.
62. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. Journal of Bone and Joint Surgery Am. 2004; 86, p. 455-464.
63. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. New England Journal of Medicine. 1994; 331, p. 889-895.
64. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. Clin Orthop Relat Res. 2000; 374, p. 212-234.
65. Yamabe E, Ueno T, Miyagi R, Watanabe A, Guenzi C, Yoshioka H. Study of surgical indication for knee arthroplasty by cartilage analysis in three compartments using data from Osteoarthritis Initiative (OAI). BMC Musculoskeletal Disorders. 2013; 14, p. 194.
66. Erggelet C, Kreuz PC, Mrosek EH, Schagemann JC, Lahm A, Ducommun PP, et al. Autologous chondrocyte implantation versus ACI using 3D-bioresorbable graft for the treatment of large full-thickness cartilage lesions of the knee. Arch Orthop Trauma Surg. 2010; 130 (8), p. 957-964.

67. Manfredini M, Zerinati F, Gildone A, Faccini R. Autologous chondrocyte implantation: a comparison between an open periosteal-covered and an arthroscopic matrix-guided technique. *Acta Orthop. Belg.* 2007; 73, p. 207-218.
68. Sánchez-Martín M. Cartílago articular de la rodilla. Marbán, 2010.
69. Berta Á, Duska Z, Tóth F, Hangody L. Clinical experiences with cartilage repair techniques: outcomes, indications, contraindications and rehabilitation. *Eklek Hastalik Cerrahisi.* 2015; 26 (2), p. 84-96.
70. Hangody L, Ráthonyi GK, Duska Z, Vásárhelyi G, Füles P, Módis L. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *Journal of Bone and Joint Surgery Am.* 2004; 86-A (Suppl 1), p. 65-72.
71. McDermott AG, Langer F, Pritzker KP, Gross AE. Fresh small-fragment osteochondral allografts. Long-term follow-up study on first 100 cases. *Clin Orthop Relat Res.* 1985; (197), p. 96-102.
72. Kisiday JD, Kopesky PW, Evans CH, Grodzinsky AJ, McIlwraith CW, Frisbie DD. Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hidrogel cultures. *Journal of Orthopaedic Research.* 2008; 26, p. 322-331.
73. Miljkovic ND, Cooper GM, Marra KG. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 16, p. 1121-1130.
74. Lee SY, Nakagawa T, Reddi AH. Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein (SZP)/lubricin by mesenchymal progenitors in the infrapatellar fat pad of the knee joint treated with TGF-beta1 and BMP-7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 376 (1), p. 148-153.
75. Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, Chung U, Kawaguchi H. Transcriptional induction of ADAMTS5 protein by Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *The Journal of Biological Chemistry.* 2013; 288 (40), p. 28620-28629.

76. Gao SG, Zeng C, Song Y, et al. Effect of osteopontin on the mRNA expression of ADAMTS4 and ADAMTS5 in chondrocytes from patients with knee osteoarthritis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015; 9 (5), p.1979-1983.
77. Brandt KD. Animal models in osteoarthritis. *Biorheology*, 2002; 39 (1-2), p. 221-35.
78. Nelson DL, Cox MM. Lehninger. Principios de Bioquímica. 4ªEd. Editorial Omega. 2005.
79. Pratt CW. Bioquímica. Editorial Manual Moderno. 2012.
80. Pritzker KPH. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Annals of Rheumatoid diseases*. 1994; 53, p. 406-420.
81. Pons JM, Rodés J, Andreu A, Arenas J. La investigación clínica olvidada. *Med Clin (Barc)*. 2013; 15; 140 (7) p. 325-31.
82. Frenkel JK. Introduction: The choice of animal models for the study of disease processes in man. *Federation Proceedings*; 1969, p. 160-161.
83. Altman RD, Dean DD. Osteoarthritis research: animal models. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1990; 19 (4), p. 21-25.
84. Arlet J, Gédéon P. Arthrose experimentales. *Revue du Rheumatism et des Maladies Ostéoarticulaires*. 1982; 49 (2), p. 145-152.
85. Griffiths RJ, Schrier DJ. Advantages and limitations of animal models in the discovery and evaluation of novel disease-modifying osteoarthritis drugs (DMOADs). *Osteoarthritis*. 2ª ed. Nueva York, Oxford University Press, 2003, p. 411-416.
86. Pond MJ, Nuki G. Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Annals of Rheumatic Diseases*. 1973; 32 (4), p. 387-388.

87. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Altman RD, et al. Collagenolytic activity and collagen matrix breakdown of the articular cartilage in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 1983; 26 (7), p. 866-874.
88. Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, et al. Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis and Rheumatism*. 1973; 16 (3), p. 397-405.
89. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intraarticular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis and cartilage*. 1998; 6 (3), p. 177-186.
90. Kiapour AM, Shalvoy MR, Murray MM, Fleming BC. Validation of Porcine Knee as a sex-specific Model to Study Human Anterior Cruciate Ligament Disorders. *Clin Orthop Relat Res*. 2015; 473 (2), p. 639–650.
91. Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. Recent advances in the use of *Sus Scrofa* (pig) as a model system for proteomic studies. *Proteomics*. 2011; 11 (4), p. 776-793.
92. Groenen MAM, Archibald AL, Uenishi H, et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*. 2012; 491 (7424), p. 393-398.
93. Fürst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, Sanroman F, Watzek G. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. *Clinical Oral Implants Research*. 2003; 14, p. 500–508.
94. Fuerst G, Gruber R, Tangl S, Sanroman F, Watzek G. Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. *Clinical Oral Implants Research*. 2004; 15, p. 301–307.
95. Fuerst G, Reinhard G, Tangl S, Mittlböck M, Sanroman F, Watzek G. Effect of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. *Journal of Clinical Periodontology*. 2004; 31, p. 784–790.

96. Wancket LM. Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Vet Pathol.* 2015; 52 (5), p. 842-850.
97. Traini T, Neugebauer J, Thams U, Zöller JE, Caputi S, Piattelli A. Peri-implant bone organization under immediate loading conditions: collagen fiber orientation and mineral density analyses in the minipig model. *Clinical Implant Dentistry and Related Research.* 2009; 11, p. 41–51.
98. Neugebauer J, Traini T, Thams U, Piattelli A, Zöller JE. Peri-implant bone organization under immediate loading state. Circularly polarized light analyses: a minipig study. *J Periodontol.* 2006; 77 (2), p.152-160.
99. Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. *Introducción a la biología celular.* 3ª ed. Panamericana. 2011.
100. Yamakawa K, Kamekura S, Kawamura N, et al. Association of microsomal prostaglandin E synthase1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis & Rheumatism.* 2008; 58 (1), p. 172-183.
101. Berg WB van den, Blaney Davidson EN, Vitters EL, et al. Resemblance of osteophytes in experimental osteoarthritis to TGF- β – induced osteophytes: limited role of bone morphogenetic protein in early osteoarthritic osteophyte formation. *Arthritis & Rheumatism.* 2007; 56 (12), p. 4065-4073.
102. Yorimitsu M, Nishida K, Shimizu A, et al. Intra-articular injection of Interleukin 4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints. *Osteoarthritis & Cartilage.* 2008; 16 (7), p. 764-771.
103. Adães S, Mendonça M, Santos TN, Castro-Lopes JM, Ferreira-Gomes J, Neto FL. Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 2014; 16 (1):R10.

104. Teshima R, Hagino H, Muraoko T, et al. Role of subchondral bone in osteoarthritis development: a comparative study of two strains of guinea pigs with and without spontaneously occurring osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2007; 56 (10), p. 3366-3374.
105. Teeple E, Elsaid KA, Fleming BC, et al. Coefficients in friction, lubricin and cartilage damage in the anterior cruciate ligament-deficient guinea pig knee. *J Orthop Res*. 2008 February; 26(2), p. 231–237.
106. Johnson AR, Pavlovsky AG, Ortwine DF, et al. Discovery and characterization of a novel inhibitor of matrix metalloproteinase-13 that reduces cartilage damage in vivo without joint fibroplasia side effects. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282 (38), p. 27781-27791.
107. Uth K, Trifonov D. Stem cell application for osteoarthritis in the knee joint: A minireview. *World Journal of Stem Cells*. 2014; 6 (5), p. 629-636.
108. Black LL, Gaynor J, Gahring D, et al. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*. 2007; 8 (4), p. 272-284.
109. Boileau C, Martel-Pelletier J, Abram F, et al. Magnetic Resonance Imaging can accurately assess the long-term progression of knee structural changes in experimental dog osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2008; 67 (7), p. 926-932
110. Burger C, Kabir K, Müller M, et al. Retropatellar chondromalacia associated with medial osteoarthritis after meniscus injury. One year of observations in sheep. *European Surgical Research*. 2006; 38, p. 102-108.
111. Oakley SP, Lassere MN, Portek I, et al. Biomechanical, histologic and macroscopic assesment of articular cartilage in a sheep model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004; 12 (8), p. 667-679.

- 112.** Ham KD, Loeser RF, Lindgren BR, et al. Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in Cynomolgus monkeys. *Arthritis & Rheumatism*. 2002; 46 (7), p. 1956-1964.
- 113.** Uthamanthil RK, Edwards RB, Lu Y, Manley PA, Athanasiou KA, Markel MD. In vivo study of the short-term effect of radiofrequency energy on chondromalacic patellar cartilage and its correlation with calcified cartilage pathology in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research*. 2006; 24 (4), p. 716-724.
- 114.** Huser CAM, Davies ME. Validation of an In vitro single-impact load model of the initiation of osteoarthritis-like changes in articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*. 2006; 24 (4), p. 725-732.
- 115.** Anderer U, Libera J. In vitro engineering of human autogenous cartilage. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002; 17 (8), p. 1420-1429.
- 116.** Ferguson AB Jr. The pathological changes in degenerative arthritis of the hip and treatment by rotational osteotomy. *The Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*. 1964; 46, p. 1337-1352.
- 117.** Horton WE Jr, Bennion P, Yang L. Cellular, molecular and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *Journal Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006; 6 (4), p. 379-381.
- 118.** Harrison MHM, Schajowicz F, Trueta J. Osteoarthritis of the hip: a study of the nature and evaluation of the disease. *The Journal of Bone and Joint Surgery; British Volume*. 1953; 35-B (4), p. 598-626.
- 119.** Lippiello L, Hall D, Mankin HJ. Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*. 1977; 59 (4), p. 593-600.
- 120.** Pearson RG, Kurien T, Shu KS, Scammell BE. Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis--reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. *Osteoarthritis Cartilage*. 201; 19 (3), p. 324-331.

121. van der Sluijs JA, Geesink RG, van der Linden AJ, Bulstra SK, Kuyer R, Drukker J. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *Journal Orthopaedic Research*. 1992; 10 (1), p. 58-61.
122. Little C, Smith S, Gosh P, Bellenger C. Histomorphological and immunohistochemical evaluation of joint changes in a model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy in sheep. *The journal of Rheumatology*. 1997; 24, p. 2199-2209.
123. An YH, Martin KL. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. 2003. New Jersey: Humana Press Inc.
124. Montuenga L, Esteban FJ, Calvo A. *Técnicas en histología y biología celular + StudentConsult en español*. Ed. Elsevier Masson. 2014.
125. Fay J, Varoga H, Wruck CJ, Kurz B, et al. Reactive oxygen species induce expression of vascular endothelial growth factor in chondrocytes and human articular cartilage explants. *Arthritis Research*. 2006; 8 (6), R189.
126. Walsh, DA. Pearson CI. Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Research*. 2001; 3 (3), p. 147-153.
127. Walsh DA. Angiogenesis in osteoarthritis and spondylosis: successful repair with undesirable outcomes. *Current Opinion in Rheumatology*. 2004; 16 (5), p. 609-615.
128. Suri S, Gill S, Wilson D, Walsh DA. Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Annals of Rheumatic disease*. 2007; 66 (11), p. 1423-1428.
129. Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *Journal of Anatomy*. 1997; 191 (1), p. 1-13.
130. Yasuda T, Poole AR. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway. *Arthritis & Rheumatism*. 2002; 46 (1), p. 138-148.

131. Carney SL, Billingham MEJ, Muir H, Sandy JD. Demonstration of increased proteoglycan turnover in cartilage explants from dogs with experimental osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*. 1984; 2 (3), p. 201-206.
132. Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, et al. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Disease*. 2002; 61 (2), p. 78-81.
133. Appleton CT, McErlain DD, Pitelka V, Schwartz N, et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2007; 9 (1), R 13.
134. Aigner T, Bertling W, Stöss H, Weseloh G, von der Mark K. Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*. 1993 Mar;91(3), p. 829-837.
135. Pfander D, Rahmanzadeh R, Scheller EE. Presence and distribution of collagen II, collagen I, fibronectin and tenascin in rabbit normal and osteoarthritic cartilage. *The journal of Rheumatology*. 1999; 26 (2), p. 386-394.
136. Tesche F, Miosge N. New aspects of the pathogenesis of osteoarthritis: the role of fibroblast-like chondrocytes in late stages of the disease. *Histology and Histopathology*. 2005; 20 (1), p. 329-337.
137. Kobayashi T, Notoya K, Naito T, Unno S, Nakamura A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor Y agonist, reduces the progression of experimental osteoarthritis in guinea pig. *Arthritis & Rheumatism*. 2005; (52 (2), p. 479-487.
138. Monfort, J, Tardif G, Reboul P, Mineau F. Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloproteinase-13: Identification of a new biglycan cleavage site. *Arthritis Research & Therapy*. 2006; 8 (1), R 26.
139. Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteinases and inhibitor in arthritic diseases. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2001; 15 (5), p. 805-829.

140. Chamber MG, Cox L, Chong L, Suri N, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanases cleave aggrecan in different zones of normal cartilage but colocalize in the development of osteoarthritic lesions in SRT/ort mice. *Arthritis & Rheumatism*. 2006; 44 (6), p. 1455-1465.
141. Pelletier JP, Boileau C, Boily M, Brunet J, Mineau F, Geng C, et al. The protective effect on experimental osteoarthritis is correlated with the down-regulation of gene expression and protein synthesis of several major cartilage catabolic factors: MMP-13, cathepsin K and aggrecanases. *Arthritis Research & Therapy*. 2005; 7 (5), p. 1091-1102.
142. Bluteau G, Conrozier T, Mathieu P, Vignon E, Herbage D, Mallein-Gerin F. Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1526 (2), p. 147-158.
143. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD. Inhibition of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem*. 2002; 277(25), p. 22201-22208.
144. Attur M, Krasnokutsky-Samuels S, Samuels J, Abramson JB. Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2013; 25 (1), p. 136-144.
145. Martel-Pelletier J, Pelletier JP. New insights into the major pathophysiological processes responsible for the development of osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2005; 34, p. 6-8.
146. Pritchard S, Guilak F. Effects of interleukin-1 on calcium signaling and the increase of filamentous actin in isolated and in situ articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2006; 54 (7), p. 2164-2174.
147. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2000; 43 (9), p. 1916-1926.

148. Loeser RF, Gandhi U, Long DL, Yin W, Chubinskaya S. Aging and Oxidative Stress Reduce the Response of Human Articular Chondrocytes to Insulin-Like Growth Factor-1 and Osteogenic Protein-1. *Arthritis & Rheumatology*. 2014; 66(8), p. 2201-2209.
149. Morales TI. The Quantitative and Functional Relation between Insulin-Like Growth Factor-I (IGF) and IGF-Binding Proteins During Human Osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 2008; 26 (4), p. 465-474.
150. Martin JA, Scherb M, Lembke LA, Buckwalter J. Damage Control Mechanisms in Articular Cartilage: The Role of the Insulin-like Growth Factor I Axis. *The Iowa Orthopaedic Journal*. 2000;20:1-10.
151. De Ceuninck F, Caliez A, Dassencourt L, Anract P, Renard P. Pharmacological disruption of insulin-like growth factor 1 binding to IGF-binding proteins restores anabolic responses in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*. 2004; 6 (5):R393-R403.
152. De Ceuninck F, Caliez A, Dassencourt L, Anract P, Renard P. Pharmacological disruption of insulin-like growth factor 1 binding to IGF-binding proteins restores anabolic responses in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*. 2004; 6 (5), p. 393-403.
153. De Nardo CM, Lenzo JC, Pobjoy J, Hamilton JA, Cook AD. Urokinase-type plasminogen activator and arthritis progression: contrasting roles in systemic and monoarticular arthritis models. *Arthritis Research & Therapy*. 2010; 12 (5):R199.
154. Massicotte F, Aubry I, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Fernandes J, Lajeunesse D. Abnormal insulin-like growth factor 1 signaling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Arthritis Research & Therapy*. 2006; 8 (6):R177.

155. Goldring MB. Insight into the function of DIO2, a susceptibility gene in human osteoarthritis, as an inducer of cartilage damage in a rat model: is there a role for chondrocyte hypertrophy? *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2013; 21 (5), p. 643-645.
156. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van den Berg WB, van der Kraan PM. TGF β -induced cartilage repair is maintained but fibrosis is blocked in the presence of Smad7. *Arthritis Research & Therapy*. 2006; 8 (3):R65.
157. Lotz M, Martel-Pelletier J, Christiansen C, et al. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013; 72 (11), p. 1756-1763.
158. D'Lima D, Hermida J, Hashimoto S, Colwell C, et al. Caspase inhibitors reduce severity of cartilage lesions in experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2006; 54 (6), p. 1814-1821.
159. Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007; 15 (1), p. 27-34.
160. Zamli Z, Adams MA, Tarlton JF, Sharif M. Increased Chondrocyte Apoptosis Is Associated with Progression of Osteoarthritis in Spontaneous Guinea Pig Models of the Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14 (9), p. 17729-17743.
161. Ou Y, Tan C, An H, et al. Selective COX-2 inhibitor ameliorates osteoarthritis by repressing apoptosis of chondrocyte. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2012; 18 (6), p. 247-252.
162. Knight A. The beginning of the end for chimpanzee experiments? *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine : PEHM*. 2008; 3, p. 16.

163. Edkins TJ, Koller-Eichhorn R, Alhadeff JA, Mayer U, Faust H, Del Tito BJ. Assessment of Potential Cross-Reactivity of Human Endogenous Matrix Metalloproteinases with Collagenase Clostridium histolyticum Antibodies in Human Sera Obtained from Patients with Dupuytren's Contracture. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*. 2012; 19 (4), p. 562-569.

164. Eckhard U, Huesgen PF, Brandstetter H, Overall CM. Proteomic protease specificity profiling of clostridial collagenases reveals their intrinsic nature as dedicated degraders of collagen. *Journal of Proteomics*. 2014; 100 (100), p. 102-114.

