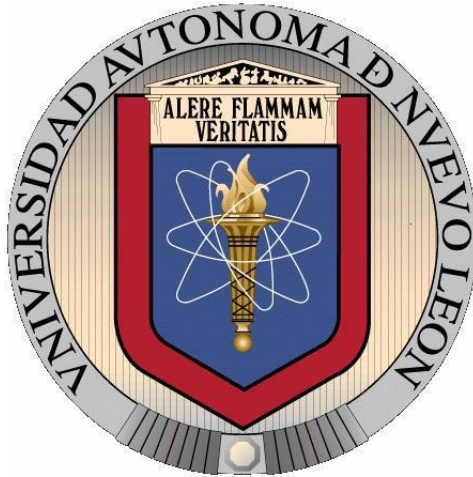


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“EVALUACIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DEL TRATAMIENTO CON PLASMA
RICO EN PLAQUETAS EN OSTEOARTROSIS DE RODILLA”**

POR

M.C. MARIO ALBERTO SIMENTAL MENDÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

AGOSTO, 2016

**“EVALUACIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DEL TRATAMIENTO CON PLASMA RICO
EN PLAQUETAS EN OSTEOARTROSIS DE RODILLA”**

Aprobación de la Tesis

Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Directora de Tesis

Dr. med. José Félix Vilchez Cavazos
Co-Director de Tesis

Dr. C. Jorge Lara Arias
Miembro de la Comisión de Tesis

Dr. C. Salvador Luis Saiz y Fernández
Miembro de la Comisión de Tesis

Dr. C. Gerardo Raymundo Padilla Rivas
Miembro de la Comisión de Tesis

Dra. med. Raquel Garza Guajardo
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, bajo la Dirección de la Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez y en el Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), bajo la Co-Dirección del Dr. med. José Félix Vílchez Cavazos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento para la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez a quien quiero y admiro. Por mi excelencia y formación profesional en investigación, gracias a su cariño, guía y apoyo. No tengo palabras que puedan manifestar mi gratitud por toda la enseñanza y responsabilidad que siempre me ha mostrado. Gracias por la confianza y libertad otorgada para la realización de este proyecto.

Agradezco profundamente al Dr. José Félix Vílchez Cavazos, un excelente médico, por permitirme formar parte de su equipo de investigación en este y otros proyectos. Por todos sus consejos, apoyo incondicional, sinceridad y por compartirme de su calidez humana y excelencia profesional.

Gracias al Dr. Jorge Lara Arias por su ayuda y por compartir su conocimiento sin restricciones. Siempre ha sido más fácil el inicio de un nuevo proyecto con su ayuda.

Por toda su dedicación y todo lo que aprendí de él, agradezco al Dr. Salvador Luis Said y Fernández. Por la paciencia mostrada y el invaluable aporte de su experiencia como un excelente investigador.

Al Dr. Gerardo Raymundo Padilla Rivas por toda la buena disposición que siempre me mostró al pedirle su ayuda y su consejo.

Al personal del Banco de Hueso y Tejidos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, a Coral, Marlene, Alejandro Rentería, Gricelda Ordanza, David Pacheco, Noé y a la Sra. Dora por hacer más agradable y divertida la realización de este trabajo, por toda su amabilidad y cariño.

Agradezco el apoyo y la ayuda del personal del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, a quienes fueron parte fundamental para lograr concluir satisfactoriamente este proyecto, en especial al Dr. Domingo Garay, al Dr. Eduardo Gómez y a la Dra. Yadira Tamez, y al personal de enfermería, a Mayra, Lucy y Blanquita por su gran ayuda.

A mis compañeros de posgrado, en especial a mis amigos Sonia Lozano, Elsa Garza, Paulina Delgado, Blanca Álvarez, Daniel Arellanos, Ángel Merino y Carlos González por enseñarme que las cosas se pueden hacer bien con dedicación y perseverancia, por su ayuda y respaldo el laboratorio, porque siempre había tiempo para platicar de otra cosa que no fuera trabajo. Gracias por brindarme su amistad, cariño y apoyo durante toda la grata experiencia del posgrado.

A todo el personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, en particular a Juany, Cristy, Angélica, Daniel, Óscar, Normita y Ariadna por todas y cada una de sus atenciones.

A mi esposa, confidente, amiga, colega y compañera de vida, a quien jamás encontraré la forma de agradecer su amor, apoyo, comprensión y confianza, esperando que entiendas que mis logros son también tuyos.

A mis padres y hermanos, a quienes jamás podré agradecerles lo suficiente el amor, comprensión y apoyo brindado en los momentos buenos y difíciles de mi vida, hago este logro compartido, esperando que comprendan que mis ideales y esfuerzos son inspirados en cada uno de ustedes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este doctorado.

Doy gracias a Dios por todas y cada una de las bendiciones que he recibido en mi vida.

DEDICATORIA

Tu sonrisa cada día al reconocer mi rostro es la motivación más grande de mi esfuerzo y dedicación para buscar cada día lo mejor para ti. No es fácil, eso lo sé, pero pondré lo mejor de mí para procurar que así sea.

Te amo, Ady.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Osteoartrosis	3
2.1.1. Definición.....	3
2.1.2. Epidemiología	3
2.2. Diagnóstico de la Osteoartrosis	4
2.3. Tratamiento de la Osteoartrosis.....	6
2.4. Terapias Alternas para el Tratamiento de la Osteoartrosis	6
2.5. Plasma Rico en Plaquetas	8
2.5.1. Definición.....	8
2.5.2. Plaquetas.....	8
2.6. El PRP como Terapia para la Regeneración de Tejidos.....	10
2.7. El PRP en la Regeneración del Cartílago Articular.....	11
2.7.1. Características generales del cartílago articular	11
2.7.2. Investigaciones sobre el uso del PRP en la regeneración del cartílago articular	12
2.7.3. Evaluación del PRP en modelos <i>in vitro</i> de OA	13
2.8. Estudios Clínicos sobre el uso de PRP como Tratamiento para la Osteoartrosis	14
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1. Estudio Clínico (Evaluación <i>in vivo</i> del Tratamiento con PRP).....	20
6.1.1. Pacientes y diseño del estudio.....	20

6.1.1.1. Criterios de inclusión	20
6.1.1.2. Criterios de exclusión	21
6.1.2. Preparación del PRP	21
6.1.3. Procedimiento de los tratamientos	22
6.1.4. Seguimiento y manejo post-tratamiento	22
6.1.5. Cuantificación de IL-1ra y TGF- β con ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	23
6.2. Evaluación <i>in vitro</i> del Tratamiento con PRP	24
6.2.1. Obtención y cultivo de explantes de cartílago	24
6.2.2. Preparación del PRP	25
6.2.3. Extracción de ARN total	26
6.2.4. Análisis de expresión génica por PCR en tiempo real (qPCR).....	27
6.2.5. Análisis histoquímico	28
6.2.6. Análisis inmunohistoquímico	30
6.3 Análisis Estadístico	30
7. RESULTADOS	32
7.1. Estudio Clínico (Evaluación <i>in vivo</i> del Tratamiento con PRP).....	32
7.1.1. Características de los pacientes	32
7.1.2. Análisis del PRP	33
7.1.3. Evaluación clínica de los pacientes.....	34
7.2. Evaluación <i>in vitro</i> del Tratamiento con PRP	40
7.2.1. Características de los donadores y muestras biológicas obtenidas	40
7.2.2. Análisis de expresión génica.....	40
7.2.3. Análisis histológico.....	42
8. DISCUSIÓN.....	47
8.1. Evaluación <i>in vivo</i> del Tratamiento con PRP	47
8.1.1. Efectividad clínica del tratamiento con PRP en OA leve de rodilla	48
8.1.2. Cuantificación de IL-1ra y TGF- β en muestras de PRP infiltrado	49
8.2. Evaluación <i>in vitro</i> del Tratamiento con PRP.....	49
8.2.1. Efecto del PRP e IL-1 β sobre la expresión de marcadores específicos en explantes de cartílago	50
8.2.2. Efecto del PRP sobre la histología de explantes de cartílago	53

9. CONCLUSIONES	56
10. LITERATURA CITADA	57
11. ANEXOS	68
11.1. Encuestas y Cuestionarios para la Evaluación Clínica de los Pacientes	68
11.2. Técnicas y Protocolos Empleados	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama general para la obtención del plasma rico en plaquetas (PRP) infiltrado en los pacientes.	22
Figura 2. Diagrama de flujo del estudio de acuerdo a los estándares CONSORT	32
Figura 3. Media de los valores de EVA en los grupos de tratamiento convencional y PRP.	35
Figura 4. Media de los valores de WOMAC para las tres subcategorías en los grupos tratamiento convencional y PRP.	36
Figura 5. Media de los valores totales de WOMAC en los grupos de tratamiento convencional y PRP.	37
Figura 6. Media de los valores del componente mental (MCS) y físico (PCS) del cuestionario SF-12 en los grupos tratamiento convencional y PRP.	37
Figura 7. Media de los valores de los componentes evaluados en el cuestionario SF-12 en los grupos de tratamiento convencional y PRP.	39
Figura 8. Expresión génica relativa de los distintos marcadores en explantes de cartílago.	42
Figura 9. Análisis de la tinción con safranina-O.	43
Figura 10. Número de condrocitos por campo en los explantes de cartílago.	44
Figura 11. Análisis de la tinción inmunohistoquímica de colágeno tipo II.	45
Figura 12. Análisis de la tinción inmunohistoquímica de colágeno tipo I.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de los gránulos alfa de las plaquetas y sus categorías funcionales.	9
Tabla 2. Ensayos clínicos sobre la aplicación de la terapia con PRP en OA de rodilla.	15
Tabla 3. Nombre y símbolo de cada uno de los genes analizados por qPCR y el código correspondiente a cada una de las sondas TaqMan empleadas.	28
Tabla 4. Descripción de los parámetros evaluados con la Escala de Mankin modificada.	29
Tabla 5. Comparación de los datos demográficos de la población de estudio.....	33
Tabla 6. Análisis de componentes sanguíneos en muestras de sangre total, PRP y PRP activado.	34

ABREVIATURAS

ACAN	Agrecano
ADAMTS-4	Metaloproteasa con trombospondina 1 motivo 4
ADAMTS-5	Metaloproteasa con trombospondina 1 motivo 5
AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
α IIb β 3	Glicoproteína IIb/IIIa
α v β 3	Integrina alfa V/integrina beta 3
ANOVA	Análisis de varianza
AOSSM	<i>American Orthopaedic Society for Sports Medicine</i>
APS	<i>Autologous Protein Solution</i>
B2M	Beta-2-microglobulina
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
BMP-2	Proteína morfogenética de hueso 2
BMP-4	Proteína morfogenética de hueso 4
BMP-7	Proteína morfogenética de hueso 7
CD40L	Ligando del grupo de diferenciación 40
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
COL1A2	Colágeno tipo I alfa 2
COL10A1	Colágeno tipo X alfa 1
COL2A1	Colágeno tipo II alfa 1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
C _T	Threshold cycle
CV	Coeficiente de variación
C1	Proteína del sistema del complemento tipo 1
CXCL5	Quimiocina 5 con motivo CXC
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento endotelial
ELISA	Ensayos por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EQ-VAS	<i>EuroQol Visual Analogic Scale</i>
ESSKA	<i>European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery & Arthroscopy</i>
EVA	Escala visual análoga
Factor Va	Factor V activado
FIX	Factor IX
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos-2
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gas-6	Proteína específica del gen 6 de la detención de crecimiento
GPIb	Glicoproteína Ib
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
hGH	Hormona de crecimiento humano

IGF-I	Factor de crecimiento parecido a insulina tipo I
IGF BP-3	Proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a insulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IKDC	International Knee Documentation Committee
IL-1 α	Interleucina-1 alfa
IL-1 β , IL1 β	Interleucina-1 beta
IL-1ra	Antagonista del receptor de interleucina-1
IL-8	Interleucina-8
IMC	Índice de masa corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
KOOS	<i>Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score</i>
KSS	<i>Knee Society Score</i>
M-MLV	Virus de leucemia murina de Moloney
MCP-3	Quimiocina específica de monocitos-3
MCS	<i>Mental component summary</i>
MEC	Matriz extracelular
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa
MMPs	Metaloproteasas de matriz
MMP13	Metaloproteasa de matriz 13
NF- κ B	Factor nuclear-kappa B
NRS	<i>Numerical Rating Scale</i>
OA	Osteoartrosis
OATS	<i>Osteochondral Autograft Transfer System</i>
OKS	<i>Oxford Knee Score</i>
PAI-I	Inhibidor del activador del plasminógeno-I
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCS	<i>Physical component summary</i>
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PECAM-I	Molécula plaquetaria de adhesión celular endotelial
PF4	Factor plaquetario 4
PLGA	Ácido poliláctico glicólico
PRGF	Plasma rico en factores de crecimiento
Proteína S	Proteína plasmática dependiente de vitamina K
PRP	Plasma rico en plaquetas
PRPa	Plasma rico en plaquetas activado
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
RUNX-2	Factor de transcripción 2 relacionado a runt
SOX9	Región determinante del sexo en el cromosoma Y Box-9
TAFI	Inhibidor de fibrinólisis activado por trombina
Tenger	<i>Tegner Lysholm Knee Scoring Scale</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TIMP-1	Inhibidor tisular de metaloproteasas 1
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteasas

TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
u-PA	Activador del plasminógeno urocinasa
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
vWF	Factor de Von Willebrand
WOMAC	<i>Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index</i>

RESUMEN

Mario Alberto Simental Mendía

Fecha de Graduación: Agosto, 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina

Título de la Tesis: Evaluación *in vivo* e *in vitro* del tratamiento con plasma rico en plaquetas en osteoartrosis de rodilla.

Número de páginas:

Área de Estudio: Terapia Celular.

Introducción. La osteoartrosis (OA) de rodilla es una enfermedad degenerativa y progresiva del cartílago articular y se caracteriza por presentar un estado catabólico en el cartílago inducido por citocinas pro-inflamatorias. La infiltración de plasma rico en plaquetas (PRP) autólogo se ha propuesto como una alternativa terapéutica, debido a su contenido de citocinas biológicamente activas. Además, el PRP ha mostrado tener propiedades anti-inflamatorias y regenerativas en cartílago articular dañado. Los mejores resultados del uso de esta terapia se han obtenido en cartílago con un menor grado de lesión y de OA. **Objetivos.** 1) Comparar la respuesta clínica a la infiltración con PRP y al tratamiento convencional en pacientes con OA leve, y 2) determinar el efecto *in vitro* del PRP sobre la expresión de marcadores genéticos específicos y sobre la matriz extracelular del cartílago. **Materiales y Métodos.** Se analizó un total de 65 pacientes con diagnóstico clínico y radiográfico de OA grado I y II. Los pacientes se aleatorizaron en dos grupos: a 32 se les trató con paracetamol (500 mg/8 h) por 6 semanas, y 33 recibieron 3 infiltraciones intra-articulares de PRP (una cada dos semanas). Todos los pacientes fueron evaluados con la Escala Visual Análoga (EVA), el índice de OA de Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC) y la encuesta de salud SF-12 al inicio del tratamiento y 6, 12 y 24 semanas después. Se obtuvieron explantes de cartílago y PRP de 10 donadores que fueron sometidos a cirugía de reemplazo articular de rodilla. Los explantes se cultivaron en frascos *spinner* por hasta 28 días, en agitación constante y en presencia de interleucina-1 β (IL-1 β), PRP o PRP/IL-1 β . Se cuantificó la expresión de genes asociados a inflamación y degradación de la matriz del cartílago (MMP-13, ADAMTS5, IL-1 β) y de aquellos involucrados en la restauración de la matriz extracelular (colágeno tipo II, agregano y SOX9). Se realizó un análisis histológico de acuerdo a la escala de Mankin modificada y a la cuantificación del marcaje por inmunohistoquímica de colágeno tipo II y tipo I. **Resultados.** Comparación de la respuesta clínica a la infiltración con PRP y del tratamiento convencional. Ambos tratamientos mostraron una disminución significativa en la EVA desde la semana 6. La disminución en el nivel de dolor de EVA fue mayor en el grupo tratado con PRP. Los pacientes tratados con PRP tuvieron una mejoría sostenida en la funcionalidad de la rodilla, al menos hasta las 24 semanas. Los resultados de SF-12 indican una mejoría en la calidad de vida sólo en el grupo tratado con PRP a las 6, 12 y 24 semanas. Evaluación del efecto *in vitro* del PRP sobre la expresión de marcadores genéticos específicos y sobre la matriz extracelular del cartílago. La expresión de los genes catabólicos y el valor de la escala de Mankin

fueron menores en los explantes tratados con PRP y PRP/IL-1 β que en los tratados con IL-1 β . Se observó una mayor expresión de los genes involucrados en la síntesis de matriz extracelular en los explantes tratados con PRP y PRP/IL-1 β en comparación con el explantes tratados con IL-1 β . Los explantes tratados con PRP y PRP/IL-1 β mostraron una mayor presencia de proteoglicanos y colágeno tipo II, así como una menor presencia de colágeno tipo I; estos explantes también tuvieron una mejor integridad de la superficie y un incremento significativo en el número de condrocitos al compararlos con los explantes tratados con IL-1 β . **Conclusiones.** El tratamiento con PRP presentó un mejor resultado clínico que el tratamiento convencional con paracetamol, con una disminución sostenida en los puntajes de las escalas EVA y WOMAC y una mejor calidad de vida de los pacientes. Además, el PRP favoreció la restauración de la matriz extracelular en explantes de cartílago con OA leve y disminuyó el efecto pro-inflamatorio de la IL-1 β . El uso del PRP es una terapia prometedora para el cartílago dañado en OA temprana, ya que promueve la reparación de la matriz extracelular, disminuye la inflamación y retrasa la degeneración del cartílago.

Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Directora de Tesis

1. INTRODUCCIÓN

La osteoartritis (OA) se considera una enfermedad articular degenerativa caracterizada por destrucción del cartílago articular, hipertrofia del hueso en sus márgenes y cambios en la membrana sinovial.^{1,2} Más que una entidad patológica, la OA debe ser vista como una enfermedad multifactorial, en donde intervienen factores genéticos, mecánicos, metabólicos y hormonales.²⁻⁴ La integridad del cartílago articular depende de un fino equilibrio homeostático entre dos procesos dirigidos por los condrocitos: el anabólico y el catabólico; el primero conduce a la formación y renovación de nuevo tejido y el segundo a la degradación del cartílago. La biosíntesis llevada a cabo en el anabolismo, está asociada con la secreción de antagonistas de citocinas, de inhibidores de proteasas y de producción de matriz extracelular (MEC) que es estimulada por citocinas y factores de crecimiento.³⁻⁵ Durante el catabolismo ocurren estímulos pro-inflamatorios caracterizados por la secreción de metaloproteasas de matriz (MMPs), la supresión de la síntesis de la matriz cartilaginosa y la inhibición de la proliferación de los condrocitos, además el rol que desempeñan los radicales libres, el óxido nítrico, las citocinas y algunos factores de crecimiento.^{5,6} En la OA, estos estímulos pro-inflamatorios como la interleucina-1 β (IL-1 β) son producidos en la membrana sinovial y en los condrocitos. La IL-1 β representa la citocina fundamental en la inducción de las respuestas catabólicas actuando directamente sobre los condrocitos suprimiendo la síntesis de colágeno tipo II y de proteoglicanos, debilitando así la matriz del cartílago. Estimula la expresión de las MMPs como colagenasas y estromelina e induce la producción de óxido nítrico.⁷⁻⁹ En general, la respuesta de los condrocitos durante el proceso de la OA ocurre en cinco etapas: proliferación y muerte celular, cambios en la actividad sintética, cambios en la degradación, modulación fenotípica de los condrocitos articulares y formación de osteofitos.^{9,10} Para combatir los efectos adversos de este padecimiento, se han diseñado diferentes tratamientos basados en la administración de analgésicos, antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, suplementos como glucosamina y condroitín sulfato o infiltraciones intra-articulares con ácido hialurónico.^{11,12} Sin embargo, estas terapias están dirigidas al control de los síntomas y no estimulan una regeneración del cartílago articular. En los últimos años, se ha propuesto al plasma rico en plaquetas (PRP) como un tratamiento alternativo

para ayudar a combatir la progresión de la destrucción articular en enfermedades degenerativas como la OA.¹³

El PRP es una fuente abundante de factores de crecimiento anabólicos como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de crecimiento parecido a insulina tipo I (IGF-I), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), entre otros, con propiedades condro-protectoras.^{14,15} En concreto, pueden estimular la proliferación celular de los condrocitos, promover la síntesis de agarosano y colágeno tipo II, así como disminuir los efectos catabólicos de citocinas inflamatorias como IL-1 β y MMPs.^{16,17} Los resultados de los ensayos actuales sugieren que el PRP puede tener potencial para mejorar la reparación del cartílago, atenuando los síntomas de la OA y mejorando la función articular, con un perfil de seguridad aceptable.^{18,19} Sin embargo, hace falta más evidencia clínica en el uso de PRP como tratamiento en OA, así como estudios aleatorizados con un grupo control, heterogeneidad en el grado de la lesión dentro de los grupos de estudio y evidencia científica en cuanto al mecanismo de acción del PRP.²⁰ Estudios realizados *in vitro* en explantes de cartílago con OA sugieren que el tratamiento con PRP reduce significativamente la expresión de la metaloproteasa de matriz-13 (MMP-13) y la concentración de mediadores inflamatorios, al mismo tiempo que estimula la producción de ácido hialurónico endógeno, disminuyendo de esta manera el catabolismo del cartílago articular.²¹ Nuestro objetivo principal en este proyecto fue evaluar la respuesta clínica al tratamiento con PRP infiltrado en pacientes con OA leve de rodilla e investigar el efecto sobre la expresión génica de marcadores específicos de inflamación y regeneración articular y sobre la regeneración de la MEC *in vitro* mediante la adición de PRP al cultivo de explantes de cartílago humano con OA.

2. ANTECEDENTES

2.1. Osteoartrosis

2.1.1. Definición

La OA es una enfermedad crónica y degenerativa de las articulaciones, es la causa más frecuente de dolor y una de las causas principales de discapacidad y dependencia de la población adulta; lo cual genera grandes gastos en el área de la salud.²² La OA es la lesión más común del sistema esquelético; es una enfermedad lentamente progresiva y degenerativa, caracterizada por la degeneración erosiva del cartílago articular, el hueso subcondral, los ligamentos, la cápsula de la articulación, la membrana sinovial y los meniscos.^{23,24}

La OA se puede presentar en cualquier articulación, pero es más frecuente que ésta se presente en las articulaciones que soportan el mayor peso del organismo o aquellas articulaciones relacionadas con un trauma repetitivo, principalmente en la cadera y la rodilla. Ocasionalmente estos traumatismos crónicos también se presentan en las articulaciones de la mano, del pie y de la columna cervical y lumbar.²⁵

2.1.2. Epidemiología

La OA es más frecuente en el sexo femenino (2:1), aunque después de la menopausia la relación hombre/mujer es 1:1. Su frecuencia aumenta con la edad en hombres y mujeres, de tal manera que, de acuerdo con los criterios radiográficos, el 30% de las personas entre 45 y 60 años de edad y más del 80% de los mayores de 80 años, presentan OA en al menos una articulación.^{25,26}

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las lesiones musculoesqueléticas son la causa más común de dolor severo a largo plazo y de incapacidad física, que afectan a cientos de millones de personas alrededor del mundo.²³ A nivel mundial, la OA es la cuarta causa de morbilidad en mujeres y la octava en hombres mayores de 60 años.^{27,28} En México, se estimó una prevalencia de OA en población adulta de 2.3% en un estudio realizado en la Ciudad de México en el año 2002.²⁹ Sin embargo, para el

año 2011, otro estudio que tomó en cuenta a 5 poblaciones de diferentes estados del país (Ciudad de México, Yucatán, Sinaloa, Chihuahua y Nuevo León), reportó una prevalencia promedio del 10.5%; presentándose con mayor predominio en los estados de Nuevo León (16.3%), Chihuahua (20.5%) y Ciudad de México (12.8%).³⁰ De acuerdo a los reportes estadísticos del Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS), la OA constituye uno de los diez principales motivos de consulta en el primer nivel de atención médica.³¹

Clínicamente, esta condición se caracteriza por dolor de la articulación, rigidez, limitación del movimiento, crepitación, efusión ocasional y grados variables de inflamación.²³ Por otro lado, también se caracteriza por un desbalance de procesos anabólicos y catabólicos;³² lo que trae como consecuencia un daño progresivo en el cartílago y, en última instancia, la discapacidad del paciente. La década que inició en el año 2000 fue llamada “la década del hueso y la articulación”, para fomentar la investigación en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de las lesiones musculoesqueléticas tales como la OA.³³

2.2. Diagnóstico de la Osteoartrosis

El diagnóstico clínico de la OA es eminentemente clínico-radiológico, se realiza con base en una historia clínica completa y exploración física dirigida. No se solicitan estudios de laboratorio de forma rutinaria, ya que no existe una prueba diagnóstica específica o patognomónica para el diagnóstico. La exploración física es lo más importante; por lo que se debe hacer una revisión minuciosa de cada articulación. La exploración debe ser realizada de manera general y sistematizada, abarcando diversos aspectos según la articulación.

Existen diversas escalas para valorar clínicamente la función física de la articulación de la rodilla; las cuales se componen de diversas preguntas, que responden el paciente o el médico, de acuerdo con el cuestionario. Entre ellas se pueden mencionar: el índice WOMAC (*Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index*), el índice IKDC (*International Knee Documentation Committee*), el KOOS (*Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score*), el KSS (*Knee Society Score*) y el OKS (*Oxford Knee Score*).³⁴

El WOMAC se utiliza para evaluar a los pacientes con OA de cadera o de rodilla mediante 24 parámetros, divididos en 3 áreas: dolor, rigidez y funcionalidad física. El WOMAC también se puede utilizar para monitorear el curso de la enfermedad o para determinar la efectividad de medicamentos antirreumáticos.³⁵

La AOSSM (*American Orthopaedic Society for Sports Medicine*) y la ESSKA (*European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery & Arthroscopy*) se reunieron para formar el IKDC, y desarrollar un método estándar para la nomenclatura y evaluación de las lesiones de ligamentos de la rodilla. La evaluación de la IKDC combina síntomas y signos de los pacientes. El IKDC gradúa globalmente las lesiones articulares en A (normal), B (cerca de lo normal), C (anormal) o D (severamente anormal).³⁶

El cuestionario KOOS se desarrolló como un instrumento para evaluar la opinión del paciente sobre su rodilla y problemas asociados. El KOOS consiste de 5 subescalas: dolor, otros síntomas, función en la vida diaria, función en deportes y recreación y calidad de vida.³⁷

El KSS es la escala de la *American Knee Society* y se divide en dos partes, en la primera parte se evalúa la puntuación de la rodilla (*knee score*) y en la segunda parte se evalúa la función de la rodilla (*knee function*). El KSS es la escala de valoración más usada internacionalmente en cirugías de prótesis de rodilla.³⁸

El OKS es la versión para la rodilla del Oxford-12 para la valoración de artroplastias y artrosis de rodilla. Es un cuestionario corto, práctico y fácil de aplicar, basado en preguntas que responde el paciente. Una de las limitaciones del OKS, es que éste es más influenciado que el KSS por variaciones demográficas como la edad y condiciones médicas mayores coexistentes, debido a un componente funcional incrementado, mientras que el KSS separa el estado de la rodilla del estado funcional.³⁹

Por otro lado, la radiografía simple de la región afectada es el método básico para el estudio y diagnóstico de la OA. Los hallazgos radiográficos que se pueden encontrar son los siguientes: disminución asimétrica del espacio articular, formación de hueso subcondral (osteofitos), presencia de esclerosis subcondral y presencia de quistes subcondrales.

2.3. Tratamiento de la Osteoartritis

El tratamiento ideal para la OA es multidisciplinario y debe cumplir con los objetivos de lograr anestesia, disminuir la discapacidad y mejorar la funcionalidad articular así como la calidad de vida del paciente con la menor toxicidad de los medicamentos.

El manejo farmacológico inicial, comúnmente comienza con analgésicos, como el paracetamol (el paracetamol constituye el fármaco de primera línea recomendado para el manejo del dolor leve a moderado en OA),^{40,41} agentes antiinflamatorios esteroideos, y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos.⁴² Además, una gran variedad de otros agentes farmacéuticos tales como glucosamina, condroitín sulfato y ácido hialurónico, se han propuesto como soluciones no invasivas para el tratamiento del dolor,⁴³ mejorando la movilidad de la articulación, todos con tasas de éxito variables. En cuanto al uso de los medicamentos antes mencionados, existen varios factores que podrían representar una limitante para su correcta administración, como la potencial toxicidad cardiovascular y gastrointestinal, la gran variación en la respuesta individual a cada fármaco y la ausencia de datos clínicos claros, con respecto al potencial terapéutico de estas sustancias.¹¹

Otra modalidad de tratamiento recurrente son los agentes tópicos, los cuales sólo han mostrado ser útiles a corto plazo y para controlar dolor leve moderado.⁴⁴ Por otra parte, la glucosamina, el condroitín sulfato y las infiltraciones intra-articulares de ácido hialurónico tampoco han mostrado su efectividad claramente. Al final, ninguno de los tratamientos que actualmente se encuentran disponibles puede ser considerado como un procedimiento ideal para curar o aliviar la condropatía crónica severa u OA.^{45,46}

2.4. Terapias Alternas para el Tratamiento de la Osteoartritis

En el pasado, la terapia contra la OA no tomaba en cuenta las verdaderas causas ni los mecanismos patogénicos por los cuales se desarrolla esta condición, enfocándose principalmente en tratar los síntomas, en vez de interferir con la progresión del daño al cartílago.²² Desde hace algunos años este enfoque ha ido cambiando, y una variedad de técnicas enfocadas en la reparación del tejido se han desarrollado, en un intento por mejorar las capacidades auto-regenerativas del cartílago articular; estas técnicas comúnmente se prueban en defectos osteocondrales articulares para determinar su

eficacia.^{47,48} Así, diversos procedimientos quirúrgicos se han desarrollado y aplicado clínicamente en pacientes con el fin de tratar de reparar el daño del tejido articular. La microfractura es el procedimiento mejor estudiado, con el cual se ha logrado incrementar la recuperación del cartílago, estimulando la médula ósea subcondral en la vecindad de los defectos articulares.^{47,49} Sin embargo, esta propuesta se ha visto limitada por la pobre calidad del tejido formado en la reparación, el cual va desde tejido fibroso hasta la formación de un tejido más parecido al cartílago hialino. Por otro lado, el implante de condrocitos autólogos ha recibido mucha atención por su potencial como un tratamiento novedoso para la reparación del cartílago dañado, y se ha convertido en el procedimiento quirúrgico que se basa en el uso de células más ampliamente utilizado para la reparación de los defectos articulares del cartílago.^{50,51} El uso de esta técnica ha presentado algunas limitaciones debido a que su aplicación es ideal solo para la reparación de lesiones focales y no de grandes defectos articulares.

Otra área de investigación que ha tenido un gran auge en los últimos años, como alternativa en cuanto al tratamiento de los defectos articulares se refiere, es la ingeniería de tejidos. Éste es un campo interdisciplinario que combina conocimientos de las ciencias biológicas y la ingeniería con el objetivo de restaurar, mantener o aumentar la función del tejido. Dentro del contexto de la medicina regenerativa, la combinación de andamios biocompatibles, con células, representa una alternativa promisoriosa como herramienta terapéutica.⁵²

La investigación actual se ha enfocado en descubrir nuevos métodos para estimular la reparación del cartílago articular. En particular, de los conocimientos más recientes que se tienen sobre la biología de tejidos, destaca la compleja regulación que ofrecen los factores de crecimiento con respecto a la estructura normal del tejido y a la respuesta que se presenta cuando ocurre el daño tisular.¹⁸ La influencia de estos factores de crecimiento en la reparación del cartílago ha sido ampliamente investigada en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.⁵³⁻⁵⁶

2.5. Plasma Rico en Plaquetas

2.5.1. Definición

La terapia con plasma rico en plaquetas (PRP) es un método simple, de bajo costo y mínimamente invasivo. Actualmente, en la mayoría de los casos, el PRP se define únicamente por la cantidad absoluta de plaquetas y no por la de otros componentes. El rango de concentración normal de plaquetas en sangre es de 150,000 a 350,000 plaquetas/ μL ,⁵⁷ mientras que, generalmente se acepta que la concentración de plaquetas en el PRP, es de 2 a 4 veces mayor que su concentración normal en sangre.⁵⁸

La lógica detrás del uso del PRP es que las plaquetas son las primeras en actuar en el sitio de la lesión, liberando diversas moléculas bioactivas que desempeñan un papel fundamental en el proceso de cicatrización.⁵⁹

2.5.2. Plaquetas

Las plaquetas son células anucleadas, tradicionalmente caracterizadas como efectores principales del proceso de hemostasia, el cual está mediado por la liberación de proteínas durante su activación. Las plaquetas contienen distintas estructuras intracelulares, tales como glucógeno, lisosomas y gránulos (densos y alfa). En particular, los gránulos alfa almacenan y secretan diversos tipos de proteínas, las cuales se pueden subdividir de acuerdo a sus propiedades funcionales. Así, podemos encontrar proteínas de adhesión, factores de coagulación, factores fibrinolíticos, proteasas y anti-proteasas, factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, glicoproteínas de membrana y proteínas antimicrobianas, entre otras. La Tabla 1 compendia los factores contenidos en los gránulos alfa de las plaquetas y sus funciones. En la Tabla 1 las proteínas se encuentran clasificadas en grupos, aunque algunas de ellas podrían desarrollar diversas funciones.¹⁶

Tabla 1. Contenido de los gránulos alfa de las plaquetas y sus categorías funcionales.¹⁶

Categoría	Proteínas
Proteínas de adhesión	vWF ¹ + pro-péptido, fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, trombospondina 1, laminina 8
Factores de coagulación y proteínas asociadas	Factor V/Va ² , Factor XI, multimerina, gas6 ³ , proteína S ⁴ , cininógeno de alto peso molecular, antitrombina, inhibidor de la vía del factor tisular
Factores fibrinolíticos y proteínas asociadas	Plasminógeno, PAI-I ⁵ , u-PA ⁶ , osteonectina, α 2 antiplasmina, glicoproteína rica en histidina, TAFI ⁷ , α 2 macroglobulina
Proteasas y anti-proteasas	Inhibidor tisular de metaloproteasas 4, metaloproteasa 4, inhibidor plaquetario de FIX ⁸ , proteasa nexina 2, inhibidor de C1 ⁹ , α 1 antitripsina
Factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas	PDGF ¹⁰ , TGF ¹¹ - β 1 y -2, EGF ¹² , IGF-1 ¹³ , VEGF ¹⁴ (A y C), bFGF ¹⁵ , FGF-2, HGF ¹⁶ , IL-8 ¹⁷ , MIP-1 α ¹⁸ , CXCL5 ¹⁹ , MCP-3 ²⁰ , angiopoyetina 1, IL-1 β ²¹ , IGF BP-3 ²² , proteína quimiotáctica de neutrófilos
Proteínas básicas y otras	PF4 ²³ , tromboglobulina β , proteína básica de plaquetas, péptido activador de tejido conectivo III, péptido activador de neutrófilos 2, endostatinas
Proteínas antimicrobianas	Trombocidinas
Glicoproteínas de membrana	α IIb β 3 ²⁴ , α v β 3 ²⁵ , GPIb ²⁶ , PECAM-I ²⁷ , CD40L ²⁸ , factor tisular, P-selectina, receptores para agonistas primarios
Otras	Condroitin sulfato-4, albúmina, inmunoglobulinas

¹vWF, factor de Von Willebrand; ²V/Va, Factor V/Factor V activado; ³Gas-6, Proteína específica del gen de la detención de crecimiento; ⁴Proteína S, Proteína plasmática dependiente de vitamina K; ⁵Inhibidor del activador del plasminógeno-I; ⁶Activador del plasminógenourocinas; ⁷TAFI, Inhibidor de fibrinólisis activado por trombina; ⁸FIX; Factor IX; ⁹C1, Proteína del sistema del complemento tipo 1; ¹⁰PDGF, Factor de crecimiento derivado de plaquetas; ¹¹TGF, Factor de crecimiento transformante; ¹²EGF, Factor de crecimiento endotelial; ¹³IGF-1, Factor de crecimiento parecido a insulina tipo I; ¹⁴VEGF, Factor de crecimiento vascular endotelial; ¹⁵bFGF, factor de crecimiento básico de fibroblastos; ¹⁶HGF, Factor de crecimiento de hepatocitos; ¹⁷IL-8, Interleucina 8; ¹⁸MIP-1 α , Proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa; ¹⁹CXCL5, Quimiocina 5 con motivo CXC; ²⁰MCP-3, quimiocina específica de monocitos-3; ²¹IL-1 β , interleucina 1 β ; ²²IGF BP3, Proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a insulina; ²³PF4, factor plaquetario 4; ²⁴ α IIb β 3, Glicoproteína IIb/IIIa; ²⁵ α v β 3, Integrina alfa V/integrina beta 3; ²⁶GPIb, Glicoproteína Ib; ²⁷PECAM-I, Molécula plaquetaria de adhesión celular endotelial; ²⁸CD40L, Ligando del grupo de diferenciación 40.

Se ha reportado que algunas de las proteínas bioactivas que liberan las plaquetas son responsables de atraer macrófagos, células madre mesenquimales y osteoblastos, que no sólo facilitan la remoción del tejido necrótico dentro de una lesión, sino que también participan en funciones biológicas avanzadas que van desde la cicatrización de heridas, hasta el crecimiento tumoral.⁶⁰

El hecho de que las plaquetas secreten factores de crecimiento y metabolitos activos lleva a pensar que su uso puede tener una influencia positiva en situaciones clínicas que requieren una rápida cicatrización y regeneración tisular. Además, la presentación de los factores de crecimiento unidos a las plaquetas o en un andamio de fibrina puede dar como resultado una mejor actividad con respecto a las proteínas recombinantes.¹⁶

2.6. El PRP como Terapia para la Regeneración de Tejidos

Ya se ha experimentado con este tipo de terapia en diferentes campos de la medicina para probar su potencial para aumentar la regeneración de tejidos.^{57,61} El PRP se puede obtener como parte de uno de los componentes de la sangre y como ya se mencionó, es una fuente natural de múltiples factores de crecimiento autólogos, que se encuentran almacenados y son liberados por las plaquetas.⁶² Esta terapia ha ganado atención alrededor del mundo como una de las modalidades biológicas que eventualmente puede tener diversas aplicaciones clínicas, dado su fácil aislamiento, disponibilidad y la ausencia de reacciones inmunológicas o transmisión de enfermedades. Las aplicaciones clínicas están comenzando a ser exploradas, actualmente se pueden incluir el tratamiento de lesiones en tendones y ligamentos, así como en la terapia dental.^{16,63-65}

El PRP autólogo se usó por primera vez en 1987, después de una cirugía de corazón abierto, para evitar la excesiva transfusión de componentes sanguíneos homólogos.⁶⁶ El PRP se popularizó después dentro del campo de las cirugías plásticas y maxilofaciales en la década de 1990, como un medio para la liberación de factores de crecimiento.⁶⁷ La cirugía de implantes dentales con regeneración ósea guiada, es una de las situaciones en las que, una especie de gel rico en plaquetas, claramente acelera la osificación después de la extracción de una pieza dental y/o alrededor de los implantes de titanio utilizados. Por su parte, el uso de esta terapia en ortopedia

comienza temprano en la década del 2000 con el uso del PRP en injertos de hueso, para incrementar la fusión espinal y la consolidación de las fracturas. Aunque el debate continúa con respecto al potencial beneficio del PRP para la recuperación del hueso,⁶⁸ un creciente número de evidencias a nivel de laboratorio apoya el uso de las infiltraciones de PRP para el tratamiento de lesiones musculares y de tendones.⁶⁹⁻⁷³

2.7. El PRP en la Regeneración del Cartílago Articular

2.7.1. Características generales del cartílago articular

El cartílago articular es el tejido conectivo altamente especializado de las articulaciones móviles, cuya principal función es proveer una superficie articular con una baja fricción y un eficiente soporte contra la carga mecánica. El cartílago es un tejido avascular y aneural, desprovisto de drenaje linfático, que posee una capacidad regenerativa intrínseca muy baja,⁷⁴ por lo que las lesiones producidas en el cartílago son difíciles de tratar y en la actualidad continúan siendo un reto para los cirujanos ortopedistas.

El cartílago articular está integrado por una población celular relativamente baja (condrocitos, <5%), un 60-85% de fluido intersticial y una MEC sólida, compuesta de alrededor de 15-22% de colágeno tipo II y de 4-7% de proteoglicanos y otras proteínas.^{75,76} El cartílago articular es un tejido que se conforma de 3 capas, las cuales varían en el diámetro y orientación de las fibras de colágeno, y en forma y densidad de los condrocitos, de acuerdo con la profundidad del cartílago en el entorno mecánico. La capa superficial está en contacto con las superficies articulares, las fibras de colágeno están dispuestas de forma paralela con respecto a la superficie, el flujo de líquido es alto y las tensiones de compresión pueden alcanzar hasta un 50% más en comparación con las zonas más profundas.^{76,77} Los condrocitos en esta capa tienen una forma aplanada con una ubicación paralela a la superficie y se encuentran sometidos al flujo del fluido y la consolidación de la matriz.⁷⁷ Después, los condrocitos de la zona media experimentan poca tensión y poco flujo de fluidos y principalmente están bajo presión hidrostática, son de forma redondeada y producen grandes cantidades de glicosaminoglicanos y colágeno tipo II en una orientación aleatoria.⁷⁷ Por último, en la zona profunda, las fibras forman conjuntos más gruesos que son perpendiculares a la superficie articular y anclan el cartílago al hueso en la línea de calcificación

(*tidemark*).⁷⁶ La densidad celular en el cartílago maduro disminuye de alrededor de 60 células/cm³ en la capa superficial a cerca de 10 células/cm³ en la zona profunda, un resultado de la alta tasa de síntesis de MEC.⁷⁸

Cambios biológicos, incluidos cambios biomecánicos y metabólicos, así como traumatismos, pueden llevar a la pérdida de la homeostasis del tejido, dando como resultado una disminución acelerada de la superficie articular, lo que puede dar lugar a la presencia de artrosis en una etapa final.⁴³

2.7.2. Investigaciones sobre el uso del PRP en la regeneración del cartílago articular

Se han realizado algunos estudios *in vitro*, en los que se intenta mostrar el potencial uso del PRP para promover la regeneración del cartílago, en donde se ha visto que se incrementa la proliferación celular; así como la expresión de algunos marcadores condrogénicos (RUNX-2, SOX9 y agregano) en células madre mesenquimales cultivadas en presencia de PRP.⁷⁹ Además, se ha observado que el PRP estimula la migración y diferenciación de células progenitoras subcondrales humanas, así como su capacidad para inducir la producción de proteoglicanos y colágeno tipo II en la MEC formada.⁸⁰ El PRP también se ha probado en defectos osteocondrales en modelos animales, con la adición de ácido poliláctico glicólico (PLGA)⁸¹ o en combinación con condrocitos en un andamio tridimensional,⁸² dando como resultado una mejoría en la regeneración de cartílago articular con respecto a sus controles. Aunado a esto, se ha propuesto que el PRP podría ser utilizado como un acarreador autólogo para inyectar y fijar condrocitos en el sitio del defecto en el cartílago articular.⁸³

Algunos otros trabajos, también muestran el potencial uso del PRP para promover la regeneración del cartílago.^{79,81,83} Esto debido a que en el PRP se pueden encontrar concentraciones terapéuticas de varios factores de crecimiento importantes, que juegan un papel fundamental en procesos de condrogénesis, tales como el factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1 (IGF-1), hormona de crecimiento humano (hGH), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), proteína morfogenética de hueso 2 (BMP-2), proteína morfogenética de hueso 4 (BMP-4) y proteína morfogenética de hueso 7 (BMP-7).^{84,85}

2.7.3. Evaluación del PRP en modelos *in vitro* de OA

Los modelos de cultivo *in vitro* para la OA se han usado comúnmente para tratar de comprender mejor los mecanismos patológicos de la enfermedad, así como para evaluar biomarcadores y estrategias terapéuticas. Los principales modelos usados para el estudio *in vitro* de la OA son los cultivos de explantes, cultivos en monocapa (incluyendo los co-cultivos) y los cultivos en 3D. Los modelos basados en el cultivo de explantes presentan la principal ventaja de que pueden ser usados para examinar la respuesta de las células en su MEC natural, sin que el fenotipo celular se vea alterado.⁸⁶ Además, ya que se sabe que los explantes de cartílago en cultivo pueden permanecer viables por largos periodos,⁸⁷ se ha podido evaluar el efecto de alternativas terapéuticas y otras modalidades de co-cultivos.^{88,89}

Por estas razones, diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de explorar los efectos de la terapia del PRP en OA desde diversos puntos de vista. Pereira et al. 2013⁹⁰ reportaron que el PRP es capaz de mantener el fenotipo condrocítico y que ayuda a resolver el proceso pro-inflamatorio en condrocitos humanos cultivados en monocapa. Matuska *et al.* 2013⁹¹ mencionan que un derivado del PRP (*autologous protein solution*, APS) tiene el potencial de prevenir la pérdida del cartílago asociada a los efectos pro-inflamatorios de IL-1 α o TNF- α en explantes de cartílago bovino. También se ha visto que el PRP promueve una mejor restauración en el cartílago y el hueso subcondral en comparación con el ácido hialurónico en defectos creados en rodillas de conejos.⁹² De manera más reciente, se concluyó que el PRP estimula la producción de ácido hialurónico y disminuye el catabolismo del cartílago²¹ y que además es capaz de modificar favorablemente la expresión de marcadores involucrados en la degradación del cartílago asociada a inflamación⁹³ en un modelo de co-cultivo de cartílago y membrana sinovial humanos bajo un ambiente pro-inflamatorio inducido por la IL-1 β .

A pesar de sus importantes contribuciones, algunas de las desventajas que presentan estas investigaciones son el uso de tejidos y modelos animales, la evaluación de los efectos del PRP a tiempos cortos (desde algunas horas hasta 3 o 4 días), y que los cultivos se retan en ambientes pro-inflamatorios agudos. Debido a esto, sería importante analizar el efecto del PRP en explantes de cartílago con OA, en cultivos

prolongados bajo un ambiente pro-inflamatorio crónico, tratando de simular el ambiente articular de un paciente que es tratado con infiltraciones intra-articulares de PRP.

2.8. Estudios Clínicos sobre el uso de PRP como Tratamiento para la Osteoartrosis

La mayoría de los estudios clínicos, actualmente disponibles en la literatura médica, apoyan el uso del PRP para el tratamiento de las lesiones de cartílago en rodilla u OA, aplicándolo en forma de infiltraciones intra-articulares. En todos estos estudios, los investigadores se han valido del uso de escalas clínicas o índices (WOMAC, IKDC, KOOS, NRS, EVA entre otras) para valorar y medir el efecto del tratamiento.

En la Tabla 2 se muestra un resumen de las principales investigaciones realizadas hasta ahora.^{18,22,94-109} Se trata de estudios muy heterogéneos, en cuanto al tipo de afección de los pacientes, quienes fueron tratados de acuerdo a su grado de OA. La mayoría de ellos presentaba grados de OA de I-III o de I-IV); el intervalo de aplicación de las infiltraciones fue desde 1 semana hasta 1 mes; el número de aplicación de las infiltraciones fue de 1 a 4 y el predominio de periodos de evaluación fue de corto a mediano plazo. A pesar de la heterogeneidad de las condiciones de dichos estudios, se puede apreciar que en la mayoría de estos ensayos, el PRP ofrece mejores resultados en comparación con las otras estrategias de tratamiento empleadas; principalmente en comparación con el ácido hialurónico.

En ocho de los estudios realizados en pacientes con OA infiltrados con PRP, se presentan los resultados acerca de series de casos o ensayos comparativos no aleatorizados,^{18,22,94-98,103} lo que presenta una de las principales desventajas al momento de evaluar el PRP como terapia. Sin embargo, en todos los estudios mencionados se pudo observar que esta aproximación terapéutica es segura y que mejora la sintomatología de los pacientes tratados. El resto de las publicaciones corresponden a ensayos más recientes en donde se compara el tratamiento con PRP con respecto al tratamiento con ácido hialurónico en pacientes tratados de manera aleatoria. El primero tiene mejores resultados que el segundo en la disminución del dolor, mejora de la función articular y mejora de la calidad de vida. Solo en tres de los estudios no hubo diferencias significativas entre grupos.^{105,106,109} La evidencia clínica de

este tipo de estudios es más relevante y se confirma la seguridad de la terapia propuesta. El número de pacientes tratados por grupo varía ampliamente de 9 a 94.

Tabla 2. Ensayos clínicos sobre la aplicación de la terapia con PRP en OA de rodilla.

Referencia	Tipo de estudio	Evaluación clínica (tiempo)	Grado de OA ¹ (n)	Resultado
Sánchez M, <i>et al.</i> 2008 ⁹⁴	Retrospectivo, observacional <ul style="list-style-type: none"> PRP² (3 aplicaciones) AH³ (3 aplicaciones) 	WOMAC ⁴ (5 semanas)	I, II, III y IV (n = 30/grupo)	Reducción en el porcentaje de WOMAC atribuido al tratamiento con PRP.
Kon E, <i>et al.</i> 2010 ⁹⁵	Serie de casos <ul style="list-style-type: none"> PRP (3 aplicaciones) 	IKDC ⁵ , EVA ⁶ (12 meses)	I, II, III y IV (n = 91)	Mejora significativa de la evaluación clínica. Disminuyó a los 12 meses.
Filardo G, <i>et al.</i> 2011 ¹⁸	Serie de casos <ul style="list-style-type: none"> PRP (3 aplicaciones) 	IKDC, EVA (24 meses)	I, II, III y IV (n = 90)	Disminución en mejoras obtenidas al año de seguimiento. Resultados mejores que lo obtenido antes del tratamiento.
Kon E, <i>et al.</i> 2011 ⁹⁶	Prospectivo, comparativo <ul style="list-style-type: none"> PRP (3 aplicaciones) LW⁷ AH (3 aplicaciones) HW⁸ AH (3 aplicaciones) 	IKDC, EVA (6 meses)	I, II, III, y IV (n = 50/grupo)	Mayor eficacia y durabilidad en disminución del dolor y recuperación de función articular con PRP.
Wang-Saegusa A, <i>et al.</i> 2011 ²²	Prospectivo, no aleatorizado <ul style="list-style-type: none"> PRP (3 aplicaciones) 	WOMAC, EVA, SF-36 ⁹ (6 meses)	I, II, III y IV (n = 261)	Mejora en función, calidad de vida y disminución del dolor.
Napolitano M, <i>et al.</i> 2012 ⁹⁷	Serie de casos <ul style="list-style-type: none"> PRP (3 aplicaciones) 	WOMAC, NRS ¹⁰ (6 meses)	I, II y III (n = 27)	Mejora de los parámetros evaluados. Disminución del dolor después de primera aplicación.
Filardo G, <i>et al.</i> 2012 ⁹⁸	Prospectivo, comparativo <ul style="list-style-type: none"> PRP a (3 aplicaciones) PRP b (3 aplicaciones) 	IKDC, EVA (12 meses)	I, II, III y IV (n = 72/grupo)	Mejora significativa en evaluaciones. Resultado similar en ambos grupos.
Spaková T, <i>et al.</i> 2012 ⁹⁹	Prospectivo, aleatorizado <ul style="list-style-type: none"> PRP (3 aplicaciones) AH (3 aplicaciones) 	WOMAC, NRS (6 meses)	I, II, III y IV (n = 60/grupo)	Mejores resultados en evaluaciones clínicas para el grupo tratado con PRP.
Cerza F, <i>et al.</i> 2012 ¹⁰⁰	Aleatorizado, controlado <ul style="list-style-type: none"> PRP (4 aplicaciones) AH (4 aplicaciones) 	WOMAC (6 meses)	I, II y III (n = 60/grupo)	Mejora significativa en la escala WOMAC al final del estudio, en pacientes tratados con PRP (p < 0.001).
Sánchez M, <i>et al.</i> 2012 ¹⁰¹	Aleatorizado, controlado <ul style="list-style-type: none"> PRP (3 aplicaciones) AH (3 aplicaciones) 	WOMAC OMERACT-OARSI ¹¹ (6 meses)	I, II y III (n = 89; n = 87)	Mayor porcentaje de respondedores en el grupo de PRP (14.1% más que AH; p=0.044).
Vaquerizo V, <i>et al.</i> 2013 ¹⁰²	Aleatorizado, controlado <ul style="list-style-type: none"> PRP (3 aplicaciones) AH (1 aplicación) 	WOMAC OMERACT-OARSI Índice Lequesne (12 meses)	II, III y IV (n = 48/grupo)	El tratamiento con PRP fue significativamente más eficiente y el rango de respondedores fue significativamente mayor que con AH.

Jang SJ, <i>et al.</i> 2013 ¹⁰³	Serie de casos <ul style="list-style-type: none"> • PRP (1 aplicación) 	IKDC, EVA (12 meses)	I, II y III (n = 65)	Mejora clínica y menor dolor a los 6 meses, tiende a disminuir al año. Menor efecto a edad avanzada.
Patel S, <i>et al.</i> 2013 ¹¹⁰	Aleatorizado, doble ciego <ul style="list-style-type: none"> • PRP (1 aplicación) • PRP (2 aplicaciones) • Placebo (1 aplicación) 	EVA, WOMAC (6 meses)	I, II y III (n = 27; n = 25; n = 26)	Mejora clínica en ambos grupos de PRP con respecto a Placebo. Sin diferencias entre grupos de PRP. Mejores resultados en pacientes con OA leve.
Raeissadat SA, <i>et al.</i> 2015 ¹⁰⁴	Aleatorizado, controlado <ul style="list-style-type: none"> • PRP (2 aplicaciones) • HA (3 aplicaciones) 	WOMAC, SF-36 (12 meses)	I, II, III y IV (n = 87; n = 73)	Mejoría en dolor y funcionalidad en ambos grupos. El PRP fue mejor. Los pacientes con grado II mostraron mayor mejoría.
Filardo G, <i>et al.</i> 2015 ¹⁰⁵	Aleatorizado, controlado <ul style="list-style-type: none"> • PRP (3 aplicaciones) • HA (3 aplicaciones) 	IKDC, EQ-VAS ¹² , KOOS ¹³ , Tenger score, (12 meses)	I, II y III (n = 94; n = 89)	Ambos tratamientos incrementaron función de rodilla y disminuyeron síntomas. Sin diferencia entre grupos.
Forogh B, <i>et al.</i> 2015 ¹⁰⁸	Aleatorizado, doble ciego <ul style="list-style-type: none"> • PRP (1 aplicación) • Corticosteroide 	EVA, KOOS, ROM ¹⁴ (6 meses)	II y III (n = 21; n = 20)	PRP disminuye dolor por más tiempo, alivia síntomas e incrementa calidad de vida a corto plazo comparado con Corticosteroide.
Görmeli G, <i>et al.</i> 2015 ¹⁰⁶	Aleatorizado, doble ciego <ul style="list-style-type: none"> • PRP (1 aplicación) • PRP (3 aplicaciones) • AH (1 aplicación) • Placebo (1 aplicación) 	EQ-VAS, IKDC (6 meses)	I, II, III y IV (n = 44; n = 39; n = 39; n = 40)	Evaluaciones de aplicación triple mejor que en otros grupos. Sin diferencia entre aplicación única de PRP y AH. Mejores resultados clínicos con triple PRP en OA temprana.
Kavadar G, <i>et al.</i> 2015 ¹⁰⁷	Aleatorizado <ul style="list-style-type: none"> • PRP (1 aplicación) • PRP (2 aplicaciones) • PRP (3 aplicaciones) 	EVA, WOMAC, TUG ¹⁵ (6 meses)	III (n = 33; n = 32; n = 33)	Mejoría significativa en escalas evaluadas en los 3 grupos. La aplicación triple fue la más efectiva. Sin diferencia en el valor de WOMAC.
Paterson KL, <i>et al.</i> 2016 ¹⁰⁹	Aleatorizado, doble ciego <ul style="list-style-type: none"> • PRP (foto-activado) • AH 	EVA, KOOS, KQoL ¹⁶ (12 semanas)	II y III (n = 10; n = 9)	Mejora en función de rodilla, dolor y calidad de vida con PRP. No hubo diferencia con el grupo AH.

¹OA, Osteoartrosis; ²PRP, Plasma rico en plaquetas; ³AH, Ácido Hialurónico; ⁴WOMAC, *Western Ontario and McMaster Universities Index of Osteoarthritis*; ⁵IKDC, *International Knee Documentation Comitee*; ⁶EVA, Escala Visual Análoga; ⁷LW, *Low Weight*; ⁸HW, *High Weight*; ⁹SF-36, *SF-36 Health Survey*; ¹⁰NRS, *Numeric Rating Scale*; ¹¹OMERACT-OARSI, *Rheumatology Committee and Osteoarthritis Research Society International Standing Committee for Clinical Trials Response Criteria Initiative*; ¹²EQ-VAS, *EuroQol Visual Analog Scale*; ¹³KOOS, *Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score*; ¹⁴ROM, *passive Ranges of Motions*; ¹⁵TUG, *Timed-Up and Go test*; ¹⁶KQoL, *Quality of Life scale*.

3. JUSTIFICACIÓN

La motivación para realizar este estudio surgió de la gran inquietud que existe en cuanto a la aplicación del PRP en patologías asociadas a la degeneración del cartílago articular y en la cantidad de resultados controversiales que se encuentran en la bibliografía científica con respecto a este tema.

Además, la limitada capacidad de regeneración del cartílago articular ya conocida incrementa la importancia de encontrar nuevos tratamientos contra las alteraciones degenerativas articulares, y de constatar su seguridad y eficacia.

Terapias emergentes, como la del PRP, deben ser objeto de estudio e investigación y en caso de demostrarse su seguridad y sus efectos benéficos, con la suficiente evidencia clínica y científica que lo apoye, considerar su aplicación como una alternativa para el sistema terapéutico actual.

4. HIPÓTESIS

Evaluación in vivo

- 1) El tratamiento con infiltraciones de PRP en rodillas de pacientes con OA leve, es más efectivo que el tratamiento convencional con paracetamol.

Evaluación in vitro

- 2) La adición de PRP al cultivo de explantes de cartílago con OA leve, modifica la expresión de genes involucrados en la síntesis y degradación de la MEC, así como en su histología.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el tratamiento con PRP *in vivo* en pacientes con OA de rodilla grado I o II, e *in vitro* en explantes de cartílago con OA grado I o II.

Objetivos Específicos

- Comparar la efectividad clínica del tratamiento con PRP en pacientes con OA leve de rodilla y del tratamiento convencional.
- Analizar la concentración de plaquetas, del antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra) y del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) en las preparaciones de PRP.
- Evaluar los cambios en la expresión de genes relacionados con la síntesis y degradación de MEC en cultivos de explantes de cartílago con OA leve tratados con PRP.
- Evaluar los cambios histológicos en cultivos de explantes de cartílago con OA leve tratados con PRP.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Estudio Clínico (Evaluación *in vivo* del Tratamiento con PRP)

6.1.1. Pacientes y diseño del estudio

Este fue un estudio clínico, prospectivo, controlado y aleatorizado, realizado con pacientes que acudieron a la consulta de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la UANL. Se seleccionaron pacientes con diagnóstico de OA grado I y II, de acuerdo con la clasificación de Kellgren-Lawrence¹¹¹ y que cumplieran con los criterios de inclusión del protocolo. Se estudió la presentación y evolución clínica de los pacientes incluidos en el presente estudio. En pacientes con OA bilateral, solo la rodilla que reflejaba mayor sintomatología fue tomada en consideración. Se le explicó a cada paciente en qué consistía el protocolo de investigación, sus ventajas, riesgos y lo que se esperaba encontrar mediante una carta de consentimiento informado; la cual firmó cada paciente, manifestando que estaba de acuerdo en participar en el protocolo. Dicha carta de consentimiento fue evaluada y aprobada por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo el número de registro BI13-001. Adicionalmente, el ensayo clínico fue registrado en la plataforma pública de registro de ensayos clínicos "ClinicalTrials.gov" bajo el número de identificación NCT01782885.

6.1.1.1. Criterios de inclusión

- Mayores de 18 años.
- Pacientes que no estuvieran bajo tratamiento farmacológico con AINES (anti-inflamatorios no esteroideos) durante al menos una semana previa a entrar al protocolo.
- Dolor, inflamación o cualquier otro síntoma relacionado con OA de rodilla por al menos 3 meses.
- Signos radiológicos de OA de rodilla grado I o II de acuerdo a la clasificación de Kellgren-Lawrence.
- Género indistinto.

6.1.1.2. Criterios de exclusión

- Signos radiológicos de OA de rodilla grado III o IV de acuerdo a la clasificación de Kellgren-Lawrence.
- Pacientes con cualquier tipo de intervención quirúrgica en la rodilla.
- Pacientes embarazadas.
- Pacientes con enfermedades reumáticas asociadas.
- Enfermedades hepáticas, diabetes, enfermedades hematológicas (coagulopatías), enfermedades cardiovasculares severas, infecciones, inmunodepresión.
- Pacientes en terapia con anticoagulantes.
- Pacientes con valores de hemoglobina y de plaquetas menores de 11 g/dL y 150,000/ μ L, respectivamente.

6.1.2. Preparación del PRP

El procedimiento consistió en la obtención de 27 mL de sangre venosa distribuida en 6 tubos vacutainer con citrato de sodio 0.109 M (BD Vacutainer®, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) como anticoagulante para cada infiltración. Se obtuvo una muestra extra en tubo con EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer®) para cuantificar el número basal de plaquetas. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 6 min a 1800 rpm (600 \times g) para separar la capa de eritrocitos (Centrífuga Heraeus Megafuge 1.0R de Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA). La capa superior de plasma se recolectó en un tubo estéril de polipropileno de 15 mL, tratando de no remover la capa de leucocitos. El plasma obtenido de todos los tubos se centrifugó de nuevo durante 4 min a 3400 rpm (1900 \times g), para obtener un plasma de dos fases: la fase superior, que consistió en plasma pobre en plaquetas (PPP), y la fase inferior, que consistió en el PRP. El PPP se descartó para obtener un volumen final de 3 mL. Este volumen, consistente de PRP (Figura 1), se mezcló cuidadosamente para resuspender las plaquetas y se transfirió después a un tubo estéril (BD Vacutainer®). Una alícuota del PRP final se utilizó para cuantificar el número de plaquetas en el laboratorio. La manipulación de las muestras se realizó dentro de una cabina de bioseguridad con flujo laminar de aire filtrado de alta eficiencia (Logic A2, Labconco®, Fort Scott, KS, USA).

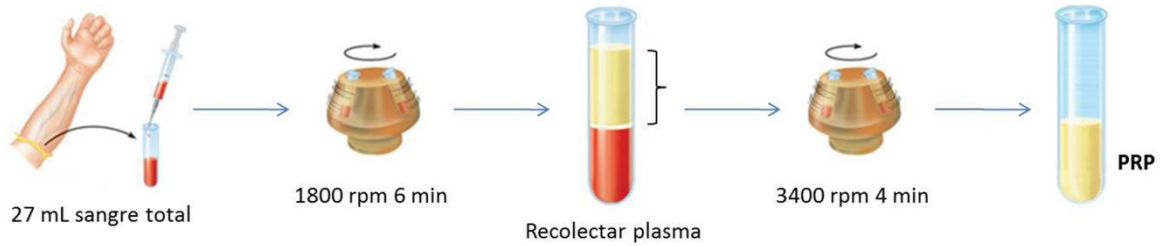


Figura 1. Diagrama general para la obtención del plasma rico en plaquetas (PRP) infiltrado en los pacientes. 1800 rpm (600 \times g); 3400 rpm (1900 \times g).

6.1.3. Procedimiento de los tratamientos

Los pacientes se dividieron en dos grupos de forma aleatorizada: cada paciente eligió uno de dos sobres cerrados. Un sobre indicaba que el paciente recibiría el tratamiento con PRP y el otro sobre indicaba que el paciente recibiría el tratamiento convencional. Cada grupo estuvo conformado por al menos 30 pacientes de acuerdo al cálculo del tamaño de muestra. Un grupo fue tratado con paracetamol (Tempra®, Bristol-Myers Squibb, CDMX, México) en dosis de 500 mg cada 8 h por 6 semanas (tratamiento convencional). No se permitió el uso de algún otro fármaco durante el tratamiento, por parte de los pacientes o de sus médicos. El otro grupo fue tratado con infiltraciones intra-articulares de PRP autólogo. Se aplicaron un total de tres infiltraciones, una cada dos semanas para completar 6 semanas de tratamiento. La aplicación de las infiltraciones se llevó a cabo después de desinfectar la piel en el área de la rodilla. Se aplicó anestesia local con clorhidrato de lidocaína al 2% (Pisacaína, PISA Farmacéutica, Guadalajara, México) y posteriormente se inyectaron 3.0 mL de PRP, en condiciones asépticas utilizando una jeringa estéril y desechable con aguja 22 G (calibre, G por sus siglas en inglés, *gauge*). Previo a la inyección, el PRP se activó con gluconato de calcio al 10% (PISA Farmacéutica), en una relación de 0.15 mL de gluconato de calcio al 10% por cada mL de PRP. La aguja se insertó en la rodilla utilizando un abordaje superolateral en un ángulo de aproximadamente 45°.

6.1.4. Seguimiento y manejo post-tratamiento

Los pacientes del grupo tratado con PRP recibieron la indicación de flexionar y extender sus rodillas inmediatamente después de la infiltración para que el PRP se

podiera distribuir adecuadamente dentro del espacio articular. Después de 5-10 min de observación, los pacientes se enviaron a su casa con indicaciones por escrito que incluían tener reposo relativo durante las próximas 48 h después de la infiltración; la aplicación de frío durante 15 min 3 veces al día y la ingesta de paracetamol (500 mg), todo lo anterior solo en caso de dolor e inflamación por las siguientes 48 h. En ambos grupos se prohibió el consumo de AINES o esteroides. Todos los pacientes fueron evaluados antes de comenzar con su respectivo tratamiento y a las 6, 12 y 24 semanas después de iniciado el tratamiento. Para valorar el resultado clínico se utilizaron 3 escalas diferentes: la escala visual análoga (EVA) que mide el nivel de dolor,¹¹² el índice de artrosis de las Universidades de McMaster y Western Ontario (WOMAC) que evalúa dolor, rigidez articular y capacidad funcional,³⁵ y la versión corta en español (México) de la encuesta de salud SF-12 para analizar la calidad de vida.¹¹³

6.1.5. Cuantificación de IL-1ra y TGF- β con ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se obtuvo una alícuota de cada PRP activado y se centrifugó a 4300 rpm (3500 \times g) durante 5 min una vez que el coágulo se había formado. Se recuperó el suero (o PRP activado [PRPa]) y se almacenó a -80°C hasta su análisis. El IL-1ra y el TGF- β se cuantificaron utilizando estuches comerciales de ELISA (Quantikine®, DRA00B and DB100B, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Se analizaron las 3 muestras de PRPa de cada paciente. A continuación se describe, de manera general, el procedimiento para la realización del ELISA (Quantikine®); lo cual se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante:

Se preparó una serie de diluciones del estándar correspondiente (IL-1ra o TGF- β) para formar la curva de calibración que constó de 7 puntos más un blanco. Las diluciones se prepararon a partir de una solución stock. Se tomaron 200 μ L de la solución stock y se depositaron en un tubo de 1.5 mL de capacidad, al cual, previamente se le añadieron 200 μ L del diluyente calibrador. La dilución se mezcló muy bien y se tomaron 200 μ L para realizar la siguiente dilución, esto se repitió hasta tener 6 diluciones. El stock sirvió como el punto de mayor concentración de la curva y el diluyente calibrador como el punto menos concentrado o cero. Se añadieron 50 μ L del diluyente para el ensayo en cada uno de los pozos a utilizar, se agregaron 50 μ L del estándar o muestra según

correspondiera, mezclando suavemente cada uno de los pocillos para asegurar una completa homogenización. La totalidad de los pozos utilizados se cubrió con la tira adhesiva (incluida en el estuche) para dejar incubando 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se aspiró el contenido de cada pozo y todos los pozos se lavaron 3 veces con el buffer de lavado (400 μ L). Se añadieron 100 μ L del conjugado para reconocer el antígeno en cada pozo. Se cubrió la microplaca con la cinta adhesiva del estuche y se incubó nuevamente por 2 h a temperatura ambiente. Se repitieron los 3 lavados anteriormente mencionados y después se adicionaron 100 μ L de la solución de sustrato en cada pozo. Se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min y se añadieron 100 μ L de la solución stop en cada pozo, mezclando cuidadosamente con una micropipeta para asegurar que los reactivos se incorporaran correctamente a la mezcla de ensayo. Se determinó la densidad óptica de cada pozo en el lector de placas multi-modal Cytation3 (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a 450 nm (se aplicó una corrección de longitud de onda a 540 o 570 nm, al restar el valor de las lecturas a 540 o 570 nm de las lecturas obtenidas a 450 nm. Esto se hizo para corregir las imperfecciones ópticas de la placa que puedan interferir en las lecturas, ya que las lecturas realizadas directamente a 450 nm, sin corrección, pueden ser más elevadas y menos exactas).

6.2. Evaluación *in vitro* del Tratamiento con PRP

6.2.1. Obtención y cultivo de explantes de cartílago

Los explantes de cartílago con OA fueron obtenidos a partir del material biológico de desecho que se obtuvo a partir de cirugías de artroplastia total de rodilla efectuadas en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" con la colaboración del Dr. med. José Félix Vílchez Cavazos y del Dr. C. Jorge Lara Arias del Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología. La obtención del tejido se realizó con el consentimiento informado que cada uno de los donadores firmó; dicho consentimiento fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo el número de registro BI13-006.

Se recuperó el tejido articular proveniente de los cóndilos femorales y se realizaron cortes de 6-8 mm de diámetro con la ayuda del Sistema de Transferencia para Autoinjerto Osteocondral (*Osteochondral Autograft Transfer System*, OATS®, Arthrex Inc., Santa Barbara, CA, USA) en las zonas del tejido identificadas con lesiones de grado I y II, de acuerdo a la clasificación de Outerbridge,¹¹⁴ que determina el grado de lesión del cartílago articular. Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de Ingeniería Tisular del Banco de Hueso y Tejidos. Los explantes obtenidos se lavaron sucesivamente, sumergiéndolos tres veces con solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS, *phosphate buffered saline*) 1X, una vez en etanol 70%, una vez en PBS 1X estéril el cual se adicionó con 50 µg/mL de gentamicina. Todas las inmersiones se realizaron durante 30 seg. Se distribuyeron los explantes en frascos *spinner* de 25 mL de capacidad (Wheaton Celstir, Wheaton Industries Inc., Milville, NJ, USA) bajo distintas condiciones de cultivo: 1 frasco con 15 mL de medio de cultivo basal (DMEM/F12 [GIBCO®, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA] adicionado con 50 µg/mL de gentamicina [GIBCO®] y 0.25 µg/mL de Fungizone® [GIBCO®]) suplementado con 10% de SBF (suero bovino fetal, Corning, Mediatech Inc., Manassas, VA, USA), otro frasco con 15 mL de medio de cultivo basal adicionado con 20 pg/mL de la proteína recombinante Interleucina-1β (IL-1β) (R&D Systems Inc.), otro frasco con 15 mL de medio de cultivo basal sin SBF adicionado con 10% de PRP y un último frasco con 15 mL de medio de cultivo basal sin SBF adicionado con 10% de PRP y con 20 pg/mL de la proteína recombinante IL-1β. Todas las preparaciones arriba descritas se incubaron en agitación constante a 37°C, con atmósfera de 5% de CO₂ por 28 días. Así, se generaron 4 grupos de cultivo: control (medio basal), IL-1β (medio basal + IL-1β), PRP (medio suplementado con PRP) y PRP + IL-1β (medio suplementado con PRP + IL-1β). De cada grupo se obtuvieron muestras a los 0, 14 y 28 días de cultivo para realizar extracción de ARN total y para su posterior inclusión en bloques de parafina.

6.2.2. Preparación del PRP

El procedimiento utilizado para la obtención del PRP fue básicamente el mismo descrito con anterioridad en la sección 6.1.2. de la página 21. Las únicas diferencias en el método consistieron en la obtención de una muestra mayor de sangre venosa (54 mL) con el fin de obtener un mayor volumen final de PRP (6 mL) para suplementar los

cultivos. El PRP obtenido se activó con gluconato de calcio al 10%, se permitió la formación del coágulo y la liberación del contenido de los gránulos α de la plaquetas y posteriormente se centrifugó para obtener el sobrenadante o PRP activado. El PRP activado se almacenó a -80°C hasta su uso. El PRP se obtuvo de los mismos pacientes de los que se extrajeron los explantes de cartílago, de tal forma que cada explante fuera cultivado con su correspondiente PRP autólogo.

6.2.3. Extracción de ARN total

Las muestras, a partir de las cuales se llevó a cabo el proceso de extracción estuvieron conformadas por 3 explantes cada una. El procedimiento utilizado para la extracción de ARN total de explantes de cartílago se modificó a partir de lo publicado por Ali y Alman en 2012.¹¹⁵ A continuación se explica el procedimiento realizado:

Los explantes se maceraron lo más posible en placas Petri de plástico estériles con ayuda de un bisturí sobre 500 μL de TRIzol® (Ambion Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Después se añadió al macerado 1.0 mL más de TRIzol® y se recuperó todo el material en un tubo estéril de 2.0 mL. El tubo se incubó 20 min en hielo y posteriormente se centrifugó por 11 min a 11000 rpm (9600 $\times g$) a 4°C . El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo de 2.0 mL y se añadieron 300 μL de cloroformo, se agitó manualmente durante 30 seg y se incubó en hielo por 2 min. Después se centrifugó durante 12 min a 11000 rpm (9600 $\times g$) a 4°C . La fase acuosa obtenida (capa superior) se recuperó en un tubo estéril de 2.0 mL y se añadió un volumen igual de TRIzol®, se mezcló por inversión varias veces y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se agregaron 200 μL de cloroformo, se agitó manualmente durante 30 seg y se incubó en hielo por 2 min. Luego se centrifugó durante 12 min a 11000 rpm (9600 $\times g$) a 4°C . La fase acuosa obtenida (capa superior) se recuperó en un tubo estéril de 2.0 mL y se añadió un volumen igual de isopropanol frío, se mezcló por inversión varias veces y se incubó en hielo durante 5 min. A continuación se centrifugó durante 20 min a 14000 rpm (15500 $\times g$) a 4°C . Se retiró el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol al 70% en agua DEPC (Dietilpirocarbonato) frío y se agitó vigorosamente. Después se centrifugó durante 5 min a 8000 rpm (5000 $\times g$) a 4°C . Se retiró el sobrenadante tratando de remover cualquier residuo líquido con la ayuda de una micropipeta. Se dejó secar la pastilla de ARN a temperatura ambiente

con la tapa del tubo abierta. Para disolver el ARN se añadieron 20-25 μL de agua DEPC estéril o agua libre de nucleasas y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min antes de cuantificar el ARN y almacenarlo a -80°C .

La calidad del ARN obtenido se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y por cuantificación espectrofotométrica en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA).

6.2.4. Análisis de expresión génica por PCR en tiempo real (qPCR)

A partir de cada muestra de ARN total obtenida, se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) por medio de una reacción de retrotranscripción empleando la enzima M-MLV (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las reacciones se montaron en el termociclador Geneamp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). Las condiciones empleadas para la síntesis de ADNc fueron $25^{\circ}\text{C}/10$ min, $37^{\circ}\text{C}/60$ min, $94^{\circ}\text{C}/5$ min y $4^{\circ}\text{C}/10$ min. A partir del ADNc sintetizado se evaluó la expresión de distintos genes relacionados con el fenotipo normal y osteoartrósico del condrocito a través del uso de sondas TaqMan (Applied Biosystems) específicas para cada gen. Las corridas de los ensayos de expresión se realizaron en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La lista de los genes evaluados se muestra a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3. Nombre y símbolo de cada uno de los genes analizados por qPCR y el código correspondiente a cada una de las sondas TaqMan empleadas.

Nombre del gen	Símbolo	Código ¹
Colágeno tipo II alfa 1	COL2A1	Hs00264051_m1
Colágeno tipo I alfa2	COL1A2	Hs00164099_m1
Colágeno tipo X alfa 1	COL10A1	Hs0016657_m1
Agrecano	ACAN	Hs00153936_m1
Región determinante del sexo en el cromosoma Y Box-9	SOX9	Hs01001343_g1
Metaloproteasa de matriz 13	MMP-13	Hs00233992_m1
Inhibidor tisular de metaloproteasas 1	TIMP-1	Hs00171558_m1
Metaloproteasa con trombospondina 1 motivo 5	ADAMTS-5	Hs00199841_m1
Interleucina-1 beta	IL-1 β	Hs01555410_m1
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	Hs02758991_g1
Beta-2-microglobulina	B2M	Hs99999907_m1

¹Applied Biosystems

Previo al análisis de expresión se verificó la eficiencia de amplificación de cada una de las sondas. Se realizó una curva de amplificación que constó de 5 puntos de diferentes concentraciones a partir de diluciones seriadas de ADNc de cartílago. Se consideró al ADNc sin diluir como el punto más concentrado de la curva, las diluciones siguientes fueron: 1:5, 1:25, 1:125 y 1:625 como el punto de menos concentración de ADNc.

Una vez obtenida y comprobada una eficiencia de amplificación similar para cada gen, se realizaron las corridas correspondientes a cada experimento y el análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el Método Comparativo de C_T o Método de $\Delta\Delta C_T$ para ensayos de expresión relativa, utilizando como genes endógenos para normalizar a GAPDH y B2M.^{116,117}

6.2.5. Análisis histoquímico

Los explantes procedentes de los cultivos en presencia o ausencia de PRP en los tiempos de análisis anteriormente señalados en la sección 6.2.1. en la página 25, fueron fijados en formaldehído al 10%, y posteriormente procesados por la técnica histológica convencional e incluidos en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 5

µm de grosor y se fijaron en portaobjetos, para después llevar a cabo tinciones histoquímicas, con las que se evaluó si el tratamiento con PRP produjo cambios dentro de la estructura del tejido, comparando con los respectivos controles del experimento. Se llevó a cabo la tinción con safranina-O y verde rápido para detectar la presencia de proteoglicanos. Por último, se tomaron ocho imágenes de campos al azar, en cada laminilla, en un microscopio de campo claro Nikon 50i equipado con el Software NIS Elements BR 2.30 (Labophot 2, Nikon Instruments, Tokyo, Japón).

Las microfotografías provenientes de la tinción con safranina-O y verde rápido fueron analizadas con una escala de Mankin modificada, la cual sirvió para evaluar degradación, reparación y regeneración específicamente en cartílago con OA. La escala original evalúa 4 parámetros, sin embargo, para fines del presente trabajo se evaluaron únicamente 3, excluyendo el análisis de la *tidemark*, debido a que los explantes cultivados carecían de hueso subcondral. En la Tabla 4 se muestran los parámetros evaluados y su correspondiente puntuación. De acuerdo a esta clasificación, entre mayor puntaje se obtenga mayor será el daño o la alteración en el tejido.

Tabla 4. Descripción de los parámetros evaluados con la escala de Mankin modificada.¹¹⁸

Parámetro	Puntuación
Estructura del cartilago	
Intacta	0
Irregularidad superficial	1
Superficie irregular con pannus (inflamación)	2
Fisuras hasta la zona media	3
Fisuras hasta la zona profunda	4
Celularidad	
Normal	0
Pérdida leve de clusters de condrocitos	1
<25% de clusters	2
Hipocelularidad	3
Intensidad de la tinción con safranina-O	
Normal	0
Pérdida leve	1
Pérdida moderada	2
Pérdida severa	3
Ninguna	4

6.2.6. Análisis inmunohistoquímico

Se obtuvieron cortes adicionales de las muestras utilizadas para el análisis histoquímico. Sobre estos cortes se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para marcar los colágenos tipo I y tipo II, para lo cual se utilizaron anticuerpos primarios específicos colágenos tipo I y tipo II (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) empleando el estuche comercial *Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB detection IHC kit* (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), como sistema de detección inmunohistoquímico. Una vez fijados los cortes, se hidrataron en concentraciones sucesivas de alcohol (70%, 96% y 100%) y xilol por 3 min cada uno. Posteriormente se bloquearon, tanto la peroxidasa endógena, como las proteínas, para después incubar con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego se añadió el anticuerpo secundario, se incubó por 30 min y se realizó el revelado por medio de diaminobencidina con una mezcla de sustrato/cromógeno (10:1). Por último se llevó a cabo una contratinción contrastando con hematoxilina de Harris y las muestras se deshidrataron en concentraciones sucesivas de etanol al 70, 95 y 100%, pasando al final por dos cambios de xilol. Las muestras ya teñidas en las laminillas se cubrieron con la resina entellán y cubreobjetos. Se tomaron ocho imágenes de campos al azar en cada laminilla en el microscopio de campo claro Nikon 50i que cuenta con el Software NIS Elements BR 2.30 (Nikon Instruments).

La intensidad del marcaje de cada proteína se analizó con el software gratuito ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>). De forma breve, el análisis consta de 3 pasos principalmente: 1. Convertir la imagen a escala de grises, 2. Aislar (segmentar) el colágeno teñido de café o marrón y 3. Medir el área del umbral seleccionado. El área resaltada teñida se puede representar en valores de área o porcentaje de área.

6.3 Análisis Estadístico.

El cálculo del tamaño de muestra para la evaluación *in vivo* se realizó con la fórmula para la estimación de media de dos poblaciones con un 95% de poder, dada una desviación estándar de 15 puntos en la escala de WOMAC y un nivel de alfa de 0.05. Para analizar la comparación de las variables cualitativas entre ambos grupos de pacientes se utilizó la prueba no paramétrica de Chi-cuadrada y Exacta de Fisher. Las variables numéricas se analizaron con la prueba paramétrica ANOVA con la prueba

post hoc de comparaciones múltiples de Tukey para ver diferencias entre grupos. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para todas las pruebas, un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Los datos se presentan como la media de los valores \pm la desviación estándar, a menos que se indique lo contrario.

7. RESULTADOS

7.1. Estudio Clínico (Evaluación *in vivo* del Tratamiento con PRP)

7.1.1. Características de los pacientes

Se incluyó un total de 75 pacientes con OA leve de rodilla que fueron aleatorizados en este estudio. De ellos, 10 pacientes fueron excluidos del análisis final, debido a que no completaron el seguimiento indicado después del tratamiento (Figura 2). Al final, se incluyeron 65 pacientes para su análisis (23 hombres y 42 mujeres). Veintitrés sujetos presentaron OA de rodilla grado I y 42 tuvieron OA grado II. El grupo del tratamiento convencional estuvo conformado por 32 pacientes y el grupo del PRP lo integraron 33 pacientes.

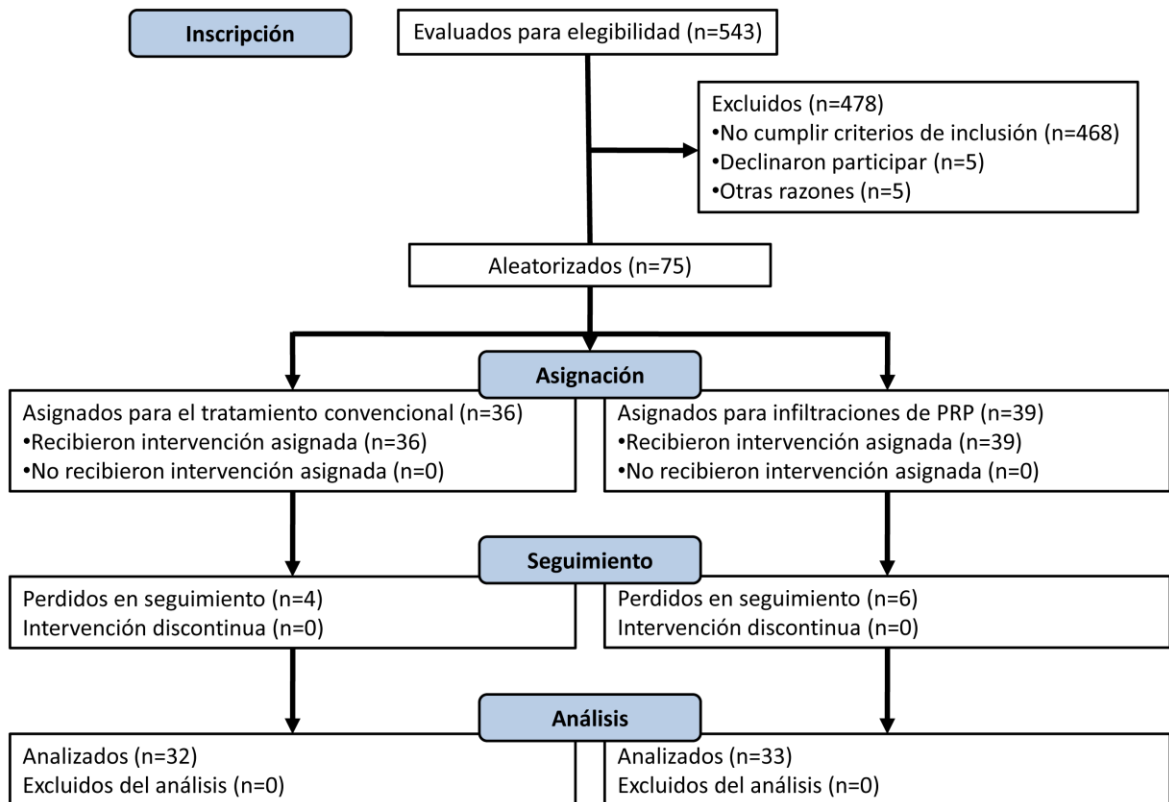


Figura 2. Diagrama de flujo del estudio de acuerdo a los estándares CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials).

Tanto la edad de los pacientes, así como su IMC no fueron significativamente diferentes entre los dos grupos ($p > 0.05$). Se presentó un mayor porcentaje de participantes del sexo femenino que de hombres en ambos grupos (62% de mujeres en el grupo del tratamiento convencional y 67% de mujeres en el grupo del PRP), estos valores fueron similares para los dos grupos. Adicionalmente, la media de los valores de EVA y WOMAC para el grupo de tratamiento convencional fue de 5.9 ± 2.2 y 35.5 ± 19.0 , respectivamente; y de 4.9 ± 2.4 y 35.7 ± 19.5 para el grupo de PRP, respectivamente ($p > 0.05$). La información demográfica completa de los pacientes se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Comparación de los datos demográficos de la población de estudio. Los dos grupos de tratamiento fueron homogéneos para todos los parámetros evaluados.

Comparación Demográfica			
	Tratamiento Convencional	PRP¹	Valor de p
Pacientes	32	33	
Edad	55.6 ± 11.4	57.2 ± 8.1	0.567
Sexo	62% F, 38% M	67% F, 33% M	1.0
IMC²	29.5 ± 3.8	32.2 ± 6.2	0.336
Kellgren-Lawrence			
Grado I	12 (37%)	11 (33%)	0.802
Grado II	20 (63%)	22 (67%)	0.943
Valor inicial EVA³	5.9 ± 2.2	4.9 ± 2.4	0.111
Valor inicial WOMAC⁴	35.5 ± 19	35.7 ± 19.5	0.798

¹PRP, Plasma rico en plaquetas; ²IMC, Índice de masa corporal; ³EVA, Escala visual análoga; ⁴WOMAC, *Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index*.

7.1.2. Análisis del PRP

El promedio de la concentración de plaquetas en sangre total fue de $251.1 \pm 69.1 \times 10^3/\mu\text{L}$ y en las preparaciones de PRP fue de $513.3 \pm 189.3 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Tabla 5). En promedio, se observó un incremento de 2.04 veces más plaquetas en el PRP con respecto a su concentración en sangre total. El número de leucocitos fue mucho menor en el PRP que en sangre total, con un promedio de $0.52 \pm 0.46 \times 10^3/\mu\text{L}$ y $6.89 \pm 2.19 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente; alrededor de 13.25 veces menos leucocitos en el PRP que

en sangre total. Por otro lado, se pudieron detectar los niveles tanto de IL-1ra como de TGF- β en todas las muestras de PRP después de haber sido activadas, observándose un coeficiente de variación, entre las tres intervenciones, de 6.71 % para IL-1ra y de 8.34 % para TGF- β (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de componentes sanguíneos en muestras de sangre total, PRP¹ y PRP activado.

Análisis de Componentes Sanguíneos				Análisis de PRP activado				
Componente Sanguíneo	Concentración ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ²			Citocina Evaluada	Concentración (pg/mL) ²			CV ⁵ (%)
	Sangre Total	PRP	Cambio (No. veces)		PRP 1	PRP 2	PRP 3	
Plaquetas	251.06 ± 69.1	513.25 ± 189.3	2.04	IL-1ra³	274.3 \pm 124.0	293.4 \pm 167.1	313.8 \pm 231.6	6.71
Leucocitos	6.89 \pm 2.19	0.52 \pm 0.46	-13.25	TGF-β⁴	20,435 $\pm 5,287$	19,461 $\pm 4,231$	21,183 $\pm 8,556$	8.34

¹PRP, plasma rico en plaquetas; ²Promedio \pm desviación estándar; ³IL-1ra, antagonista del receptor de Interleucina-1; ⁴TGF- β , factor de crecimiento transformante- β ; ⁵CV, coeficiente de variación.

7.1.3. Evaluación clínica de los pacientes

Se observó una disminución en el nivel del dolor en la EVA en los dos grupos de tratamiento en todos los puntos de seguimiento (Figura 3). Sin embargo, se pudo apreciar que la disminución en la sensación del dolor fue mucho mayor en el grupo PRP que en el grupo tratamiento convencional (grupo PRP: $p < 0.001$, grupo tratamiento convencional: $p < 0.01$). Al hacer una comparación entre grupos, la diferencia más significativa fue a las 12 semanas en donde el grupo PRP tuvo un puntaje de 1.9 ± 1.6 , en tanto que el puntaje para el grupo tratamiento convencional fue de 4.1 ± 2.6 ($p < 0.01$).

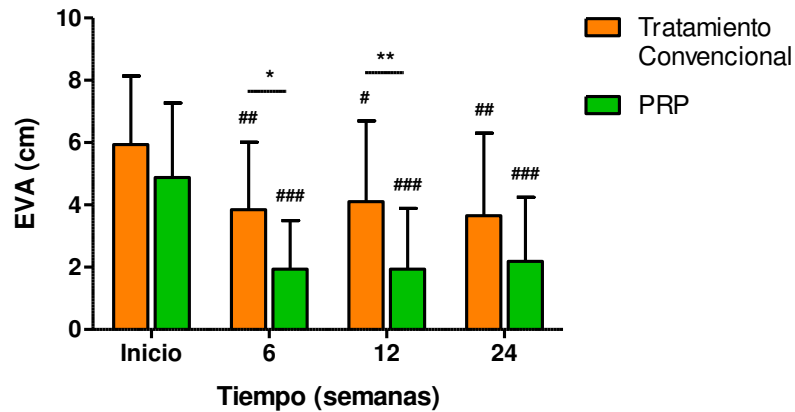


Figura 3. Media de los valores de EVA en los grupos de tratamiento convencional y PRP. El grupo PRP mostró los valores de EVA más bajos en todos los tiempos de evaluación (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ vs inicio; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs tratamiento convencional).

Los valores para las subcategorías rigidez, dolor y capacidad funcional de la escala WOMAC fueron menores en todos los tiempos de evaluación en ambos grupos (Figura 4). Sin embargo, esta disminución sólo fue significativa estadísticamente en el grupo PRP ($p < 0.001$). La comparación entre grupos de los 3 componentes mostró una disminución significativa en el dolor y la capacidad funcional a favor del tratamiento con PRP. Las diferencias significativas entre los grupos en cuanto al dolor se dieron a las 6 y 12 semanas de seguimiento ($p < 0.05$), el grupo tratamiento convencional tuvo valores de 5.8 ± 2.9 y 5.7 ± 3.9 y el grupo PRP tuvo valores de 3.1 ± 2.6 y 2.7 ± 2.4 , respectivamente. La capacidad funcional fue significativamente diferente entre los grupos a las 6, 12 y 24 semanas ($p < 0.05$), con valores de 18.2 ± 12.0 , 18.3 ± 2.7 y 16.7 ± 13.3 en el grupo tratamiento convencional y 8.7 ± 8.0 , 8.3 ± 7.3 y 7.9 ± 7.7 en el grupo PRP, respectivamente.

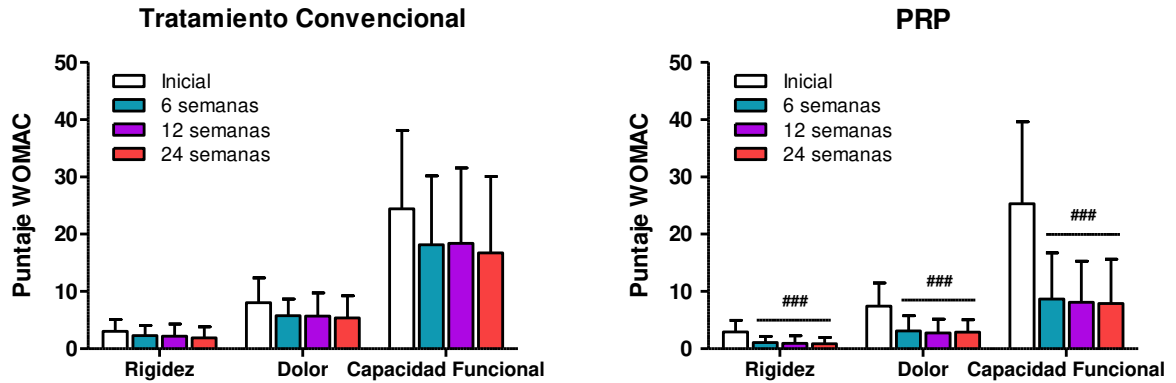


Figura 4. Media de los valores de WOMAC para las tres subcategorías en los grupos tratamiento convencional y PRP. A pesar de que en ambos grupos se aprecia una disminución de los puntajes, la disminución de los valores iniciales solo fue significativa en el grupo PRP en todos los tiempos de evaluación (### p<0.001 vs Inicial).

En ambos grupos se pudo observar que hubo una disminución en el puntaje total de la escala WOMAC en los tiempos evaluados. No obstante, al igual que en la escala del dolor (EVA), la disminución con respecto a los valores iniciales sólo fue significativa en el grupo PRP ($p < 0.001$). También se obtuvo una diferencia estadística en los valores totales de WOMAC al realizar una comparación entre grupos ($p < 0.05$). La media de los puntajes de WOMAC a las 6, 12 y 24 semanas fue 26.2 ± 16.0 , 26.3 ± 17.8 y 24.0 ± 18.6 en el grupo tratamiento convencional y 12.8 ± 11.0 , 12.0 ± 10.6 y 11.7 ± 10.0 en el grupo PRP, respectivamente (Figura 5).

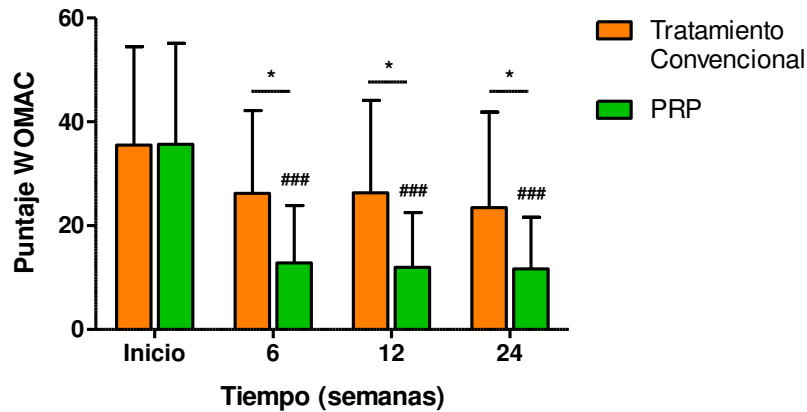


Figura 5. Media de los valores totales de WOMAC en los grupos de tratamiento convencional y PRP. Solo en el grupo PRP la reducción en el puntaje total de WOMAC fue significativa en todos los tiempos de evaluación. La diferencia en el puntaje entre los dos grupos fue estadísticamente significativa (### p<0.001 vs inicio; * p<0.05 vs tratamiento convencional).

Los resultados del cuestionario SF-12 para evaluar la calidad de vida, se pueden agrupar en dos principales dominios, el mental y el físico. Así, los principales cambios en estos dos componentes sólo fueron significativos en el grupo PRP (p<0.001). Los valores promedio del resumen del componente mental (MCS, *mental component summary*) al inicio y a las 6, 12 y 24 semanas de seguimiento fueron 44.2 ± 11.8 , 55.4 ± 8.7 , 55.9 ± 7.9 y 54.3 ± 7.6 , respectivamente (Figura 6).

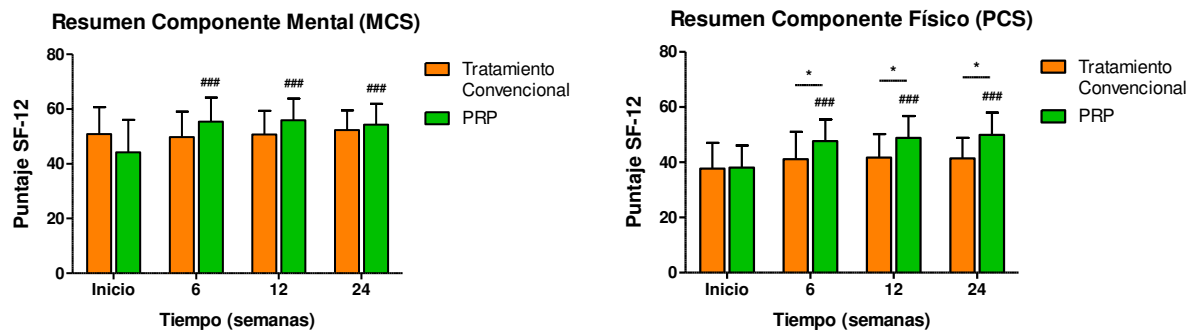


Figura 6. Media de los valores del componente mental (MCS) y físico (PCS) del cuestionario SF-12 en los grupos tratamiento convencional y PRP. Sólo el grupo PRP mostró una mejoría significativa en los dominios mental y físico (### p<0.001 vs inicio; * p<0.05 vs tratamiento convencional).

Los valores promedio del resumen del componente físico (PCS, *physical component summary*), al inicio y a las 6, 12 y 24 semanas de seguimiento fueron 38.0 ± 8.0 , 47.6 ± 7.9 , 48.8 ± 7.9 y 49.9 ± 8.1 , respectivamente. En el grupo PRP, todos los componentes del cuestionario SF-12, excepto por variable salud general, mostraron una mejoría a las 24 semanas de seguimiento en comparación con los valores iniciales (al menos se observó una diferencia estadística con un valor $p < 0.05$) (Figura 7). En cambio, en el grupo que recibió el tratamiento convencional no se observó un incremento significativo en los valores de los componentes evaluados que denotara una mejora en la calidad de vida.

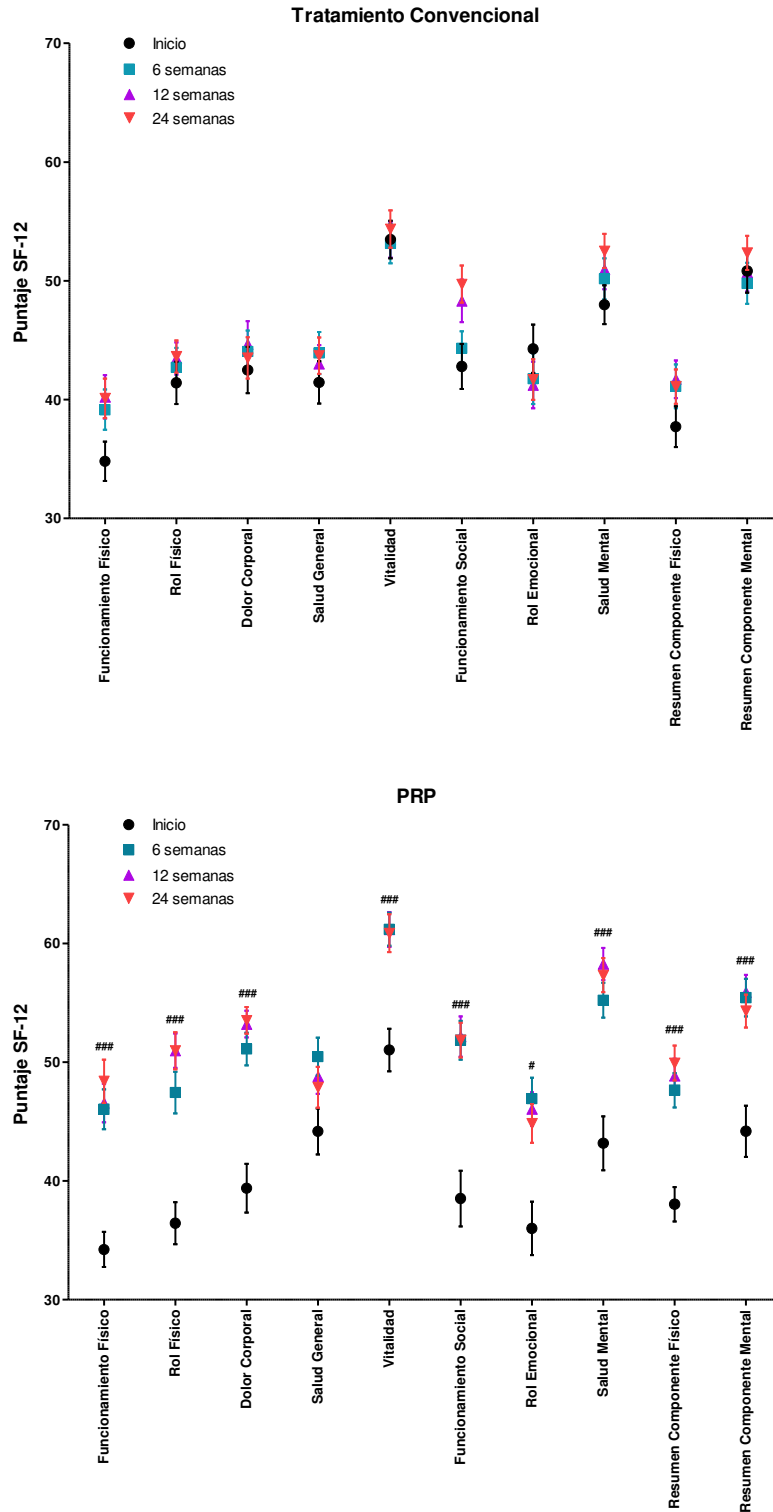


Figura 7. Media de los valores de los componentes evaluados en el cuestionario SF-12 en los grupos de tratamiento convencional y PRP. Todas las variables que componen el cuestionario (excepto por la variable salud general) mejoraron significativamente a las 24 semanas de seguimiento en el grupo PRP en comparación con sus valores iniciales (### p<0.001, # p<0.05 vs inicio).

7.2. Evaluación *in vitro* del Tratamiento con PRP

7.2.1. Características de los donadores y muestras biológicas obtenidas

Se obtuvieron muestras de explantes de cartílago y de PRP de 10 donadores (6 hombres y 4 mujeres) con un promedio de edad de 65.8 ± 7.1 años. Los explantes de dos donadores fueron suficientes para llevar a cabo los ensayos de expresión génica y los ensayos histológicos, los explantes de 4 donadores se utilizaron únicamente para el análisis de expresión génica y los explantes de los 4 donadores restantes se utilizaron para el análisis histológico. En cuanto a las muestras de PRP, el número promedio de plaquetas en sangre total y en el PRP fue de $273.5 \times 10^3 \pm 61.4 \times 10^3$ y $910.9 \times 10^3 \pm 199.5 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente. En general, la concentración de plaquetas fue 3.6 veces mayor en las muestras de PRP que en sangre total. La concentración promedio de leucocitos en el PRP fue de solo $0.539 \times 10^3 \pm 0.76 \times 10^3/\mu\text{L}$, y de $8.24 \times 10^3 \pm 1.87 \times 10^3/\mu\text{L}$ en sangre total, alrededor de 15 veces menos leucocitos que en sangre total.

7.2.2. Análisis de expresión génica

La expresión de los marcadores de la MEC, colágeno tipo II y agregano, fue mayor en el grupo PRP en comparación con el control a los 14 ($p < 0.05$) y 28 días ($p < 0.01$) (Figura 8A). La expresión tanto de colágeno tipo II ($p < 0.01$) como de agregano ($p < 0.05$) en el grupo PRP fue significativamente mayor que en el grupo IL-1 β a los 14 días. Se observó una sobre-expresión de colágeno tipo II en los grupos PRP ($p < 0.001$) y PRP/IL-1 β ($p < 0.05$) a los 28 días en comparación con su expresión en el grupo IL-1 β ; la expresión de agregano mostró un comportamiento similar a los 28 días en los grupos anteriormente señalados ($p < 0.001$ en PRP y $p < 0.01$ en PRP/IL-1 β).

Otro de los genes involucrados de manera importante en la formación de la MEC cartilaginosa es el factor de transcripción SOX9. Su expresión se vio incrementada de manera importante a los 28 días en los explantes tratados con PRP ($p < 0.01$) y con PRP/IL-1 β ($p < 0.05$) en comparación con el control (Figura 8A). Este efecto también se observó al comparar la expresión en los explantes tratados con PRP y PRP/IL-1 β ($p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente) con la expresión de SOX9 a los 28 días en los explantes tratados solo con IL-1 β . La única diferencia significativa a los 14 días de

cultivo ocurrió entre los explantes del grupo PRP e IL-1 β , en donde la expresión de SOX9 fue mayor en el grupo PRP ($p < 0.05$).

También se analizó por separado la expresión de colágeno tipo I y colágeno tipo X, dos genes cuya expresión se incrementa en cartílago con OA, y que normalmente estas proteínas no se encuentran formado parte de la MEC. Al analizar los resultados, no se apreció una variación significativa en su expresión en los diferentes grupos de tratamiento y en los tiempos analizados (Figura 8B).

Como parte de la visualización del efecto anti-inflamatorio del PRP, se analizó la expresión del marcador TIMP-1 (Inhibidor tisular de metaloproteasas 1), cuyo producto es una proteína capaz de inhibir la actividad de diferentes MMPs. De manera interesante, no se observó alguna variación importante en la expresión de TIMP-1 al comparar entre los grupos de tratamiento y entre los tiempos de análisis (Figura 8C).

Sin embargo, la expresión de MMP-13 (Metaloproteasa de matriz 13) se incrementó de manera significativa en el grupo IL-1 β a los 14 y 28 días en comparación con su expresión en el grupo control ($p < 0.05$ y $p < 0.05$, respectivamente) y en el grupo PRP ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) (Figura 8C). De manera interesante, la expresión de MMP-13 se vio disminuida en el grupo PRP/IL-1 β con respecto al grupo IL-1 β a los 28 días ($p < 0.05$).

El nivel de expresión de la agrecanasa ADAMTS-5 (Metaloproteasa con trombospondina 1 motivo 5) fue estadísticamente más alto en los explantes de cartílago tratados con IL-1 β en comparación con la expresión de aquellos tratados únicamente con PRP ($p < 0.05$) o con PRP/IL-1 β ($p < 0.05$) a los 28 días (Figura 8C).

La presencia del estímulo pro-inflamatorio con IL-1 β incrementó la expresión génica de IL-1 β en los grupos IL-1 β y PRP/IL-1 β en comparación tanto con el grupo control ($p < 0.05$) como con el grupo PRP ($p < 0.05$) a los 14 días (Figura 8C). A los 28 días de cultivo, la expresión de IL-1 β permaneció significativamente más alta en el grupo IL-1 β en comparación con el grupo control ($p < 0.05$) y el grupo PRP (0.01). Sin embargo, se pudo apreciar una importante disminución en la expresión de IL-1 β a los 28 días en el grupo PRP/IL-1 β en comparación con el grupo tratado sólo con IL-1 β (0.05).

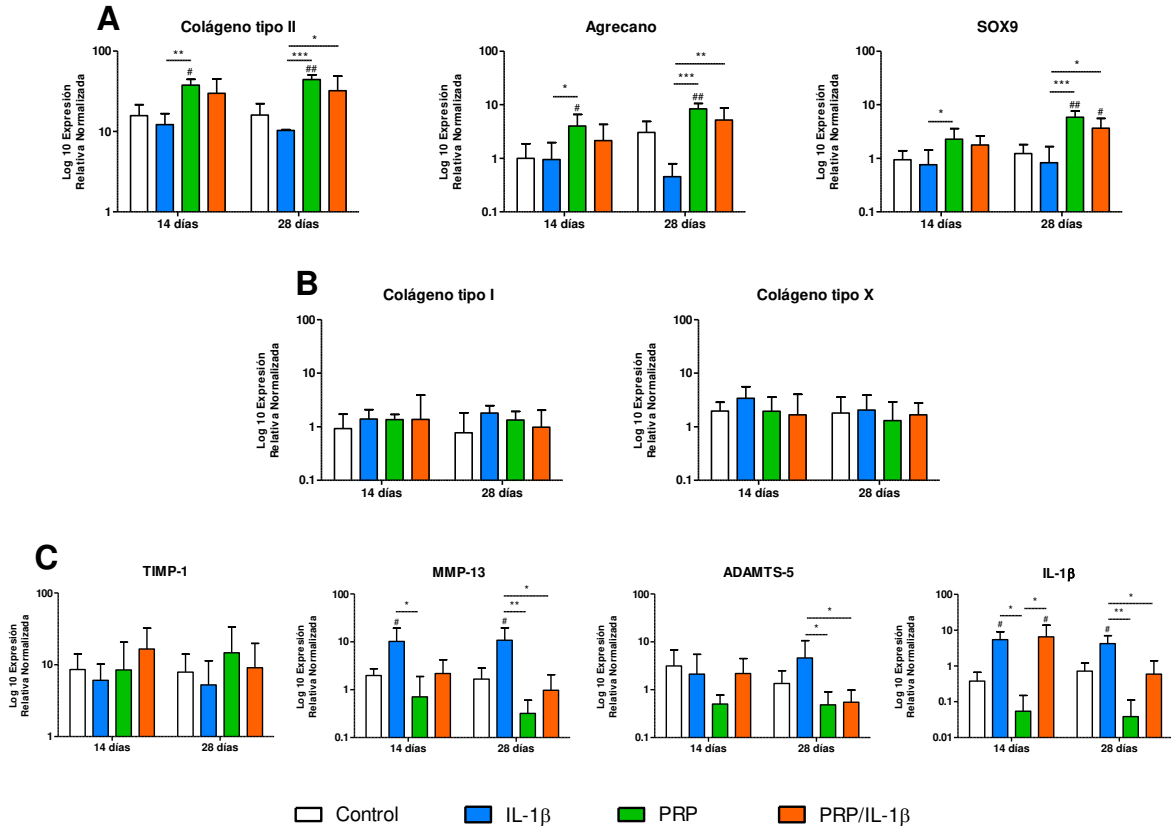


Figura 8. Expresión génica relativa de los distintos marcadores en explantes de cartilago.

Los explantes de cartilago fueron cultivados en presencia de IL-1 β (20 pg/mL), PRP (10%) y PRP/IL-1 β (10% y 20 pg/mL, respectivamente) con agitación constante y analizados a los 14 y 28 días. A) Genes involucrados en la formación de la MEC, B) Genes expresados en cartilago con OA y C) Genes asociados a inflamación y degradación del cartilago en OA. Los datos se normalizaron con GAPDH y B2M y el cambio en la expresión está expresado como Log 10. Los datos están representados como media \pm desviación estándar de 6 experimentos independientes (donadores) analizados por triplicado. # p<0.05, ## p<0.01 vs control; las diferencias entre los grupos se indican con líneas (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

7.2.3. Análisis histológico

En general, los explantes mostraron una tinción con safranina-O más clara en la zona superficial y más oscura hacia las zonas más profundas en todos los grupos. Sin embargo, se observó una marcada preservación en la intensidad de la tinción en los explantes tratados con PRP a los 14 y 28 días (Figura 9). En los grupos PRP y PRP/IL-1 β se pudo apreciar una mejor integridad de la superficie cartilaginosa, mostrando una superficie casi normal y lisa, los explantes del grupo control mostraron algunas irregularidades superficiales y fue en el grupo IL-1 β en donde se apreciaron una mayor

cantidad de irregularidades y ondulaciones. De manera interesante, se detectó una mayor cantidad de lagunas en los explantes de los grupos PRP y PRP/IL-1 β . Esto se pudo confirmar posteriormente al contar el número de núcleos teñidos en cada grupo. El número de condrocitos incrementó significativamente al término del cultivo en los grupos control, PRP y PRP/IL-1 β comparado con el número de condrocitos antes del inicio de los cultivos ($p < 0.05$). El grupo PRP mostró una mayor cantidad de condrocitos por campo ($p < 0.05$) al compararlo con aquellos explantes del grupo IL-1 β (Figura 10). El puntaje en la escala de Mankin para todos los grupos se muestra en la Figura 9C. Los valores obtenidos para los grupos PRP y PRP/IL-1 β fueron menores que en los otros grupos; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p > 0.05$).

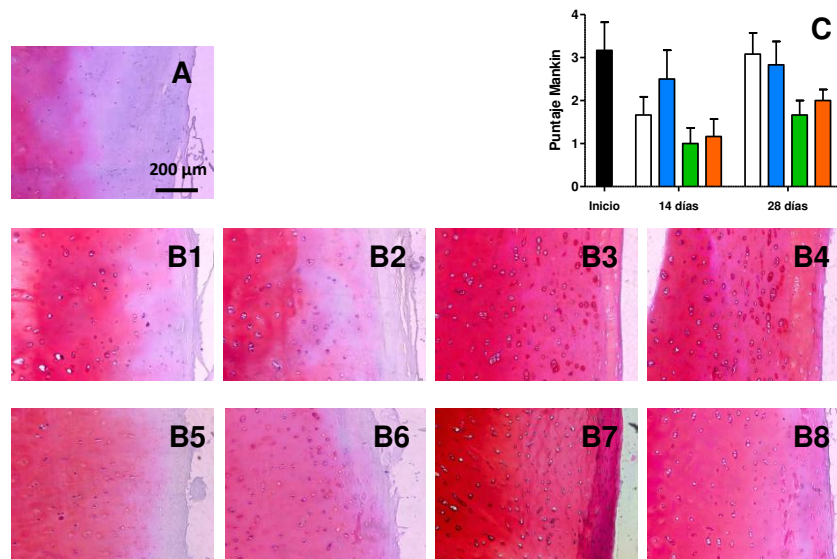


Figura 9. Análisis de la tinción con safranina-O. Los explantes de cartílago fueron incubados en agitación constante a 37°C a los días 0 (A; barra negra), 14 (B1-B4) y 28 (B5-B8) en medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con SBF (control; B1 y B5; barras blancas), IL-1 β (B2 y B6; barras azules), PRP (B3 y B7; barras verdes) y PRP/IL-1 β (B4 y B8; barras naranja). Todas las microfotografías fueron tomadas con el mismo aumento (100X). Cada imagen es representativa de 6 experimentos independientes. La gráfica de barras (C) representa el puntaje de Mankin para todos los grupos de tratamiento mencionados a los días 14 y 28. Cada barra corresponde a la media \pm error estándar de 6 experimentos independientes. No se obtuvieron diferencias significativas, solo se observaron tendencias de acuerdo a las medias.

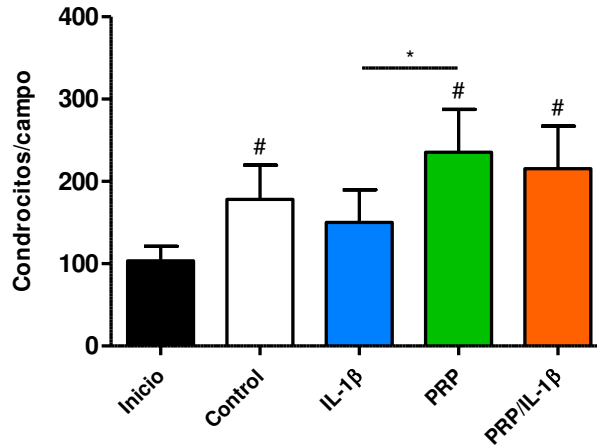


Figura 10. Número de condrocitos por campo en los explantes de cartílago. Se contó el número de núcleos teñidos en ocho campos diferentes elegidos al azar para cada grupo y al inicio para cada experimento (donador) a los 28 días de cultivo (n = 48). # $p < 0.05$ vs inicio; las diferencias entre los grupos se indican con líneas (* $p < 0.05$).

Como se esperaba, por tratarse de cartílago articular, se detectó la presencia de colágeno tipo II en todos los grupos, a todos los tiempos de análisis; sin embargo, los explantes de los grupos PRP y PRP/IL-1 β mostraron una mayor señal (indicado por una tinción más uniforme y prominente) en comparación con los explantes de los grupos control e IL-1 β (Figura 11). El análisis densitométrico reveló un incremento significativo en la producción de colágeno tipo II en los grupos PRP y PRP/IL-1 β comparados con los valores iniciales a los 14 ($p < 0.01$) y 28 ($p < 0.01$) días (Figura 11C). La producción de colágeno tipo II en el grupo control también fue significativamente mayor que el valor al inicio solo a los 28 días ($p < 0.01$). La comparación entre los diferentes grupos a los 14 días mostró que la intensidad en el marcaje del colágeno tipo II fue mayor en los grupos IL-1 β ($p < 0.05$), PRP ($p < 0.01$) y PRP/IL-1 β ($p < 0.01$) en comparación con el grupo control. También se pudo apreciar que la producción de colágeno tipo II continuó siendo mayor en los grupos PRP ($p < 0.05$) y PRP/IL-1 β ($p < 0.05$) a los 28 días de cultivo comparado con el grupo IL-1 β .

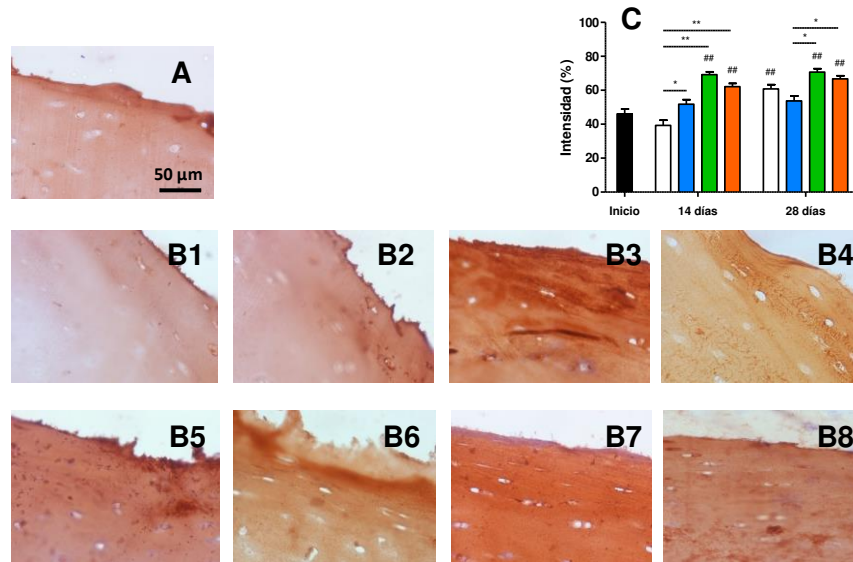


Figura 11. Análisis de la tinción inmunohistoquímica de colágeno tipo II. Dos de los cultivos de explantes de cartílago se incubaron con medio de cultivo DMEM/F12 adicionado con SBF y gentamicina en frascos *spinner*. Uno de estos frascos se mantuvo como control sin tratamiento (barras blancas). El segundo frasco se adicionó con IL-1β (barras azules). Un tercero y cuarto frascos *spinner* con medio DMEM/F12 y gentamicina se adicionaron con PRP (barras verdes) y PRP/IL-1β (barras naranjas), respectivamente. Todos los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ por 0, 14 y 28 días en agitación constante. Todas las imágenes tienen el mismo aumento (400X). Un color marrón en las imágenes corresponde a un marcaje positivo. (A) Imagen representativa de los explantes antes de su incubación. Las imágenes B1-B4 corresponden a explantes cultivados por 14 días. Las imágenes B5-B8 corresponden a explantes cultivados por 28 días. Las imágenes B1 y B5 corresponden al control sin tratamiento. Las imágenes B2 y B6 corresponden a explantes tratados con IL-1β. Las imágenes B3 y B7 corresponden a explantes tratados con PRP. Las imágenes B4 y B8 corresponden a explantes tratados con PRP e IL-1β. (C) Gráfica del análisis densitométrico del inmuno-marcaje de colágeno tipo II. Cada barra representa la media ± error estándar de 48 determinaciones. Un doble símbolo de número (##) indica diferencias significativas entre los explantes tratados y los explantes al inicio (0 días) (barra negra; p<0.01). Las diferencias entre grupos se indican con líneas y uno (*p<0.05) o dos asteriscos (**p<0.01).

Por otra parte, el inmuno-marcaje de colágeno tipo I fue principalmente positivo en tanto en los grupos control como IL-1β a los 14 días. La presencia de colágeno tipo I se observó principalmente en la zona superficial de los explantes en todos los grupos (Figura 12). La producción de esta proteína fue mucho mayor a los 14 días en los grupos control (p<0.05) e IL-1β (p<0.01) que el nivel detectado al inicio (Figura 12C). Además, se observó una diferencia significativa entre el grupo IL-1β y los grupos PRP (P<0.01) y PRP/IL-1β (P<0.05), con una menor presencia de colágeno tipo I en los

explantes tratados con PRP. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos de tratamiento a los 28 días.

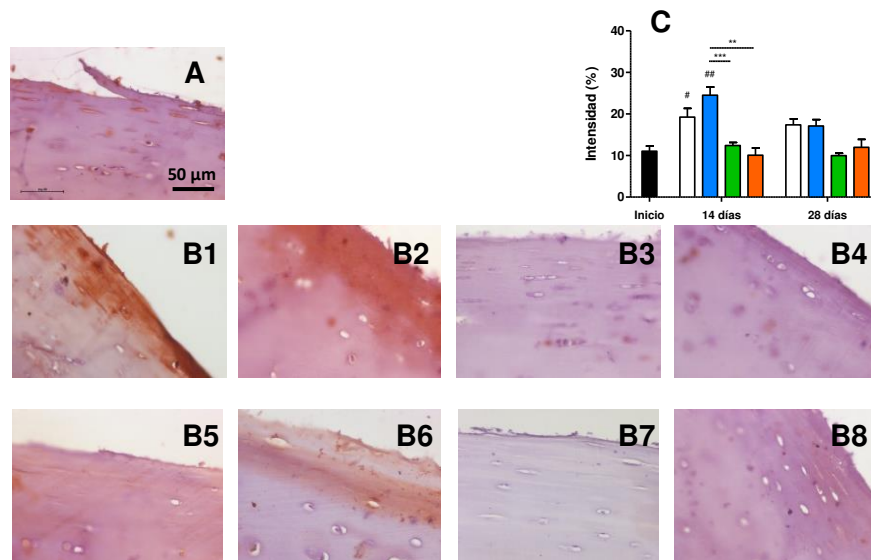


Figura 12. Análisis de la tinción inmunohistoquímica de colágeno tipo I. Dos de los cultivos de explantes de cartílago se incubaron con medio de cultivo DMEM/F12 adicionado con SBF y gentamicina en frascos *spinner*. Uno de estos frascos se mantuvo como control sin tratamiento (barras blancas). El segundo frasco se adicionó con IL-1 β (barras azules). Un tercero y cuarto frascos *spinner* con medio DMEM/F12 y gentamicina se adicionaron con PRP (barras verdes) y PRP/IL-1 β (barras naranjas), respectivamente. Todos los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ por 0, 14 y 28 días en agitación constante. Todas las imágenes tienen el mismo aumento (400X). Un color marrón en las imágenes corresponde a un marcaje positivo. (A) Imagen representativa de los explantes antes de su incubación. Las imágenes B1-B4 corresponden a explantes cultivados por 14 días. Las imágenes B5-B8 corresponden a explantes cultivados por 28 días. Las imágenes B1 y B5 corresponden al control sin tratamiento. Las imágenes B2 y B6 corresponden a explantes tratados con IL-1 β . Las imágenes B3 y B7 corresponden a explantes tratados con PRP. Las imágenes B4 y B8 corresponden a explantes tratados con PRP e IL-1 β . (C) Gráfica del análisis densitométrico del inmuno-marcaje de colágeno tipo I. Cada barra representa la media \pm error estándar de 48 determinaciones. Un solo símbolo de número (# p <0.05) o un doble símbolo (## p <0.01) indican diferencias significativas entre los explantes tratados y los explantes al inicio (0 días; barra negra). Las diferencias entre grupos se indican con líneas y dos (** p <0.01) o tres asteriscos (***) p <0.001).

8. DISCUSIÓN.

8.1. Evaluación *in vivo* del Tratamiento con PRP

El uso clínico del PRP se ha hecho más frecuente en el tratamiento de la OA de rodilla. Algunas de las principales ventajas de los concentrados plaquetarios son su bajo costo, su preparación a través de un proceso de centrifugación simple y el hecho de que se obtienen a partir de la sangre del mismo paciente. Se han reportado distintas formulaciones de PRP, lo que implica que aún se requiere estandarizar y optimizar las preparaciones de PRP, de acuerdo con sus diferentes aplicaciones biológicas.^{119,120}

En este trabajo se utilizó un PRP con una baja concentración de leucocitos, debido a que se ha descrito que la presencia de los glóbulos blancos en el espacio articular podrían generar un ambiente pro-inflamatorio negativo para el cartílago con OA. Aunque algunos de estos cambios pueden ser transitorios, incluyendo un incremento en la actividad inflamatoria de la IL-1 β , la activación de NF-kb, la expresión de COX-2 y la estimulación de rutas catabólicas;^{90,121} aún no está totalmente claro si la presencia de leucocitos en el PRP tiene un efecto adverso. Adicionalmente, se ha reportado mayor dolor e inflamación en pacientes a los que se les ha infiltrado un PRP con una gran cantidad de leucocitos.⁹⁸

En promedio, las preparaciones de PRP infiltradas en los pacientes tuvieron el doble de plaquetas que lo observado en sangre total y una cantidad muy baja de leucocitos (menos del 10% del número de leucocitos reportados en sangre total). Previamente, Filardo *et al.* 2012,⁹⁸ reportaron que ellos utilizaron PRP para tratar patologías degenerativas articulares de la rodilla. Estos autores mostraron que una concentración similar de plaquetas a lo reportado en el presente trabajo (1.5 veces más que en sangre total) produjo resultados comparables con concentraciones más altas de plaquetas (4.5 veces más que en sangre total). Este resultado indica que una cantidad mayor de plaquetas no necesariamente producirá mejores resultados en la clínica.

8.1.1. Efectividad clínica del tratamiento con PRP en OA leve de rodilla

Al igual que otras investigaciones, nuestros resultados indican que la terapia con PRP es eficaz y segura a corto y mediano plazo.^{97,103,122} Los pacientes tratados no reportaron mayores eventos adversos, el único evento adverso registrado fue dolor leve a moderado en el sitio de la infiltración, con una duración de no más de tres días y de resolución espontánea. Se ha reportado que los pacientes de menor edad y con un menor grado de OA responden mejor al tratamiento con PRP.^{123,124} A pesar de que nuestros pacientes tuvieron una edad promedio mayor a 50 años, los pacientes en el grupo PRP mostraron una mejoría sostenida durante el tiempo de seguimiento, sin síntomas y sin el consumo de algún otro medicamento. Esto concuerda con los resultados recientes de estudios controlados aleatorizados, en donde del tratamiento con PRP se comparó con el uso de ácido hialurónico.¹⁰⁰⁻¹⁰² En estos estudios, se reporta un mayor porcentaje de pacientes que respondieron positivamente al PRP que los que lo hicieron con ácido hialurónico, con un mejor resultado clínico alcanzado en todos los casos en el grupo de PRP en un seguimiento mínimo de 24 semanas.

En reportes previos, los pacientes tratados con PRP tenían grados variables de OA (de I-IV de acuerdo con el sistema de clasificación de Kellgren-Lawrence), lo que resulta en una gran variabilidad en la respuesta al tratamiento: entre mayor fuera el grado de OA, menor era la respuesta al tratamiento.^{96-98,125} En nuestro estudio, solo se incluyeron pacientes con grados de OA I y II, con el fin de tener una población homogénea en cuanto a este parámetro. El tratamiento para estos pacientes es esencialmente farmacológico, en donde el paracetamol es considerado uno de los medicamentos que primero se recomienda utilizar para el manejo del dolor en OA (basado en las recomendaciones del Colegio Americano de Reumatología),⁴⁰ como los AINES y las infiltraciones intra-articulares de otra moléculas, incluyendo el ácido hialurónico. Esta fue una de las razones por las que se decidió comparar el tratamiento con PRP contra la administración del paracetamol. En nuestra población de estudio, el 94% de los pacientes tratados con PRP respondieron de manera favorable al mostrar una reducción en el puntaje total de la escala WOMAC.

8.1.2. Cuantificación de IL-1ra y TGF- β en muestras de PRP infiltrado

El PRP también ha recibido atención como alternativa de tratamiento para la regeneración del cartílago basado en los resultados de ensayos enfocados en su uso. Así, estudios *in vitro* han reportado que el PRP es capaz de inhibir el proceso inflamatorio en condrocitos con OA¹²⁶ y que tiene el potencial de prevenir la pérdida o degradación del cartílago asociado con el proceso degenerativo de la OA.⁹¹ Estos hallazgos sugieren que la combinación de moléculas anabólicas y anti-inflamatorias presentes en el PRP, lo hacen un candidato ideal para el tratamiento de la OA.

Adicionalmente, en el presente estudio se logró detectar y cuantificar IL-1ra y TGF- β en todas las muestras de PRP después de cada infiltración en todos los pacientes. Se ha visto que una concentración de IL-1ra de 10-1000 veces más alta que la de IL-1 β es necesaria para contrarrestar el efecto pro-inflamatorio de IL-1 β .^{127,128} En promedio, los niveles de IL-1ra que se detectaron en nuestras muestras de PRP (274.3 ± 124 pg/mL, 293 ± 167.1 pg/mL y 313.8 ± 231.6 pg/mL) podrían ser suficientemente altos como para inhibir la actividad de IL-1 β , de acuerdo con la concentraciones de IL-1 β que se han reportado previamente en el líquido sinovial de pacientes con OA de rodilla (7.6 - 27.8 pg/mL).^{128,129} Se sabe que el PRP también estimula la proliferación celular y la producción de MEC. Esto se debe a la presencia de factores de crecimiento en el PRP que regulan la expresión del fenotipo del condrocito, lo cual juega un papel crucial en la progresión de la OA. En particular, el TGF- β tiene la capacidad de disminuir la actividad catabólica de la IL-1 β al estimular la síntesis de proteínas que forman parte de la MEC como proteoglicanos y colágeno tipo II.¹³⁰ Basados en los niveles de TGF- β que se encontraron en las muestras de PRP (20.4 ± 5.3 ng/mL, 19.5 ± 4.2 ng/mL y 21.2 ± 8.6 ng/mL) y en las concentraciones que previamente se han utilizado de este factor de crecimiento en ensayos *in vitro* (0.3 - 20.0 ng/mL),¹³¹⁻¹³³ se propone que las preparaciones de PRP utilizadas en el presente estudio, presentaron una actividad condrogénica.

8.2. Evaluación *in vitro* del Tratamiento con PRP

En esta parte del estudio, se puso a prueba la hipótesis de que el PRP influye positivamente en la expresión de genes que inducen la síntesis y la degradación de la

MEC, y que el PRP es capaz de promover la restauración del cartílago con OA leve, en presencia de un ambiente pro-inflamatorio. Para ello, la estrategia del proyecto consistió en emplear un PRP con una concentración muy baja de leucocitos; lo cual redujo considerablemente el efecto pro-inflamatorio propio de los leucocitos en las preparaciones de PRP. Por otro lado, se utilizó un PRP homólogo y el mismo método para su preparación para aplicarlo en los pacientes y para así analizar sus efectos *in vitro*. Con ello se intentó minimizar las variaciones en el comportamiento del PRP *in vivo* o *in vitro*. Adicionalmente, se cultivaron los explantes de cartílago en suspensión (en frascos *spinner*) y a largo plazo (28 días), en vez de realizar un cultivo estático de cartílago o de condrocitos por tiempos más cortos.¹³⁴ De esta manera se representó mejor el ambiente articular porque el cultivo en suspensión permitió una mejor difusión de los nutrientes y de oxígeno, llegando éstos a estructuras más profundas de los explantes, que lo que se logra con una difusión pasiva. El cultivo a largo plazo permitió darle seguimiento a los cambios ocurridos en los explantes de cartílago a tiempos que no se habían reportado previamente y que son más congruentes con lo que ocurre en las lesiones articulares tratadas con PRP. En este orden de ideas, también se suplementó repetidamente los cultivos de explantes de cartílago con PRP e IL-1 β replicando lo que ocurre en la clínica, cuando en la lesión de un paciente con OA de rodilla está presente un ambiente inflamatorio y que se ha tratado con infiltraciones repetidas de PRP. Se seleccionó una concentración de 20 pg/mL de IL-1 β en los ensayos para tratar de representar un efecto pro-inflamatorio crónico, en vez de un efecto pro-inflamatorio agudo (utilizando concentraciones de 10 ng/mL o más), de acuerdo a las concentraciones que se han reportado de IL-1 β en el líquido sinovial de pacientes con OA.^{129,135}

8.2.1. Efecto del PRP e IL-1 β sobre la expresión de marcadores específicos en explantes de cartílago

En los explantes tratados con PRP/IL-1 β , se observó un incremento en la expresión de colágeno tipo II y agregano; dos de los principales componentes de la MEC del cartílago hialino, en comparación con los explantes tratados solo con IL-1 β . Al final del experimento, los niveles de expresión de estos dos genes en el grupo PRP/IL-1 β fueron comparables a los alcanzados por los explantes tratados solo con PRP, lo que significa que las múltiples citocinas bioactivas presentes en el PRP logran neutralizar el

efecto de la IL-1 β . De manera similar, la expresión de SOX9, un factor de transcripción capaz de cambiar el balance metabólico hacia la síntesis de componentes de la MEC, incrementó de manera significativa en los explantes de los grupos tratados con PRP con o sin IL-1 β .¹³⁶ Estos resultados concuerdan con la sobre-expresión del colágeno tipo II, ya que se conoce ampliamente que SOX9 regula positivamente la expresión de colágeno tipo II.¹³⁷

El agrecano es uno de los componentes de la MEC que primero se degradan, y es considerado como un evento crucial en el desarrollo de la osteoartritis. Las agrecanasas son las principales responsables de la degradación del agrecano; en el cartílago, se han identificado dos diferentes agrecanasas (ADAMTS-4 y ADAMTS-5), sin embargo, aún está bajo debate cuál agrecanasa es principalmente responsable de la degradación del agrecano durante la destrucción del cartílago articular humano.¹³⁸ Se ha reportado que la expresión de ADAMTS-5 no está regulada por citocinas catabólicas como IL-1 β o el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en cartílago y condrocitos y que ésta se expresa constitutivamente.^{139,140} Los resultados obtenidos sugieren, que la expresión de ADAMTS-5 en los explantes estimulados con PRP, disminuyó de manera significativa a los 28 días en comparación con los explantes del grupo IL-1 β , y que la expresión de este gen, fue similar entre el grupo control y el grupo IL-1 β a los 14 y 28 días, indicando que el PRP y no la IL-1 β moduló la expresión de ADAMTS-5.

Al igual que las agrecanasas, las MMPs participan en el proceso del desarrollo de la OA, al degradar componentes de la MEC como el colágeno. La MMP-13 es la enzima responsable de la degradación de la mayor parte del colágeno tipo II.¹⁴¹ En los experimentos realizados, se detectó una disminución en la expresión de MMP-13 en los explantes estimulados con PRP a los 28 días, comparado con la expresión de MMP-13 en el grupo IL-1 β . Esto concuerda con el reconocido hecho de que IL-1 β estimula la expresión de algunas MMPs como MMP-1 y MMP-13 en el cartílago con OA.^{142,143} Además, algunos estudios en ratones han identificado que la expresión de SOX9, FGF-2 (uno de los muchos factores de crecimiento que se encuentran en el PRP) y el estímulo mecánico inhiben la expresión de proteasas como MMP-13 y ADAMTS-5 en condrocitos.¹⁴⁴ Esto podría contribuir a explicar lo que observamos en nuestro modelo, ya que la presencia de factores de crecimiento con actividad condrogénica en el PRP, en conjunto con el incremento de la expresión de SOX9

podieron haber inducido la disminución en la expresión de MMP-13 y ADAMTS-5 en los explantes de cartílago tratados con PRP.

Por otra parte, ninguno de los tratamientos indujo algún cambio en la expresión de TIMP-1. TIMP-1 es capaz de inhibir la actividad de muchas MMPs, incluyendo MMP-13,¹⁴⁵ y se piensa que regula el recambio en la MEC al modular la actividad de degradación de las MMPs,¹⁴⁴ además de que es el inhibidor tisular que más se expresa tanto en cartílago normal, como en cartílago con OA.¹⁴⁶ No obstante, en un estudio previo se mostró que la expresión de TIMP-1 en condrocitos humanos de cartílago con OA no parece ser modificada de manera significativa por la IL-1 β , pero sí promueve la expresión de MMP-13 y ADAMTS-4.¹⁴⁷ En nuestros resultados se pudo observar un efecto similar en la expresión de TIMP-1, al no verse modificada su expresión por la presencia de IL-1 β y/o PRP.

El colágeno tipo I se encuentra presente ya sea en pequeñas concentraciones o totalmente ausente en el cartílago hialino, pero es muy abundante en el fibrocartílago.^{148,149} No se encontraron cambios significativos en la expresión de colágeno tipo I en el análisis realizado, concordando con resultados similares reportados por otros investigadores.^{21,93} Además, la expresión de colágeno tipo X, el cual es un marcador específico de hipertrofia en condrocitos,¹⁵⁰ no varió de manera importante entre los diferentes grupos de tratamiento; lo cual indica que ni el PRP, ni la IL-1 β , tienen una influencia directa en la expresión de este gen en etapas tempranas de OA.

Por último, aunque se utilizó una concentración pequeña de IL-1 β en los experimentos realizados, en comparación con otras investigaciones, se observó un incremento en la expresión génica de IL-1 β en los explantes de los grupos IL-1 β y PRP/IL-1 β a los 14 días. De forma interesante, el tratamiento con PRP disminuyó significativamente la expresión de IL-1 β a los 28 días de cultivo en comparación con el grupo IL-1 β . Se ha reportado que los condrocitos localizados en el cartílago próximo a los sitios con OA son capaces de unir más IL-1 β comparados con los condrocitos aislados de un cartílago normal, haciendo a los condrocitos con OA más sensibles a la IL-1 β ,¹⁵¹ y que la exposición de estas células a la IL-1 β incrementa la expresión de la misma IL-1 β .¹⁵²

8.2.2. Efecto del PRP sobre la histología de explantes de cartílago

Los hallazgos histológicos mostraron un incremento en el número de condrocitos en los explantes tratados con PRP, lo cual fue demostrado después del conteo de los núcleos teñidos. En diferentes estudios *in vitro*, el PRP ha mostrado tener un marcado efecto positivo en la proliferación de los condrocitos.¹⁵³⁻¹⁵⁵ La presencia de factores de crecimiento pudo haber contribuido directamente al efecto proliferativo observado. Ya se han cuantificado algunos de los factores de crecimiento involucrados en la proliferación de los condrocitos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el TGF- β en preparaciones de PRP similares a las que utilizaron en el presente proyecto.¹⁵⁶ Los explantes del grupo control e IL-1 β tuvieron la tinción más pálida con safranina-O, especialmente la zona superficial del cartílago, lo que indica una reducción de los glicosaminoglicanos de la MEC. Esto no se vio representado del todo en la escala de Mankin, ya que no se observaron diferencias significativas al comparar entre grupos. Una posible explicación para estos resultados es que, como parte de los objetivos, se evaluaron explantes con defectos menores en el cartílago; incluso la puntuación al inicio fue baja. Una comparación entre explantes de cartílago identificados con zonas de daño mayores, tal vez hubiera podido mostrar diferencias significativas en la escala de Mankin. Sin embargo, los explantes de los grupos PRP y PRP/IL-1 β tuvieron los valores más bajos, indicando un efecto regenerativo del PRP.

La presencia de la citocina inflamatoria IL-1 β no pareció tener un efecto negativo importante en la preservación de la MEC en el grupo PRP/IL-1 β , en comparación con el grupo PRP. La detección específica de colágeno tipo II permitió identificar que el PRP incrementó significativamente la producción de esta importante proteína de la MEC a pesar de la presencia de la IL-1 β . Además, la detección inmunohistoquímica de colágeno tipo I fue más evidente en la capa superficial de los explantes del grupo IL-1 β . Trabajos previos sugieren que en la OA temprana, el colágeno tipo II se ve incrementado en las zonas más profundas del cartílago y disminuido en la zona superficial; y que en OA más avanzada, numerosas áreas con fibrosis y osteofitos contienen colágeno tipo I, mientras que la deposición de colágeno tipo II está disminuida.¹⁵⁷ Estos resultados indican que el PRP inhibe la degradación de la MEC del cartílago, induce la proliferación de los condrocitos y promueve la síntesis de componentes de matriz como agregano y colágeno tipo II. Adicionalmente al estímulo anabólico que los factores de crecimiento del PRP pudieron haber ejercido, otra

molécula que pudo haber jugado un papel importante en su actividad anti-inflamatoria al bloquear directamente la actividad de la IL-1 β es el IL-1ra, el cual es el inhibidor natural de la IL-1 β y se ha reportado en el plasma de pacientes con OA.¹⁵⁸ Por otra parte, las discrepancias entre los diferentes patrones de expresión relativa del ARNm y su proteína, sugiere la posibilidad de una regulación post-transcripcional en la expresión de colágeno tipo I. Se ha reportado que la expresión de un ARNm antisentido en condrocitos articulares murinos, influye en la síntesis de la proteína de colágeno tipo I al inhibir su ARNm sentido.¹⁵⁹ Además, sería interesante medir la expresión de otras colagenasas que se expresan en condrocitos, como la MMP-8,¹⁶⁰ la cual se ha reportado que también es capaz de degradar colágeno tipo I¹⁶¹, para así poder dar una respuesta a la diferencia en la expresión del ARNm y la proteína de colágeno tipo I en nuestro modelo de estudio.

En el cartílago normal existe una estricta regulación entre el recambio de la MEC que se mantiene debido a un delicado balance entre síntesis y degradación. En la OA, este balance se ve perturbado teniendo como consecuencia una desregulación tanto de síntesis como de degradación. Las citocinas inflamatorias, tales como la IL-1 β , actúan incrementando la síntesis de MMPs, disminuyendo la producción de enzimas inhibitoras de MMPs y disminuyendo la síntesis de MEC. La producción tanto de citocinas catabólicas como anabólicas, activan a los condrocitos, así, se requiere de la actividad de más de una citocina, para que se puedan estimular todas las reacciones metabólicas presentes en la OA.^{128,162} La cantidad de MEC degradada está altamente asociada con el desbalance en la producción de MMPs y de inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs).¹⁶³ Aunque la etiología de la OA no se ha comprendido del todo, el desbalance entre MMPs y TIMPs tiene un papel fundamental en el proceso de síntesis y degradación de la MEC bajo condiciones normales y de enfermedad.¹⁶⁴ Los resultados obtenidos sugieren que este desbalance puede ser restaurado en favor de la conservación de la matriz del cartílago con el tratamiento de PRP en etapas tempranas de OA.

Algunos investigadores han reportado el efecto positivo de diferentes formulaciones de PRP de donadores sanos sobre cartílago o condrocitos de pacientes que se sometieron a cirugías de reemplazo articular o artroplastia.^{21,90,93,121,126,165} En este estudio, cada preparación de PRP así como los explantes de cartílago que se estudiaron, se obtuvieron del mismo donador. Con este acercamiento se intentó aclarar

el potencial de la terapia con PRP al inducir cambios positivos en el cartílago con OA temprana, ya que en las investigaciones antes señaladas se utilizaron formulaciones de PRP de donadores con una edad mucho menor en cartílago o condrocitos de pacientes mayores, lo cual no representa la práctica clínica actual en el uso del PRP. Hasta donde se sabe, esta sería la primera vez en que explantes de cartílago humano fueron tratados con PRP autólogo *in vitro*.

Los resultados obtenidos en las dos fases del trabajo, permitieron responder de la siguiente manera a las hipótesis planteadas: *in vivo*, el tratamiento con infiltraciones de PRP en rodillas de pacientes con OA leve, es más efectivo que el tratamiento convencional debido a que, clínicamente, los pacientes tratados con PRP mejoran notablemente desde las 6 semanas de evaluación; *in vitro*, el PRP incrementa la expresión de genes involucrados en la síntesis de MEC de cartílago hialino (colágeno tipo II, agrecano, SOX9) y a su vez disminuye la expresión de genes asociados a la degradación de la MEC (MMP-13, ADAMTS-5, IL-1 β), facilitando la restauración de MEC en cartílago con OA leve como se pudo comprobar a nivel histológico.

9. CONCLUSIONES

- ❑ Se obtuvo una mayor efectividad clínica del tratamiento con infiltraciones de PRP que el tratamiento convencional, con una disminución en el nivel de dolor, mayor funcionalidad de la rodilla y un incremento en la calidad de vida de los pacientes tratados.
- ❑ El PRP infiltrado contiene concentraciones terapéuticas de IL-1ra y de TGF- β .
- ❑ El PRP ejerce un efecto regenerativo en el cartílago con OA leve cultivado en un ambiente pro-inflamatorio con IL-1 β .
- ❑ El PRP modificó favorablemente la expresión génica de marcadores involucrados en los procesos de anabolismo, catabolismo e inflamación del cartílago.
- ❑ El PRP restaura los defectos a nivel histológico en la MEC del cartílago con OA leve.
- ❑ Las infiltraciones con PRP podrían prevenir o retardar la progresión de la OA en las primeras etapas de la enfermedad.

10. LITERATURA CITADA

1. Cole, B. J. & Harner, C. D. Degenerative arthritis of the knee in active patients: evaluation and management. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **7**, 389–402 (1999).
2. Szabó, G., Lovász, G., Kustos, T. & Bener, a. A prospective comparative analysis of mobility in osteoarthritic knees. *J. Bone Joint Surg. Br.* **82**, 1167–9 (2000).
3. Fenwick, S. A., Gregg, P. J. & Rooney, P. Osteoarthritic cartilage loses its ability to remain avascular. *Osteoarthr. Cartil.* **7**, 441–452 (1999).
4. Loeser, R. F. Osteoarthritis year in review 2013: Biology. *Osteoarthr. Cartil.* **21**, 1436–1442 (2013).
5. Eyre, D. R., McDevitt, C. A., Billingham, M. E. & Muir, H. Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experimental osteoarthrosis. *Biochem. J.* **188**, 823–837 (1980).
6. Aigner, T. & McKenna, L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 5–18 (2002).
7. Poole, A. R. in *Osteoarthritic Disord.* (Kuettner, K. E. & Goldberg, V. M.) 247–260 (1995).
8. Smith, J. O., Oreffo, R. O. C., Clarke, N. M. P. & Roach, H. I. Changes in the antiangiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis. *J. Orthop. Sci.* **8**, 849–857 (2003).
9. Tetlow, L. C., Adlam, D. J. & Woolley, D. E. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* **44**, 585–594 (2001).
10. Brenner, S. S. *et al.* Osteoarthritis of the knee - Clinical assessments and inflammatory markers. *Osteoarthr. Cartil.* **12**, 469–475 (2004).
11. Zhang, W. *et al.* OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthr. Cartil.* **16**, 137–162 (2008).
12. Juni, P., Reichenbach, S. & Dieppe, P. Osteoarthritis: rational approach to treating the individual. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **20**, 721–740 (2006).
13. Kon, E., Filardo, G., Di Matteo, B. & Marcacci, M. PRP for the treatment of cartilage pathology. *Open Orthop. J.* **7**, 120–128 (2013).
14. Brandl, A. *et al.* Influence of the growth factors PDGF-BB, TGF-beta1 and bFGF on the replicative aging of human articular chondrocytes during in vitro expansion. *J. Orthop. Res.* **28**, 354–360 (2010).
15. Fortier, L. A., Mohammed, H. O., Lust, G. & Nixon, A. J. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Br.* **84**, 276–288 (2002).
16. Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P. & Nurden, A. T. Autologous

- platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* **91**, 4–15 (2004).
17. Cheng, T., Maddox, N. C., Wong, A. W., Rahnama, R. & Kuo, A. C. Comparison of gene expression patterns in articular cartilage and dedifferentiated articular chondrocytes. *J. Orthop. Res.* **30**, 234–245 (2012).
 18. Filardo, G. *et al.* Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **19**, 528–535 (2011).
 19. Hart, R. *et al.* Platelet-rich plasma in patients with tibiofemoral cartilage degeneration. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **133**, 1295–1301 (2013).
 20. Park, Y.-G., Han, S. B., Song, S. J., Kim, T. J. & Ha, C.-W. Platelet-Rich Plasma Therapy for Knee Joint Problems: Review of the Literature, Current Practice and Legal Perspectives in Korea. *Knee Surg. Relat. Res.* **24**, 70–78 (2012).
 21. Sundman, E. A. *et al.* The Anti-inflammatory and Matrix Restorative Mechanisms of Platelet-Rich Plasma in Osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* **42**, 35–41 (2014).
 22. Wang-Saegusa, A. *et al.* Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **131**, 311–317 (2011).
 23. Woolf, A. D. & Pfleger, B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull. World Health Organ.* **81**, 646–656 (2003).
 24. Park, S.-I., Lee, H.-R., Kim, S., Ahn, M.-W. & Do, S. H. Time-sequential modulation in expression of growth factors from platelet-rich plasma (PRP) on the chondrocyte cultures. *Mol. Cell. Biochem.* **361**, 9–17 (2012).
 25. Carlos, J. *et al.* Artículo de revisión Guía de práctica clínica basada en la evidencia para el diagnóstico y tratamiento de la osteoartritis. **27**, 552–572 (2011).
 26. Winter, F. D. MKSAP 14—Medical Knowledge Self-Assessment Program, edited by Paul E. Epstein, MD, and Patrick C. Alguire, MD. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent).* **20**, 319–320 (2007).
 27. Workshop, B., Traumathe, O. N. & World, D. The Global Burden of Musculoskeletal Injuries. *Clin Orthop Relat Res* **466**, 2306–2316 (2008).
 28. Corti, M. C. & Rigon, C. Epidemiology of osteoarthritis: prevalence, risk factors and functional impact. *Aging Clin. Exp. Res.* **15**, 359–363 (2003).
 29. Cardiel, M. H. & Rojas-Serrano, J. Community based study to estimate prevalence, burden of illness and help seeking behavior in rheumatic diseases in Mexico City. A COPCORD study. *Clin. Exp. Rheumatol.* **20**, 617–624 (2002).
 30. Peláez-Ballestas, I. *et al.* Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J. Rheumatol.* **38**, 3–6 (2011).
 31. Aldaco-García, V. D. & Zamorano-Solís, S. *Guía de Práctica Clínica. Tratamiento alternativo de pacientes con Osteoartrosis grado I-II.* (2010). at <http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/329_IMSS_10_Osteoartrosis_Rodilla_Grado_I_II/EyR_IMSS_329_10.pdf>

32. Loeser, R. F. Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **8**, 303–306 (2008).
33. Anitua, E. *et al.* New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol.* **24**, 227–234 (2006).
34. Feliu, C., Vidal, N. & Conesa, X. Escalas de valoración en cirugía ortopédica y traumatología. *Trauma* **21**, 34–43 (2010).
35. Bellamy, N., Buchanan, W. W., Goldsmith, C. H., Campbell, J. & Stitt, L. W. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J. Rheumatol.* **15**, 1833–1840 (1988).
36. Irrgang, J. J. *et al.* Development and Validation of the International Knee Documentation Committee Subjective Knee Form. *Am. J. Sport. Med.* **29**, 600–613 (2001).
37. Roos, E. M., Roos, H. P., Lohmander, L. S., Ekdahl, C. & Beynnon, B. D. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)--development of a self-administered outcome measure. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* **28**, 88–96 (1998).
38. Insall, J. N., Dorr, L. D., Scott, R. D. & Scott, W. N. Rationale of the Knee Society clinical rating system. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 13–24 (1989).
39. Naal, F. D. *et al.* The 12-item Oxford Knee Score: cross-cultural adaptation into German and assessment of its psychometric properties in patients with osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 49–52 (2009).
40. Hochberg, M. C. *et al.* American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **64**, 465–474 (2012).
41. Nelson, A. E., Allen, K. D., Golightly, Y. M., Goode, A. P. & Jordan, J. M. A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The chronic osteoarthritis management initiative of the U.S. bone and joint initiative. *Semin. Arthritis Rheum.* **43**, 701–712 (2014).
42. Hochberg, M. C. *et al.* Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee. American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum.* **38**, 1541–1546 (1995).
43. Hayami, T. Osteoarthritis of the knee joint as a cause of musculoskeletal ambulation disability symptom complex (MADS). *Clin. Calcium* **18**, 1574–1580 (2008).
44. Niethard, F. U. *et al.* Efficacy of topical diclofenac diethylamine gel in osteoarthritis of the knee. *J. Rheumatol.* **32**, 2384–2392 (2005).
45. Clegg, D. O. *et al.* Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N. Engl. J. Med.* **354**, 795–808 (2006).
46. Jüni, P. *et al.* Efficacy and safety of intraarticular hylan or hyaluronic acids for osteoarthritis of the knee: A randomized controlled trial. *Arthritis Rheum.* **56**, 3610–3619 (2007).
47. Chen, H. *et al.* Drilling and microfracture lead to different bone structure and

- necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *J. Orthop. Res.* **27**, 1432–1438 (2009).
48. Moyer, H. R. *et al.* A New Animal Model for Assessing Cartilage Repair and Regeneration at a Nonarticular Site. *Tissue Eng Part A* **16**, 2321–2330 (2010).
 49. Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr. Cartil.* **10**, 432–463 (2002).
 50. Barlić, A. & Kregar-Velikonja, N. Re-differentiation of human articular chondrocytes is not enhanced by a rotary bioreactor system. *Folia Biol. (Praha)*. **54**, 177–179 (2008).
 51. Lin, L. *et al.* Articular cartilage repair using dedifferentiated articular chondrocytes and bone morphogenetic protein 4 in a rabbit model of articular cartilage defects. *Arthritis Rheum* **58**, 1067–1075 (2008).
 52. Ortinau, S. *et al.* Effect of 3D-scaffold formation on differentiation and survival in human neural progenitor cells. *Biomed. Eng. Online* **9**, 70 (2010).
 53. Ab-Rahim, S., Selvaratnam, L. & Kamarul, T. The effect of TGF- β 1 and β 2-estradiol on glycosaminoglycan and type II collagen distribution in articular chondrocyte cultures. *Cell Biol. Int.* **32**, 841–847 (2008).
 54. Hickey, D. G., Frenkel, S. R. & Di Cesare, P. E. Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* **32**, 70–76 (2003).
 55. Loeser, R. F., Pacione, C. A. & Chubinskaya, S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **48**, 2188–2196 (2003).
 56. Schmidt, M. B., Chen, E. H. & Lynch, S. E. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthr. Cartil.* **14**, 403–412 (2006).
 57. Foster, T. E., Puskas, B. L., Mandelbaum, B. R., Gerhardt, M. B. & Rodeo, S. A. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am. J. Sports Med.* **37**, 2259–2272 (2009).
 58. Marx, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* **10**, 225–228 (2001).
 59. Creaney, L. & Hamilton, B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br. J. Sports Med.* **42**, 314–320 (2008).
 60. Pietramaggiori, G. *et al.* Quiescent Platelets Stimulate Angiogenesis and Diabetic Wound Repair. *J. Surg. Res.* **160**, 169–177 (2010).
 61. Sánchez, M., Anitua, E., Orive, G., Mujika, I. & Andia, I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sport. Med.* **39**, 345–354 (2009).
 62. Pietrzak, W. S. & Eppley, B. L. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg* **16**, 1043–1054 (2005).
 63. Carlson, N. E. & Roach, R. B. Platelet-rich plasma: clinical applications in

- dentistry. *J. Am. Dent. Assoc.* **133**, 1383–1386 (2002).
64. Mishra, A., Woodall, J. & Vieira, A. Treatment of Tendon and Muscle Using Platelet-Rich Plasma. *Clin. Sports Med.* **28**, 113–125 (2009).
 65. Kazakos, K., Lyras, D. N., Verettas, D., Tilkeridis, K. & Tryfonidis, M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury* **40**, 801–805 (2009).
 66. Ferrari, M. *et al.* A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int. J. Artif. Organs* **10**, 47–50 (1987).
 67. Marx, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **62**, 489–496 (2004).
 68. Griffin, X. L., Smith, C. M. & Costa, M. L. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. *Injury* **40**, 158–162 (2009).
 69. Anitua, E. *et al.* Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J. Orthop. Res.* **23**, 281–286 (2005).
 70. Aspenberg, P. & Virchenko, O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop. Scand.* **75**, 93–99 (2004).
 71. McCarrel, T. & Fortier, L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J. Orthop. Res.* **27**, 1033–1042 (2009).
 72. Menetrey, J. *et al.* Growth factors improve muscle healing in vivo. *J. Bone Joint Surg. Br.* **82**, 131–137 (2000).
 73. Hammond, J. W., Hinton, R. Y., Curl, L. A., Muriel, J. M. & Lovering, R. M. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am. J. Sports Med.* **37**, 1135–1142 (2009).
 74. Steinert, A. F. *et al.* Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 213 (2007).
 75. Ma, P. X. & Langer, R. Morphology and mechanical function of long-term in vitro engineered cartilage. *J Biomed Mater Res* **44**, 217–221 (1999).
 76. Mow, V. C., Holmes, M. H. & Lai, W. M. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J. Biomech.* **17**, 377–394 (1984).
 77. Wong, M. & Carter, D. . Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* **33**, 1–13 (2003).
 78. Eggli, P. S., Hunziker, E. B. & Schenk, R. K. Quantitation of structural features characterizing weight- and less-weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits. *Anat. Rec.* **222**, 217–227 (1988).
 79. Mishra, A. *et al.* Buffered Platelet-Rich Plasma Enhances Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chondrogenic Differentiation. *Tissue Eng. Part C* **15**, 431–435 (2009).

80. Krüger, J. P. *et al.* Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells. *J. Orthop. Res.* **30**, 845–852 (2012).
81. Sun, Y., Feng, Y., Zhang, C. Q., Chen, S. B. & Cheng, X. G. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int. Orthop.* **34**, 589–597 (2010).
82. Lee, H. R., Park, K. D. K. M., Joung, Y. K., Park, K. D. K. M. & Do, S. H. Platelet-rich plasma loaded hydrogel scaffold enhances chondrogenic differentiation and maturation with up-regulation of CB1 and CB2. *J. Control. Release* **159**, 332–337 (2012).
83. Wu, W. *et al.* Platelet-rich plasma - A promising cell carrier for micro-invasive articular cartilage repair. *Med. Hypotheses* **72**, 455–457 (2009).
84. Kalén, A., Wahlström, O., Linder, C. H. & Magnusson, P. The content of bone morphogenetic proteins in platelets varies greatly between different platelet donors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 261–264 (2008).
85. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **16**, 585–601 (2008).
86. Johnson, C. I., Argyle, D. J. & Clements, D. N. In vitro models for the study of osteoarthritis. *Vet. J.* **209**, 40–49 (2016).
87. Strehl, R., Tallheden, T., Sjögren-Jansson, E., Minuth, W. W. & Lindahl, A. Long-term maintenance of human articular cartilage in culture for biomaterial testing. *Biomaterials* **26**, 4540–4549 (2005).
88. Chan, P.-S., Caron, J. P. & Orth, M. W. Effects of glucosamine and chondroitin sulfate on bovine cartilage explants under long-term culture conditions. *Am. J. Vet. Res.* **68**, 709–715 (2007).
89. Beekhuizen, M. *et al.* Osteoarthritic synovial tissue inhibition of proteoglycan production in human osteoarthritic knee cartilage: establishment and characterization of a long-term cartilage-synovium coculture. *Arthritis Rheum.* **63**, 1918–1927 (2011).
90. Pereira, C. *et al.* Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage: a maintenance of chondrogenic potential and a transient pro-inflammatory activity followed by an inflammation resolution. *Tissue Eng. Part A* **19**, 1476–1488 (2013).
91. Matuska, A., O'Shaughnessy, K., King, W. & Woodell-May, J. Autologous solution protects bovine cartilage explants from IL-1 β - and TNF α -induced cartilage degradation. *J. Orthop. Res.* **31**, 1929–1935 (2013).
92. Liu, J. *et al.* A Comparison between Platelet-Rich Plasma (PRP) and Hyaluronate Acid on the Healing of Cartilage Defects. *PLoS One* **9**, e97293 (2014).
93. Osterman, C. *et al.* Platelet-Rich Plasma Increases Anti-inflammatory Markers in a Human Coculture Model for Osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* **43**, 1474–1484 (2015).
94. Sánchez, M., Anitua, E., Azofra, J., Aguirre, J. J. & Andia, I. Intra-articular

- injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: A retrospective cohort study. *Clin. Exp. Rheumatol.* **26**, 910–913 (2008).
95. Kon, E. *et al.* Platelet-rich plasma: Intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **18**, 472–479 (2010).
 96. Kon, E. *et al.* Platelet-rich plasma intra-articular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatments for cartilage pathology: From early degeneration to osteoarthritis. *J. Arthrosc. Relat. Surg.* **27**, 1490–1501 (2011).
 97. Napolitano, M. *et al.* Autologous platelet gel for tissue regeneration in degenerative disorders of the knee. *Blood Transfus.* **10**, 72–77 (2012).
 98. Filardo, G. *et al.* Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: Single- versus double-spinning approach. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **20**, 2082–2091 (2012).
 99. Spaková, T., Rosocha, J., Lacko, M., Harvanová, D. & Gharaibeh, A. Treatment of Knee Joint Osteoarthritis with Autologous Platelet-Rich Plasma in Comparison with Hyaluronic Acid. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **91**, 411–417 (2012).
 100. Cerza, F. *et al.* Comparison between hyaluronic acid and platelet-rich plasma, intra-articular infiltration in the treatment of gonarthrosis. *Am. J. Sports Med.* **40**, 2822–2827 (2012).
 101. Sánchez, M. *et al.* A randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short-term treatment of symptomatic knee osteoarthritis. *J. Arthrosc. Relat. Surg.* **28**, 1070–1078 (2012).
 102. Vaquerizo, V. *et al.* Comparison of intra-articular injections of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus durolane hyaluronic acid in the treatment of patients with symptomatic osteoarthritis: A randomized controlled trial. *J. Arthrosc. Relat. Surg.* **29**, 1635–1643 (2013).
 103. Jang, S. J., Kim, J. Do & Cha, S. S. Platelet-rich plasma (PRP) injections as an effective treatment for early osteoarthritis. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* **23**, 573–580 (2013).
 104. Raeissadat, S. A. *et al.* Knee Osteoarthritis Injection Choices: Platelet- Rich Plasma (PRP) Versus Hyaluronic Acid (A one-year randomized clinical trial). *Clin. Med. Insights. Arthritis Musculoskelet. Disord.* **8**, 1–8 (2015).
 105. Filardo, G. *et al.* Platelet-Rich Plasma Intra-articular Knee Injections Show No Superiority Versus Viscosupplementation: A Randomized Controlled Trial. *Am. J. Sports Med.* **43**, 1575–1582 (2015).
 106. Görmeli, G. *et al.* Multiple PRP injections are more effective than single injections and hyaluronic acid in knees with early osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* (2015). doi:10.1007/s00167-015-3705-6
 107. Kavadar, G., Demircioglu, D. T., Celik, M. Y. & Emre, T. Y. Effectiveness of platelet-rich plasma in the treatment of moderate knee osteoarthritis: a randomized prospective study. *J. Phys. Ther. Sci.* **27**, 3863–3867 (2015).

108. Forogh, B. *et al.* Effect of single injection of platelet-rich plasma in comparison with corticosteroid on knee osteoarthritis: a double-blind randomized clinical trial. *J. Sports Med. Phys. Fitness* **56**, 901–908 (2015).
109. Paterson, K. L., Nicholls, M., Bennell, K. L. & Bates, D. Intra-articular injection of photo-activated platelet-rich plasma in patients with knee osteoarthritis: a double-blind, randomized controlled pilot study. *BMC Musculoskelet. Disord.* **17**, 67 (2016).
110. Patel, S., Dhillon, M. S., Aggarwal, S., Marwaha, N. & Jain, A. Treatment With Platelet- Rich Plasma Is More Effective Than Placebo for Knee Osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* **41**, 356–364 (2013).
111. Kijowski, R., Blankenbaker, D., Stanton, P., Fine, J. & De Smet, A. Arthroscopic validation of radiographic grading scales of osteoarthritis of the tibiofemoral joint. *Am. J. Roentgenol.* **187**, 794–799 (2006).
112. Hawker, G. A., Mian, S., Kendzerska, T. & French, M. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **63**, S240–S252 (2011).
113. Gandhi, S. K. *et al.* Psychometric evaluation of the 12-item short-form health survey (SF-12) in osteoarthritis and rheumatoid arthritis clinical trials. *Clin. Ther.* **23**, 1080–1098 (2001).
114. Loeser, R. F. Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **8**, 303–306 (2003).
115. Ali, S. A. & Alman, B. RNA extraction from human articular cartilage by chondrocyte isolation. *Anal. Biochem.* **429**, 39–41 (2012).
116. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).
117. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
118. Mankin, H. J., Dorfman, H., Lippiello, L. & Zarins, A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg. Am.* **53**, 523–537 (1971).
119. Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L. & Albrektsson, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* **27**, 158–167 (2009).
120. Wasterlain, A. S., Braun, H. J. & Dragoo, J. L. Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma. *Oper. Tech. Orthop.* **22**, 33–42 (2012).
121. Cavallo, C. *et al.* Comparison of platelet-rich plasma formulations for cartilage healing: an in vitro study. *J. Bone Joint Surg. Am.* **96**, 423–429 (2014).
122. Raeissadat, S. A., Rayegani, S. M., Babaei, M. & Ghorbani, E. The Effect of Platelet-Rich Plasma on Pain, Function, and Quality of Life of Patients with Knee

- Osteoarthritis. *Pain Res. Treat.* **2013**, 1–7 (2013).
123. Kon, E., Filardo, G., Di Martino, A. & Marcacci, M. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: Evidence to support its use. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **19**, 516–527 (2011).
 124. Sampson, S., Reed, M., Silvers, H., Meng, M. & Mandelbaum, B. Injection of platelet-rich plasma in patients with primary and secondary knee osteoarthritis: a pilot study. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **89**, 961–969 (2010).
 125. Filardo, G. *et al.* Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study design and preliminary results of a randomized controlled trial. *BMC Musculoskelet. Disord.* **13**, 229 (2012).
 126. van Buul, G. M. *et al.* Platelet-Rich Plasma Releasate Inhibits Inflammatory Processes in Osteoarthritic Chondrocytes. *Am. J. Sports Med.* **39**, 2362–2370 (2011).
 127. Burger, D., Dayer, J. M., Palmer, G. & Gabay, C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **20**, 879–896 (2006).
 128. Fernandes, J. C., Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J.-P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* **39**, 237–246 (2002).
 129. Kokebie, R. *et al.* The role of synovial fluid markers of catabolism and anabolism in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and asymptomatic organ donors. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R50 (2011).
 130. Civinini, R. *et al.* Growth factors in the treatment of early osteoarthritis. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **10**, 26–29 (2013).
 131. Iwasaki, M. *et al.* Transforming growth factor- β 1 stimulates chondrogenesis and inhibits osteogenesis in high density culture of periosteum-derived cells. *Endocrinology* **132**, 1603–1608 (1993).
 132. Reinholz, G. G. *et al.* Rejuvenation of periosteal chondrogenesis using local growth factor injection. *Osteoarthr. Cartil.* **17**, 723–734 (2009).
 133. Ng, K. W. *et al.* Transient supplementation of anabolic growth factors rapidly stimulates matrix synthesis in engineered cartilage. *Ann. Biomed. Eng.* **39**, 2491–2500 (2011).
 134. Zhu, Y. *et al.* Ex vivo expansion of adipose tissue-derived stem cells in spinner flasks. *Biotechnol. J.* **4**, 1198–1209 (2009).
 135. Westacott, C. I. *et al.* Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **49**, 676–681 (1990).
 136. Cucchiari, M., Terwilliger, E. F., Kohn, D. & Madry, H. Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 2476–2488 (2009).
 137. Akiyama, H. & Lefebvre, V. Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. *J. Bone Miner. Metab.* **29**, 390–395 (2011).
 138. Verma, P. & Dalal, K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis. *J. Cell. Biochem.* **112**, 3507–3514 (2011).

139. Koshy, P. J. T. *et al.* The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: A time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.* **46**, 961–967 (2002).
140. Pratta, M. A., Scherle, P. A., Yang, G., Liu, R. Q. & Newton, R. C. Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein. *Arthritis Rheum.* **48**, 119–133 (2003).
141. Poole, A. R. *et al.* Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 78–81 (2002).
142. Bau, B. *et al.* Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum.* **46**, 2648–2657 (2002).
143. Kobayashi, M. *et al.* Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* **52**, 128–135 (2005).
144. Troeberg, L. & Nagase, H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 133–145 (2012).
145. Brew, K. & Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1803**, 55–71 (2010).
146. Hermansson, M. *et al.* Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin β A (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 43514–43521 (2004).
147. Assirelli, E. *et al.* Human osteoarthritic cartilage shows reduced in vivo expression of IL-4, a chondroprotective cytokine that differentially modulates IL-1 β -stimulated production of chemokines and matrix-degrading enzymes in vitro. *PLoS One* **9**, e96925 (2014).
148. Eyre, D. R. & Muir, H. Quantitative analysis of types I and II collagens in human intervertebral discs at various ages. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* **492**, 29–42 (1977).
149. Hollander, A. P., Dickinson, S. C., Sims, T. J., Soranzo, C. & Pavesio, A. Quantitative analysis of repair tissue biopsies following chondrocyte implantation. *Novartis Found. Symp.* **249**, 218–229; discussion 229–233, 234–238, 239–241 (2003).
150. Sandell, L. J. & Aigner, T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* **3**, 107–113 (2001).
151. Shlopov, B. V., Gumanovskaya, M. L. & Hasty, K. A. Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 195–205 (2000).
152. Daheshia, M. & Yao, J. Q. The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *J. Rheumatol.* **35**, 2306–2312 (2008).

153. Spreafico, A. *et al.* Biochemical investigation of the effects of human platelet releasates on human articular chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* **108**, 1153–1165 (2009).
154. Kaps, C. *et al.* Human platelet supernatant promotes proliferation but not differentiation of articular chondrocytes. *Med Biol Eng Comput* **40**, 485–490 (2002).
155. Gaissmaier, C. *et al.* Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials* **26**, 1953–1960 (2005).
156. Amable, P. R. *et al.* Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res. Ther.* **4**, 67 (2013).
157. Lorenz, H. & Richter, W. Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Prog. Histochem. Cytochem.* **40**, 135–163 (2006).
158. Attur, M., Krasnokutsky-Samuels, S., Samuels, J. & Abramson, S. B. Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **25**, 136–144 (2013).
159. van der Kraan, P. M., Vitters, E. L., Meijers, T. H. M., Poole, A. R. & van den Berg, W. B. Collagen type I antisense and collagen type IIA messenger RNA is expressed in adult murine articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **6**, 417–426 (1998).
160. Jeong, Y. J. *et al.* Melittin has a chondroprotective effect by inhibiting MMP-1 and MMP-8 expressions via blocking NF- κ B and AP-1 signaling pathway in chondrocytes. *Int. Immunopharmacol.* **25**, 400–405 (2015).
161. Hasty, K. A., Jeffrey, J. J., Hibbs, M. S. & Welgus, H. G. The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *J. Biol. Chem.* **262**, 10048–10052 (1987).
162. Goldring, M. B. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2**, 459–465 (2000).
163. Pathak, N. N. *et al.* Anti-inflammatory and chondroprotective effects of atorvastatin in a cartilage explant model of osteoarthritis. *Inflamm. Res.* **64**, 161–169 (2015).
164. Burrage, P. S., Mix, K. S. & Brinckerhoff, C. E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front. Biosci.* **11**, 529–543 (2006).
165. Woodell-May, J. *et al.* Autologous protein solution inhibits MMP-13 production by IL-1 β and TNF α -stimulated human articular chondrocytes. *J. Orthop. Res.* **29**, 1320–1326 (2011).

11. ANEXOS

11.1. Encuestas y Cuestionarios para la Evaluación Clínica de los Pacientes

Ficha de Identificación del Paciente.

Nombre: _____ Fecha: _____
 Género: (M) (F) Edad: _____ Ocupación: _____ Escolaridad: _____
 Domicilio: _____
 Teléfono Casa: _____
 Teléfono Celular: _____ No. Registro (Expediente): _____
 Otro: _____ No. Registro Protocolo: _____

Estatura (mts): _____ Peso (kg): _____ IMC: _____

Clasificación en la Escala de Kellgren-Lawrence:

Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Dudosa disminución del espacio intraarticular y posible formación de osteofitos	Disminución del espacio intraarticular acompañado de osteofitos	Disminución del espacio intraarticular, múltiples osteofitos y datos de esclerosis del contorno óseo	Marcada disminución del espacio intraarticular, grandes osteofitos, esclerosis y deformidad del contorno óseo

Grupo de Estudio: (Control) (PRP)

Rodilla a tratar: _____

Fecha de aplicación de Evaluaciones Clínicas (WOMAC, SF-12, EVA):

INICIO	3 MESES	6 MESES	12 MESES

Dolor después de las infiltraciones de PRP (si aplica):

Fecha de aplicación de Tratamiento con PRP (si aplica):

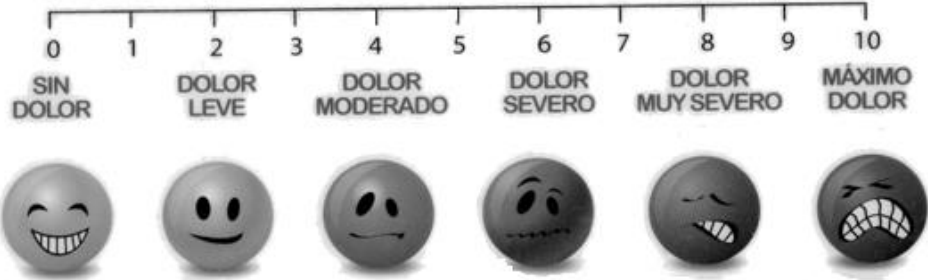
PRIMERA	SEGUNDA	TERCERA

PRIMERA	SEGUNDA	TERCERA
Ninguno	Ninguno	Ninguno
Leve	Leve	Leve
Moderado	Moderado	Moderado
Mucho	Mucho	Mucho

Evaluación de los criterios de Inclusión-Exclusión:

Criterios	Si	No	¿Cuál?
Mayor de 18 años			
Presentación de radiografías			
Tratamiento 1 mes previo al inicio del estudio			
Presenta algún padecimiento al inicio del estudio (Ej. Resfriado, Hipertensión, Diabetes)			
Presentó resultados de Biometría Hemática			

Escala Visual Análoga.



Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC) Osteoarthritis Index.

Fecha: _____ No. Registro Protocolo: _____

DOLOR.

¿Cuánto dolor siente?	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
Andar por terreno llano					
Subir y bajar escaleras					
Por la noche en la cama					
Sentado o acostado					
Al estar de pie					

RIGIDEZ.

¿Qué tanta es su rigidez?	Ninguna	Poca	Bastante	Mucha	Muchísima
Al despertar por la mañana					
El resto del día después de estar sentado o acostado descansando					

CAPACIDAD FUNCIONAL.

¿Qué tanta dificultad tiene?	Ninguna	Poca	Bastante	Mucha	Muchísima
Bajar escaleras					
Subir escaleras					
Levantarse después de estar sentado					
Estar de pie					
Agacharse para agarrar algo del suelo					
Andar por terreno llano					
Subir y bajar del carro					
Ir de compras					
Ponerse medias o calcetines					
Levantarse de la cama					
Quitarse medias o calcetines					
Estar acostado en la cama					
Meterse o salirse de bañar					
Estar sentado					
Sentarse y levantarse al ir al baño					
Hacer tareas domésticas pesadas (mover o levantar cosas pesadas)					
Hacer tareas domésticas ligeras (limpiar, barrer, cocinar)					

Su Salud y Bienestar (SF-12)

Esta encuesta le pide su opinión acerca de su salud. Esta información permitirá saber cómo se siente y qué tan bien puede hacer usted sus actividades normales. *¡Gracias por contestar estas preguntas!*

Por cada una de las siguientes preguntas, por favor marque con una la casilla que mejor describa su respuesta.

1. En general, usted diría que su salud es:

Excelente	Muy buena	Buena	Regular	Mala
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

2. Las siguientes frases se refieren a actividades que usted podría hacer durante un día normal. ¿Su estado de salud actual lo/la limita para hacer estas actividades? Si es así, ¿cuánto?

Sí, me limita mucho	Sí, me limita un poco	No, no me limita en absoluto
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

a Actividades moderadas, tales como mover una mesa, barrer, trapear, bailar, andar en bicicleta 1 2

b Subir varios pisos por la escalera 1 2

3. Durante las últimas cuatro semanas, ¿cuánto tiempo ha tenido usted alguno de los siguientes problemas con el trabajo u otras actividades diarias normales a causa de su salud física?

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Casi nunca	Nunca
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
a <u>Ha logrado hacer menos</u> de lo que le hubiera gustado	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
b Ha tenido limitaciones en cuanto al <u>tipo</u> de trabajo u otras actividades.....	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

4. Durante las últimas cuatro semanas, ¿cuánto tiempo ha tenido usted alguno de los siguientes problemas con el trabajo u otras actividades diarias normales a causa de algún problema emocional (como sentirse deprimido/a o ansioso/a)?

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Casi nunca	Nunca
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
a <u>Ha logrado hacer menos</u> de lo que le hubiera gustado	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
b Ha hecho su trabajo u otras actividades <u>con menos</u> cuidado de lo usual.....	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

5. Durante las últimas cuatro semanas, ¿cuánto le ha dificultado el dolor su trabajo normal (incluyendo tanto el trabajo fuera de casa como los quehaceres domésticos)?

Nada	Un poco	Más o menos	Mucho	Demasiado
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

6. Estas preguntas se refieren a cómo se ha sentido usted durante las últimas cuatro semanas. Por cada pregunta, por favor dé la respuesta que más se acerca a la manera como se ha sentido usted. ¿Cuánto tiempo durante las últimas cuatro semanas...

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Casi nunca	Nunca
a se ha sentido tranquilo/a y sosegado/a?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
b ha tenido mucha energía?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
c se ha sentido desanimado/a y deprimido/a?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

7. Durante las últimas cuatro semanas, ¿cuánto tiempo su salud física o sus problemas emocionales han dificultado sus actividades sociales (como visitar amigos, parientes, etc.)?

Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Casi nunca	Nunca
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

¡Gracias por contestar estas preguntas!

11.2. Técnicas y Protocolos Empleados

Preparación de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) con baja concentración de Leucocitos.

Para obtener 3 mL de PRP para infiltración intra-articular de rodilla:

1. Obtener 27 mL de sangre venosa, aproximadamente, distribuida en 6 tubos vacutainer con citrato de sodio 0.109 M como anticoagulante.
2. Centrifugar las muestras por 5 min a 1800 rpm.
3. Recolectar con pipeta automática o pasteur la capa de plasma de cada uno de los tubos cuidando de no remover la capa leucocitaria (línea blanca entre glóbulos rojos y plasma) en un tubo nuevo de 15 mL.
4. Centrifugar el plasma recolectado en el tubo de 15 mL por 3 min a 3200 rpm.
5. Retirar el plasma sobrenadante o plasma pobre en plaquetas de la parte superior del tubo con pipeta pasteur hasta dejar 3 mL en el fondo del tubo.
6. Resuspender cuidadosamente la pastilla de células formada en el fondo del tubo en el volumen restante (PRP).
7. Transferir el PRP a un tubo vacutainer de 10 mL (tapa roja).
8. El PRP se puede activar con gluconato de calcio al 10% en una relación de 150 μ L por cada mL de PRP.
9. El coágulo se forma en aproximadamente 10-15 min.
10. El PRP activado se puede recolectar centrifugando el coágulo formado durante 5 min a 4300 rpm.

NOTA: Para obtener 6 mL de esta formulación de PRP para los cultivos de explantes se obtiene a partir de 54 mL de sangre venosa en tubos vacutainer con citrato de sodio 0.109 M como anticoagulante.

Cuantificación de IL-1ra y TGF- β con ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

1. Se obtuvo una alícuota de cada PRP activado y se centrifugó a 4300 rpm durante 5 min una vez que el coágulo se había formado. Se recuperó el suero (o PRP activado [PRPa]) y se almacenó a -80°C hasta su análisis.
2. Preparar una serie de diluciones del estándar correspondiente (IL-1ra o TGF- β) para formar la curva de calibración (7 puntos más un blanco), las diluciones se prepararon a partir de una solución stock tomando 200 μ L de ésta y depositándolos en un tubo de 0.6 o 1.5 mL al cual previamente se le añadieron 200 μ L del diluyente calibrador.
3. Mezclar muy bien y tomar 200 μ L para realizar la siguiente dilución, esto se repite hasta tener 6 diluciones. El stock sirve como el punto de mayor concentración de la curva y el diluyente calibrador como el punto menos concentrado o cero.

4. A continuación se añaden 50 μ L del diluyente para el ensayo en cada uno de los pozos a utilizar, se agregan 50 μ L del estándar o muestra según corresponda, mezclando suavemente cada uno de los pocillos para asegurar una completa homogenización.
5. La totalidad de los pozos utilizados se cubre con la tira adhesiva (incluida en el estuche) para dejar incubando 2 h a temperatura ambiente.
6. A continuación, se aspira el contenido de cada pozo y se lavan 3 veces con el buffer de lavado (400 μ L).
7. Se añaden 100 μ L del conjugado para reconocer el antígeno en cada pozo, se cubre y se incuba nuevamente por 2 h a temperatura ambiente.
8. Se repiten los 3 lavados anteriormente mencionados y después se adicionan 100 μ L de la solución de sustrato en cada pozo.
9. Se incuba en oscuridad durante 30 min y se añaden 100 μ L de la solución stop en cada pozo mezclando cuidadosamente para asegurar que los reactivos se incorporaran correctamente.
10. Por último, se determina la densidad óptica de cada pozo en el lector de placas multi-modal Cytation3 (BioTek®) a 450 nm (se aplica una corrección de longitud de onda a 540 o 570 nm, al restar el valor de las lecturas a 540 o 570 nm de las lecturas a 450 nm).

NOTA: La determinación de IL-1ra se puede hacer directamente de la muestra de suero. En el caso de TGF- β , la muestra de suero tiene que ser activada previamente: a 40 μ L de suero/plasma añadir 20 μ L de HCl 1 N y mezclar. Incubar 10 min a temperatura ambiente. Neutralizar la muestra añadiendo 20 μ L de NaOH 1.2 N/HEPES 0.5 M y mezclar bien. Diluir la muestra calibrada con el Diluyente Calibrador antes del iniciar el ensayo.

Recolección y cultivo de explantes de cartílago.

1. Recolectar el tejido en gasa o compresa estéril dentro de una hielera lo más pronto posible después de haber sido retirado del paciente durante la cirugía en el quirófano.
2. Transportar el tejido al laboratorio inmediatamente.
3. Identificar las zonas del tejido de donde se realizará la obtención de los explantes (de acuerdo a la clasificación de Outerbridge; grado I, II, III o IV).
4. Con la ayuda de un OATS® (6-8 mm de diámetro) se realizan los cortes para obtener los explantes, tantos como se puedan obtener de acuerdo al grado de lesión deseado.
5. Con la ayuda de un bisturí separar el cartílago del hueso subcondral y colocar los discos de cartílago en un tubo de 50 mL con PBS 1X estéril (20-30 mL).
6. Retirar el PBS en el que se tienen los explantes con una pipeta de transferencia y lavar el cartílago con etanol al 70% (preparado con agua estéril) durante 30 seg (20-30 mL).

7. Retirar el etanol al 70% y lavar con PBS 1X estéril (20-30 mL). Realizar 3 lavados.
8. Retirar el PBS 1X y lavar con PBS 1X estéril con antibiótico y antimicótico (20-30 mL).
9. Retirar el PBS 1X con antibiótico y antimicótico y transferir los explantes a un nuevo tubo de 50 mL con PBS 1X estéril con antibiótico y antimicótico (20-30 mL). Los explantes se pueden mantener en esta solución hasta que se coloquen en el cultivo correspondiente.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA FRASCOS SPINNER

- Preparar el medio de cultivo el mismo día de la obtención de los explantes y del inicio del experimento.
- Se preparan 15 mL de medio de cultivo para cada frasco spinner de 25 mL; por cada 15 mL de medio de cultivo:
 - 13.5 mL de DMEM/F12
 - 1.5 mL de SBF o PRP activado (10% concentración final)
 - 9 µL de gentamicina (80 mg/mL; 50 µg/mL concentración final)
 - 6 µL de IL-1 β recombinante (50,000 pg/mL; 20 pg/mL concentración final)

NOTA: Colocar la misma cantidad de explantes en cada frasco spinner, dependiendo de los grupos de tratamiento y de los tiempos de análisis determinados (al menos 1 explante para análisis histológico y al menos 3 explantes para extracción de ARN total por cada grupo de tratamiento por cada tiempo de análisis).

Extracción de ARN total a partir de explantes de cartílago.

Procesar las muestras de inmediato de preferencia para llevar a cabo la extracción. De lo contrario, el cartílago se puede almacenar en PBS 1X estéril con antibiótico por 24-48 h a 4°C o en RNA later a 4°C por varios días o a -20°C por más tiempo.

NOTA: El cartílago almacenado en RNA later se hace rígido debido a que se deshidrata y es más difícil seccionarlo o disgregarlo.

Se pueden obtener buenos resultados en concentración y calidad partiendo de 150 mg de cartílago (peso húmedo).

1. Pesar las muestras de cartílago en tubos eppendorf estériles (peso húmedo).
2. Colocar el cartílago en placas petri de cultivo de 100 mm x 20 mm y agregar 500 µL de TRIzol sobre el tejido.
3. Seccionar el cartílago con un bisturí estéril en pequeños trozos (lo más pequeño posible), con el fin de lograr una disgregación mecánica casi completa.
4. Adicionar 1000 µL más de TRIzol al tejido disgregado y recuperar todo el volumen de TRIzol (1.5 mL aproximadamente) en un tubo de 2.0 mL.

5. Incubar 20 min en hielo.
6. Centrifugar a 11,000 rpm/4°C durante 10 min para retirar los restos celulares.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 2.0 mL y añadir 300 µL de cloroformo (200 µL por cada mL de TRIzol).
8. Agitar manualmente durante 30 seg e incubar en hielo durante 2 min.
9. Centrifugar durante 12 min a 11,000 rpm/4°C.
10. Transferir la fase acuosa a un tubo de 2.0 mL nuevo y añadir un volumen igual de TRIzol. Mezclar por inversión varias veces.
11. Incubar en hielo durante 30 min.
12. Agregar 200 µL de cloroformo, mezclar manualmente 30 seg e incubar en hielo por 2 min.
13. Centrifugar durante 12 min. a 11,000 rpm/4°C.
14. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 o 2.0 mL, agregar un volumen igual de isopropanol (600-700 µL) y mezclar por inversión varias veces.
15. Incubar en hielo por 5 min.
16. Centrifugar durante 20 min a 14,000 rpm/4°C.
17. Retirar el sobrenadante, agregar 1 mL de etanol al 70% y agitar vigorosamente.
18. Centrifugar durante 5 min a 8,000 rpm/4°C.
19. Retirar el sobrenadante, remover cualquier residuo de líquido con la ayuda de una micropipeta de 10-100 µL, cuidando de no tocar el pellet de RNA.
20. Dejar secar el pellet de RNA a temperatura ambiente con la tapa del tubo abierta (10-15 min aproximadamente).
21. Para disolver el pellet de RNA, añadir de 20-25 µL de agua DEPC estéril o agua libre de nucleasas e incubar las muestras a temperatura ambiente por 5 min.
22. Mezclar bien, cuantificar y almacenar a -80°C.

Síntesis de ADNc a partir de ARN total de cartílago (M-MLV; Invitrogen).

Se pueden obtener buenos resultados partiendo de 50-100 ng de ARN total.

1. Preparar la reacción de la siguiente forma:

<i>Tubo 1</i>	<i>1X (volumen)</i>
Random primers	1.0 µL
Agua DEPC	5.5 µL*
ARN	5.0 µL*
<i>Total</i>	<i>11.5 µL</i>

* El volumen de estos dos reactivos se puede ajustar de acuerdo a la concentración de ARN de cada muestra.

<i>Tubo 2</i>	<i>1X (volumen)</i>
Buffer 5X	4.0 µL
DTT	2.0 µL
RNase out	0.5 µL
dNTP's 10 Mm	1.0 µL
M-MLV	1.0 µL
<i>Total</i>	<i>8.5 µL</i>

2. Incubar Tubo 1 por 10 min a 72°C (se puede hacer en termomixer).
3. Incubar Tubo 1 por 3 min en hielo.
4. Adicionar contenido de Tubo 2 al Tubo 1 (volumen total de la reacción: 20.0 µL).
5. Incubar 10 min a 25°C.
6. Incubar 60 min a 37°C.
7. Incubar 5 min a 94°C.
8. Incubar 10 min a 4°C.

NOTA: Los pasos del 5 al 8 se pueden realizar en un termociclador de punto final.

Preparación de reacciones para análisis por qPCR utilizando sondas TaqMan.

Preparación de curva estándar para determinar eficiencia de amplificación.

1. Construir una curva con al menos 5 puntos de diferentes concentraciones a partir de diluciones seriadas de ADNc de cartílago: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625.
2. Se consideró al ADNc sin diluir como el punto más concentrado de la curva.
3. Preparar las reacciones de la siguiente forma:

<i>Reactivo</i>	<i>1X (volumen)</i>
Master Mix 2X	5.0 µL
Sonda TaqMan 20X	0.5 µL
ADNc (diluido)	2.0 µL
Agua (libre de nucleasas)	2.5 µL
<i>Total</i>	<i>10.0 µL*</i>

* El volumen final de la reacción recomendado por el fabricante es de 20.0 µL; sin embargo se obtienen buenos resultados llevando las reacciones a un volumen final de 10.0 µL.

4. Correr las reacciones (al menos por duplicado) en el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System.
5. Una vez obtenidos los ciclos de amplificación (C_T) de cada uno de los puntos, calcular el promedio de los valores.
6. Por otro lado, calcular el logaritmo del valor de la dilución dividido entre el logaritmo de 2 ($\frac{\text{Log dilución}}{\text{Log } 2}$).
7. Graficar los valores obtenidos en los puntos 5 y 6 en una hoja de Excel (gráfico de líneas) y obtener la línea de tendencia y la ecuación de la recta.
8. Para determinar la eficiencia de amplificación, elevar $2^{(-1/\text{valor de X en la ecuación de la recta})}$. Por ejemplo, si el valor de X en la ecuación de la recta de -0.9649, entonces la eficiencia de amplificación se calculará $2^{(-1/-0.9649)}$, osea $2^{(1.037)}$, y esto será igual a 2.05.
9. El valor que se busca en la eficiencia de amplificación de los genes a evaluar se busca que sea lo más cercano a 2 y/o que los valores sean muy similares entre el gen blanco (target) y el gen normalizador (endógeno).

Preparación de las reacciones de las muestras experimentales a evaluar mediante qPCR.

1. De las curvas de amplificación antes previamente realizadas, elegir la concentración (o punto de dilución) en el cual se obtiene una adecuada curva de amplificación (por ejemplo, $C_T > 18$ y < 30).
2. Preparar los ADNc de cada una de las muestras de ARN total y realizar la dilución seleccionada de los ADNc.
3. Preparar las reacciones de la siguiente forma:

<i>Reactivo</i>	<i>1X (volumen)</i>
Master Mix 2X	5.0 μ L
Sonda TaqMan 20X	0.5 μ L
ADNc (diluido)	2.0 μ L
Agua (libre de nucleasas)	2.5 μ L
<i>Total</i>	<i>10.0 μL*</i>

* El volumen final de la reacción recomendado por el fabricante es de 20.0 μ L; sin embargo se obtienen buenos resultados llevando las reacciones a un volumen final de 10.0 μ L.

4. Correr las reacciones (al menos por triplicado) en el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System.
5. Una vez obtenidos los ciclos de amplificación (C_T) de cada uno de las muestras, calcular el $\Delta\Delta C_T$ normalizando con el(los) endógeno(s) elegido(s).

NOTA: Para el 7500 Fast Real-Time PCR System, las reacciones se deben de preparar en tubos o placas con pocillos con una capacidad de 100 μ L.

Desparafinar cortes de explantes de cartílago.

1. Incubar las laminillas con los cortes a 56°C por 30 min (puede ser hasta 1 o 2 h).
2. Hidratar los cortes en las siguientes soluciones:
 - Xilol (2 cambios) 5 min.
 - Etanol absoluto 3 min.
 - Etanol 95 % 3 min.
 - Etanol 70 % 3 min.
 - Agua destilada 3 min.

Tinción histoquímica con safranina-O/verde rápido.

Procedimiento para cortes de explantes de cartílago.

1. Desparafinar e hidratar cortes hasta agua destilada.
2. Teñir núcleos con hematoxilina férrica (5 min).

3. Lavar con agua corriente (8 min).
4. Teñir con verde rápido al 0.02% (6 min).
5. Colocar en ácido acético acuoso al 1% (10 seg).
6. Teñir con safranina-O acuosa al 0.1% (5 min).
7. Deshidratar con alcoholes 95% y 100% (2 min c/u).
8. Aclarar con xilol, 2 cambios (2 min).
9. Montar con resina.

REACTIVOS

Safranina-O 0.1%
 0.1 gr de safranina-O
 Llevar a 100 mL de agua

Ácido acético 1%
 1 mL de ácido acético glacial
 Llevar a 100 mL de agua

Verde rápido 0.02%
 0.02 gr de verde rápido
 Llevar a 100 mL de agua

Tinción histoquímica con tricrómico de Masson.

Procedimiento para cortes de explantes de cartílago.

1. Desparafinar e hidratar cortes hasta agua destilada.
2. Colocar en solución fijadora de Bouin (60 min a 60°C o a T.A. toda la noche).
3. Lavar con agua corriente hasta perder color amarillo.
4. Enjuagar con agua destilada unos segundos.
5. Teñir núcleos con hematoxilina férrica (10 min).
6. Lavar con agua corriente (10 min).
7. Lavar con agua destilada hasta que deje de teñirse.
8. Colocar en solución de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico (10 min).
9. Sumergir en agua destilada.
10. Teñir con azul de anilina (5 min).
11. Lavar con agua destilada hasta que deje de teñirse.
12. Inmersión de 15 segundos en ácido acético acuoso al 1%.
13. Deshidratar en alcoholes 95%, 100% y alcohol/xilol (15 seg c/u).
14. Aclarar con dos cambios de xilol (15 seg c/u).
15. Montar con resina.

REACTIVOS

Solución fijadora de Bouin.
 37.5 mL de solución saturada de ácido pícrico
 12.5 mL de formaldehído (37%)
 2.5 mL de ácido acético glacial

Azul de Anilina.
 2.5 gr de azul de anilina
 2.0 mL de ácido acético glacial
 Llevar a 100 mL de agua

Ácido clorhídrico 1N.

8.3 mL de HCl concentrado

Llevar a 100 mL de agua

Tinción inmunohistoquímica de colágeno tipo I y tipo II.

Previamente, fijar los tejidos en formaldehído al 10% en PBS pH 7.2-7.4 por al menos 24 h. Procesar por la técnica histológica e incluir en parafina. Usar cortes histológicos de 5 µm.

1. Desparafinar los cortes y llevar hasta agua.
2. Colocar los cortes en solución Tris-buffer salino + tween 20 (TBST) por 3 min.
3. Exponer los antígenos con solución TRS 60 min a 100 °C en baño húmedo (20 min solución TRS sola, 20 min solución + laminillas y 20 min de enfriamiento en agua destilada).
4. Lavar en solución buffer TBST por 3-5 min.
5. Bloquear la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% e incubar 10 min a temperatura ambiente.
6. Lavar en solución buffer TBST por 3-5 min.
7. Bloquear las proteínas, incubar 30 min a 37°C en cámara húmeda.
8. Lavar en solución buffer TBST por 3-5 min.
9. Añadir el anticuerpo primario e incubar toda la noche a 4°C (en cámara húmeda, cubrir la zona a la que se le añadió el anticuerpo con un trozo de papel parafilm).
10. Lavar en solución buffer TBST por 3-5 min.
11. Añadir el anticuerpo secundario e incubar 30 min a 37°C en cámara húmeda.
12. Lavar en solución buffer TBST por 3-5 min.
13. Añadir la solución de estreptavidina-HRP e incubar 15 min a 37°C en cámara húmeda.
14. Lavar en solución buffer TBST por 3-5 min.
15. Revelar con solución de sustrato (10 gotas)-cromógeno (1 gota) e incubar 10 min a temperatura ambiente.

CONTRATINCIÓN

1. Lavar en agua destilada por 2 min (3 veces).
2. Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 1 a 2 min (20 seg si la hematoxilina es muy reciente).
3. Lavar en agua corriente por 3 min.
4. Enjuagar en agua destilada por 3 min.
5. Deshidratar gradualmente con (3 min. c/u):
 - a. Etanol 70% (2 cambios).
 - b. Etanol 95%, (2 cambios).
 - c. Etanol 100% (2 cambios).
 - d. Xilol (2 cambios).

6. Limpiar el exceso de xilol.
7. Montar con resina y almacenar los cortes en oscuridad.

Cuantificación de células o tejido teñido con ImageJ.

1. Ajustar la escala de la imagen a micrómetros (todas las imágenes deberán contar con escala).
2. Abrir el archivo de la imagen que se desea analizar (File → Open).
3. Se puede magnificar la zona de la imagen donde se encuentra la escala usando las teclas “+” o “-“, o el comando “Magnifying glass” de la barra de comandos hasta que la escala quede de un tamaño lo suficientemente grande.
4. Seleccionar el comando “Straight” y dibujar una línea sobre la línea de la escala (la línea dibujada debe de ser del mismo largo).
5. Seleccionar el menú Analyze → Set Scale. En el recuadro que aparece, modificar el parámetro “Known distance” con el valor de la escala de la imagen (50, 100, 200, etc.). Modificar el parámetro “Unit of length” colocando las letras “um” (micrómetros) y dar click en OK.
6. A continuación seleccionar el menú Image → Type → RGB Stack para dividir la imagen en los canales rojo, verde y azul.
7. Para visualizar la imagen en los 3 canales al mismo tiempo seleccionar Image → Stacks → Make Montage. De esta forma se puede determinar en qué canal se aprecia un mejor contraste entre lo teñido/marcado y el resto.
8. Seleccionar la imagen desplegada por RGB Stack en el canal deseado y presionar “Shift + T”. Aparecerá el recuadro “Threshold”.
9. Ajustar el umbral manualmente moviendo el “slider” de abajo hasta que aparezca en rojo solo la marca deseada (aprox. 175).
10. A continuación se borra la escala de la imagen encerrándola en un recuadro dando click en el comando “Rectangular” y eliminarlo con la tecla “backspace” (quedará un recuadro blanco). En caso contrario ir a Image → Color → Color Picker.
11. Para analizar las zonas coloreadas dar click en el menú Analyze → Set Measurements y palomear solo las casillas “Area”, “Area fraction”, “Limit to threshold” and “Display label”. Dar click en OK.
12. Regresar al menú Analyze → Measure. Se mostrará el recuadro de resultados con los valores del área y el porcentaje correspondiente.
13. Repetir para todas las imágenes a analizar.