



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina i Cirurgia Animals

Facultat de Veterinària

LA TERÀPIA DE LESIONS DE TEIXITS BLANS I ARTICULACIONS AMB
PLASMA RIC EN PLAQUETES EN CAVALLS D'ESPORT: EVIDÈNCIES
CLÍNiques I BIOQUÍMIQUES QUE VALIDEN EL SEU EMPRAMENT

LA TERAPIA DE LESIONES DE TEJIDOS BLANDOS Y ARTICULACIONES
CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN CABALLOS DE DEPORTE:
EVIDENCIAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS QUE VALIDAN SU UTILIZACIÓN

PhD Thesis

Isidro Abellanet de Oleza
Barcelona, 2009

Departament de Medicina i Cirurgia Animals

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

LA TERÀPIA DE LESIONS DE TEIXITS BLANS I ARTICULACIONS AMB
PLASMA RIC EN PLAQUETES EN CAVALLS D'ESPORT: EVIDÈNCIES
CLÍNiques I BIOQUÍMIQUES QUE VALIDEN EL SEU EMPRAMENT

LA TERAPIA DE LAS LESIONES DE TEJIDOS BLANDOS Y ARTICULACIONES
CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN CABALLOS DE DEPORTE:
EVIDENCIAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS QUE VALIDAN SU UTILIZACIÓN

Memòria presentada per

Isidro Abellanet de Oleza

Per a optar al Grau de

Doctor en Veterinària

Barcelona, Abril 2009

Dirigida per

Marta Prades i Robles

Editor: Isidro Abellanet

Primera edición: agosto de 2009

Depósito Legal: PM. 2044 - 2009

ISBN-13: 978-84-692-5134-8

Nº REGISTRO: 09/83166

Impresión y encuadernación: Impresrapit S.L.

Printed in Spain - Impreso en España

Marta Prades i Robles, Professora Titular del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que la tesi doctoral que porta per títol: "La teràpia de lesions de teixits blans i articulacions amb plasma ric en plaquetes en cavalls d'esport: evidències clíniques i bioquímiques que validen el seu emprament", de la qual és autor el llicenciat en Veterinària Isidro Abellanet de Oleza, s'ha realitzat sota la seva direcció.

I per que així consti, a efectes de ser presentada com treball de Tesi per optar al Grau de Doctor en Veterinària, signa el present certificat a Bellaterra, el 23 d'abril de 2007.

Marta Prades i Robles

Per a tots

Bonhomia i lliure pensament

1. MOTIVACIÓN	25
2. DE UNA MEDICINA REPARATIVA A UNA MEDICINA REGENERATIVA	26
2.1. La terapia reparativa en tendones y ligamentos	26
2.2. La terapia reparativa en articulaciones	26
2.3. Hacia una medicina regenerativa	27
2.4. Ingeniería tisular. Aproximaciones terapéuticas	28
2.5. Primera aproximación. Biomateriales, soportes estructurales	29
2.6. Segunda aproximación. Señales. Factores de crecimiento	30
2.7. Tercera aproximación. Células madre	34
2.8. Terapia génica	37
2.9. Terapia de ondas de choque. Shockwave Therapy (SWT)	39
2.10. Plasma Rico en Plaquetas	41
2.11. Comentario	47
2.12. Referencias bibliográficas	48
3.OBJETIVOS	59

1.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	63
1.1.1. Epidemiología	65
1.1.2. Tendones y ligamentos. Definición y funciones	65
1.1.3. Diferencias estructurales asociadas a la función	66
1.1.4. Estructura básica común	66
1.1.5. Control de la homeostasis del tendón	69
1.1.6. Patogenia de la lesión. Teorías. Implicaciones prácticas.	69
1.1.7. Motivos para utilizar el PRP en tejidos blandos	72
1.1.8. Referencias bibliográficas	73

1.2. ESTUDIOS CLÍNICOS	79
1.2.1. Tendón flexor digital superficial	81
1.2.1.1. Introducción	83
1.2.1.2. Material y métodos	84
1.2.1.3. Resultados	90
1.2.1.4. Discusión	103
1.2.1.5. Conclusiones	107
1.2.1.6. Referencias bibliográficas	109
1.2.2. Tendón flexor digital profundo	111
1.2.2.1. Introducción	113
1.2.2.2. Material y métodos	115
1.2.2.3. Resultados	118
1.2.2.4. Discusión	124
1.2.2.5. Conclusiones	125
1.2.2.6. Referencias bibliográficas	126
1.2.3. Ligamento accesorio del tendón flexor digital profundo	129
1.2.3.1. Introducción	113
1.2.3.2. Material y métodos	131
1.2.3.3. Resultados	134
1.2.3.4. Discusión	137
1.2.3.5. Conclusiones	138
1.2.3.6. Referencias bibliográficas	139
1.2.4. Ligamento suspensor	141
1.2.4.1. Introducción	143
1.2.4.2. Material y métodos	145
1.2.4.3. Resultados	149
1.2.4.4. Discusión	156
1.2.4.5. Conclusiones	158
1.2.4.6. Referencias bibliográficas	159
CAPÍTULO 2. ARTICULACIONES	163
2.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	165
2.1.1. Bases anatómicas y fisiológicas de las articulaciones sinoviales	167
2.1.2. Fisiopatología de la osteoartritis	172
2.1.3. Homeostasis y biopatología de la osteoartritis	174
2.1.4. Manifestaciones clínicas de la osteoartritis	181
2.1.5. Reparación del cartílago por mecanismos naturales. Pronóstico	183
2.1.6. Motivos para utilizar el PRP en las articulaciones	184

2.2. ESTUDIOS CLÍNICOS	185
2.2.1. Articulaciones	187
2.2.1.1. Material y métodos	189
2.2.1.2. Resultados	193
2.2.1.3. Discusión	194
2.2.1.4. Conclusiones	195
2.2.1.5. Referencias bibliográficas	196

CAPÍTULO 3. BIOMARCADORES **207**

3.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	209
3.1.1. Introducción	211
3.1.2. Objetivos	215
3.2. ESTUDIOS CLÍNICOS EN TEJIDOS BLANDOS Y ARTICULACIONES	217
3.2.1. Material y métodos	219
3.2.1.1. Determinaciones analíticas. Técnicas utilizadas y análisis de factores que pueden influir en los resultados.	220
3.2.1.2. Determinación de los GAGs	220
3.3.1.2.1. Estudio de termolabilidad de los GAGs	221
3.2.1.3. Determinación de la COMP	222
3.2.1.4. Determinación del ácido hialurónico (AH)	222
3.2.1.5. Curvas patrón	223
3.2.1.6. Influencia del ejercicio y la edad en los niveles de los GAGs y la COMP	223
3.2.2. Resultados	224
3.2.2.1. Determinación de los GAGs en suero y líquido sinovial	224
3.2.2.2. Determinación de la COMP en suero y líquido sinovial	228
3.2.2.3. Valoración de los efectos de una segunda dosis de PRP sobre las concentraciones de los GAGs y la COMP	231
3.2.2.4. Estimación de la duración de los efectos de una dosis de PRP sobre las concentraciones de los GAGs y la COMP	231
3.2.2.5. Determinación del AH en suero y líquido sinovial	236

3.2.3. Discusión	239
3.2.3.1. GAGs	239
3.2.3.2. COMP	239
3.2.3.3. AH	240
3.2.3.4. El concepto de dosis y pauta de administración del PRP	240
3.2.4. Referencias bibliográficas	241
3.2.5. Agradecimientos	245

CONCLUSIONES GENERALES. GENERAL CONCLUSIONS

247

LISTA DE ACRÓNIMOS

A	Articulación
AAEP	<i>American Association of Equine Practitioners</i>
ADAM	<i>a Desintegrin and Metaloproteinase</i>
ADAMTS	<i>ADAM with Thrombospondin Type 1 Motif</i>
AH	Ácido Hialurónico
AINES	Antiinflamatorio No Esteroideo
AMO	Aspirado de Médula Ósea
b-FGF	<i>basic-Fibroblast Growth Factor</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CLS	Cuerpo del Ligamento Suspensor
COL	Colágeno
COMP	Proteína de la Matriz Oligomérica Cartilaginosa
CRA	Cambios Radiológicos Articulares
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FC	Factor de Crecimiento
GAGs	Glicosaminoglicanos
GDF	<i>Growth/ Differentiation Factor</i>
HA	Hialuronano
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
icIL-1ra	IL-1ra intracelular
IFN γ	Inhibidor del Factor de Necrosis γ
IGF-I	<i>Insulin like Growth Factor-I</i>
IL-1	Interleuquina-1
IL-1ra	Antagonista de los Receptores de IL-1
LATFDP	Ligamento Accesorio del TFDP
LP	Lesión en los Polos de la Sección Transversal del TFDS
LS	Ligamento Suspensor
LUC's	<i>Large Unstained Cells</i>
MCP	Metacarpo Falangiana (articulación)
MEC	Matriz Extra Celular
MMP	Metaloproteinasas de la Matriz
MO	Médula Ósea
mTORC1	<i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 1</i>
MTP	Metatarso Falangiana (articulación)
NAP	Nivel Atlético Previo
ND	Número de Dosis de PRP
NO	Óxido Nítrico
OA	Osteoartritis
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PG	Proteoglicanos
PGA	Ácido Poliglicólico
PGE2	Prostaglandina E2

PIA	Presión Intra Articular
PL	Plaquetas Liofilizadas
PLA	Ácido Poliláctico
PM	Peso Molecular
PPLS	Parte Proximal del Ligamento Suspensor
PPP	Plasma Pobre en Plaquetas
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
PSI	Pura Sangre Inglés
R	Recaídas
RLS	Rama del Ligamento Suspensor
sIL-1ra	IL-1ra secretada
t50%CatII	Tiempo necesario para que 50% de la muestra evolucione a Cat.II
t90%CatII	Tiempo necesario para que 90% de la muestra evolucione a Cat.II
TB	Tejidos Blandos
TEDC	Tendón Extensor Digital Común
TFDP	Tendón Flexor Digital Profundo
TFDS	Tendón Flexor Digital Superficial
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TH	Tirosina Hidroxilasa
TIMP	Inhibidor tisular de MMP
TKR	<i>Tirosine-Kinase Receptors</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
UBM	<i>Urinary Bladder Matrix</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

RESUMEN
SUMMARY

RESUMEN

Introducción: Existen evidencias científicas que validan la eficacia in vitro del PRP sobre el metabolismo de los tenocitos y condrocitos, pero hay muy pocos estudios in vivo que muestren este efecto metabólico positivo sobre los tejidos blandos y articulaciones y que hagan uso de los biomarcadores para la monitorización de los efectos clínicos del PRP.

Objetivos: a) Evaluar la progresión clínica de las lesiones de distintos tejidos blandos (TFDS, TFDP, LATFDP, y LS) y articulaciones con OA tratados con inyecciones intralesionales e intraarticulares de PRP, b) Documentar los resultados en términos de porcentajes de recuperación del nivel atlético previo (NAP) y de recaídas (R) en los grupos tratados en comparación con los respectivos grupos control, c) Evaluar los efectos de la administración del PRP en tejidos blandos y articulaciones sobre algunos biomarcadores (GAGs, COMP y AH), d) Obtener las conclusiones que orienten un protocolo de tratamiento y e) Evaluar la inocuidad del tratamiento de las lesiones de tejidos blandos y articulaciones con PRP obtenido por el método de tubo y doble centrifugación.

Material y métodos: Durante un periodo de 4 años (2004 a 2008) se ha evaluado la terapia con PRP sobre una población de 191 caballos que presentaban lesiones de tejidos blandos (72 caballos con lesiones del TFDS, 61 agudas y 11 crónicas; 10 del TFDP, 9 agudas y 1 crónica; 7 del LATFDP, 6 agudas y 1 crónica; 36 del LS: 11 de la PPLS, 7 agudas y 4 crónicas, 6 del CLS, 4 agudas y 2 crónicas y 19 de las RLS, 7 agudas y 12 crónicas) y articulaciones (42 caballos); otros 24 caballos, con diversas lesiones de tejidos blandos (TB) y articulaciones (A), se han utilizado para estudiar los efectos del PRP sobre los biomarcadores. Los grupos control se constituyeron con 9 caballos con lesiones del TFDS, 3 agudas y 6 crónicas; 4 del TFDP, 2 agudas y 2 crónicas; 3 del LATFDP, 1 aguda y 2 crónicas; 16 del LS: 9 del PPLS, 5 agudas y 4 crónicas, 2 del CLS, 1 aguda y 1 crónica, 5 de las RLS, todas crónicas. Todos los grupos estaban predominantemente integrados por caballos trotadores de carreras y algunos de salto, doma y recreo. Se realizó un examen de cojera de todos los caballos, incluyendo bloqueos anestésicos, radiografías digitales y ecografías. Las lesiones de los TB se clasificaron en 6 categorías (escala Rantanen) y las lesiones de las A según los signos clínicos, cronicidad y cambios radiológicos clásicos de la OA. Los pacientes se reexaminaron a los 15, 30, 45 días, 2 meses y 4 meses y se realizó un seguimiento a lo largo de 1 ½ a 3 ½ años. La preparación del PRP se realizó manualmente por el sistema de tubo y doble centrifugación; se registraron los recuentos plaquetarios. Se utilizaron métodos de análisis estadísticos según cada caso (Paired T-test, T-Test, Wilcoxon, Kruskal-Wallis) y ANOVA para evaluar la influencia de los factores "lesión aguda/crónica" (A/C), "lesión en los polos de la sección del TFDS" (LP), "categoría ecográfica de las lesiones" (CATL) de los tejidos blandos, "cambios radiológicos articulares" (CRA) y "número de dosis de PRP" (ND). Se consideró significativo un $p < 0,05$.

Resultados: Todos los caballos tratados progresaron significativamente mejor que (vs) los grupos control y mejoraron los porcentajes obtenidos con la medicina reparativa y

documentados en la literatura, tanto en lo que concierne a la recuperación del nivel atlético previo (NAP) como a las recaídas (R). Para el TFDS: NAP, 75,7-79,5% vs 40-50%; R, 20-24% vs 43-93%. Para el TFDP: NAP, 100% vs 0%; R, 16,6%. Para el LATFDP: NAP, 100% vs 44%; R, 0% vs 16%. Para el LS: NAP, 100%; R, 22,2%. Para las articulaciones: NAP, 70-75% vs 0% grupo control casos crónicos; R, 9,5-33%. En el caso de los TB, el factor A/C no afectó al resultado del tratamiento; los factores LP, CATL y ND afectaron significativamente al tiempo de recuperación del NAP (t50%CatII y t90%CatII) y al porcentaje de R. En el caso de las articulaciones, el factor CRA influyó significativamente los porcentajes de NAP y R. Los recuentos plaquetarios oscilaron entre 94.10^3 y 289.10^3 con media= $160,9.10^3 \pm 38,4.10^3$ SD, pero este factor no tuvo influencia en los resultados. La administración intrasinovial (articular o tendinosa) de PRP estimula la síntesis de GAGs, que se refleja con un incremento significativo de su concentración, detectable en el suero y líquido sinovial. Este estímulo tiene una duración aproximada de 14 ± 5 días. La administración de PRP provoca una disminución de la COMP degradada, que se refleja con una disminución significativa de su concentración detectable en el suero y en el líquido sinovial. Se han administrado 358 dosis de PRP y no se han observado reacciones adversas.

Discusión: Los resultados de este estudio clínico indican una mejoría de los índices de recuperación del NAP y de R, cuando se comparan con otros estudios clínicos orientados al pronóstico. El estudio de los biomarcadores refleja un balance metabólico anabólico. Todo ello contribuye a validar la utilización del PRP como modalidad de tratamiento regenerativo.

Conclusiones: El PRP constituye un tratamiento seguro, efectivo que alivia el dolor y estimula la curación de los TB y A, tal como han evidenciado los exámenes de cojera, los parámetros clínicos y los resultados deportivos. Se recomiendan 2 ó más dosis de PRP para la mayoría de la lesiones, administradas en intervalos de 15 días.

SUMMARY

Introduction: There is in vitro scientific evidence that proves the efficacy of PRP on tenocyte and chondrocyte metabolism, but there are very few in vivo studies that validate this positive metabolic effect on soft tissue structures and joints and none to our knowledge using biomarkers to monitor the effects of treatment.

Objectives: a) Evaluate clinical progression of different soft tissue injuries (SDFT, DDFT, ALDDFT, and SL) and OA affected joints treated by intra lesional or intra-articular PRP injection, b) Document results in terms of rate of return to competition or previous level of performance (RC/PLP) and rate of re injury (R) when compared with control groups, c) Evaluate the effects of PRP administration on certain biomarkers (GAGs, COMP and HA), d) Obtain information that may lead to a more objective treatment protocol, e) Evaluate safety of treatment of soft tissue and joint injuries with PRP obtained by the tube method and double centrifugation.

Materials and methods: During a 4 year period (2004 a 2008) a clinical study evaluating the effects of PRP therapy has been conducted in a population of 191 horses that were presented with soft tissues (72 horses with SDFT, 61 acute y 11 chronic; 10 of DDFT, 9 acute and 1 chronic; 7 ALDDFT, 6 acute y 1 chronic; 36 of the SL: 11 proximal SL, 7 acute and 4 chronic, 6 of the body of the SL, 4 acute and 2 chronic, and 19 of the branches of the SL, 7 acute and 12 chronic) and joints (42 horses) problems; another 24 horses, with various soft tissue and joint lesions were used to study the effects of PRP administration on 3 biomarkers. The control groups were formed of 9 horses with SDFT, 3 acute and 6 chronic; 4 of the DDFT, 2 acute and 2 chronic; 3 of the ALDDFT, 1 acute and 2 chronic; 16 of the SL: 9 proximal LS, 5 acute and 4 chronic, 2 of the body of the SL, 1 acute and 1 chronic, 5 of the branches of the SL, all chronic. All groups were formed by predominantly trotters, and then show-jumpers, dressage horses and pleasure riding horses. A complete lameness examination was performed in all horses, including digital radiography, ultrasonographic exams and nerve and joints blocks every time it was deemed necessary. Soft tissue injuries were classified on a scale from 0 to 6 according to Rantanen, and the joints were classified according to loss of function, chronicity and presence of classic OA radiographic changes. Patients were reexamined at 15, 30, 45 days, 2 months and 4 months with rechecks up to 1 ½ and 3 ½ years. PRP preparation was done manually with the tube method and double centrifugation. Platelet counts were registered in all cases.

Statistical analysis: Different tests were used as needed: Paired T-test, T-Test, Wilcoxon, Kruskal-Wallis, or an ANOVA to test the influence of the factors "acute lesion vs chronic" (A/C), "location of lesion at the poles of the SDFT cross-section" (PL), soft tissue ultrasonographic lesion category (LCAT), presence of joint radiographic changes (JRC), number of PRP administrations (NA). Level of significance was set at $p < 0,05$.

Results: All treated horses progressed significantly better than controls and also better than what has been reported in the literature with reparative medicine, both in rate of return to competition (RC/PLP) and in rate of re injury (R). For the SDFT: RC/PLP, 75,7-79,5% vs 40-50%; R, 20-24% vs 43-93%. For the DDFT: RC/PLP, 100% vs 0%; R, 16,6%. For the ALDDFT: RC/PLP, 100% vs 44%; R, 0% vs 16%. For the LS: RC/PLP,100%; R, 22,2%. For the joints: RC/PLP, 70-75% vs 0% control group of chronic cases; R, 9,5-33%. When considering soft tissues, the factor (A/C) did not affect the result of treatment; the factors (PL), (LCAT) and ND significantly affected time needed by 50% and 90% of cases to reach ultrasonographic cathegory II (t50%CatII and t90%CatII), time of recovery of RC/PLP as well as rate of R. In the case of the joints, presence of (JRC) significantly affected RC/PLP and R. Platelet counts ranged from 94.10^3 to 289.10^3 with a median of $160,9.10^3 \pm 38,4.10^3$ SD, but this did not influence results significantly. Intra synovial injection (joint and tendon sheath) of PRP stimulates GAG synthesis which is reflected by a significant increase of their concentration in serum and in synovial fluid. This is observed for approximately 14 ± 5 days. Following PRP administration, degraded COMP concentrations decrease both in serum and in synovial fluid. A total of 358 injections of PRP were performed with no adverse effects noted.

Discussion: The results of this clinical study indicate an improvement of the rates of return to previous athletic level and a decrease in rate of re injury when compared to retrospective clinical studies looking at prognosis. The study of the effects on biomarkers concentrations in relation to treatment shows an anabolic balance. Both these observations support the use of PRP.

Conclusions: PRP therapy is a safe treatment option that alleviates pain and stimulates soft tissue and joint healing, evidenced by improvement in lameness scores, clinical signs and performance results. At least 2 or more dosages of PRP are recommended for the majority of lesions with at least 15 day intervals.

INTRODUCCIÓN

1. MOTIVACIÓN

IMPORTANCIA DE LAS LESIONES MUSCULOESQUELÉTICAS

Los estudios epidemiológicos demuestran que las lesiones musculoesqueléticas son una de las causas más importantes de un rendimiento deportivo pobre o de la retirada prematura de los caballos de la competición. Se sabe que, considerando todos los tipos de caballos de deporte en su conjunto, las cojeras aparecen con más frecuencia en la extremidad anterior que en la posterior (60% vs. 40%), probablemente debido a que el centro de gravedad del caballo está situado más cerca de las extremidades anteriores^{1,2}. De hecho, en aquellas especialidades deportivas en las que los caballos arrastran alguna carga (*sulky*, coche, etc), el porcentaje de lesiones en los remos anteriores y posteriores cambia algo (55% vs 45% en trotadores de carreras; *standardbreds*) debido al desplazamiento del centro de gravedad en sentido caudal. También se observa un incremento de las lesiones que afectan a los remos posteriores en los caballos de salto y doma debido a los esfuerzos de reunión y propulsión. En general, en la extremidad anterior, hasta el 95% de las lesiones se localizan en las partes anatómicas distales al carpo^{1,2} y, entre estas, casi la mitad (46%) corresponden a lesiones de tejidos blandos (TB): ligamento suspensor (LS), tendón flexor digital superficial (TFDS), tendón flexor digital profundo³ (TFDP).

Aparte de las lesiones de los tejidos blandos, el otro gran capítulo que integra el conjunto de lesiones musculoesqueléticas se refiere a la patología articular. Algunos estudios señalan que el 60% de las cojeras están relacionadas con la osteoartritis (OA)⁴.

El impacto sobre la economía y las expectativas lúdicas de los propietarios es enorme.

Ante este panorama, existe un gran interés social por los resultados de las investigaciones que se están realizando en el campo de la medicina regenerativa.

2. DE UNA MEDICINA REPARATIVA A UNA MEDICINA REGENERATIVA

LA TERAPIA REPARATIVA EN TENDONES Y LIGAMENTOS

Algunos tratamientos básicos de la medicina reparadora que se aplica actualmente a los tendones y ligamentos ya fueron mencionados en 1964 por Asheim⁵ e incluían la flebotomía, la aplicación de frío local, el vendaje escayolado y el reposo; hoy día, se mantiene la aplicación de frío en algunas fases del tratamiento, el vendaje y el reposo. Durante las últimas cuatro décadas se han ensayado numerosos tratamientos y pocos, si cabe alguno, han evidenciado una eficacia superior al simple reposo prolongado⁶. Con esta metodología sólo el 40-50 % de los caballos vuelve a la competición y las recaídas, según las modalidades deportivas, pueden fluctuar desde el 43% al 93%^{7-11,26}.

La escasa eficacia de estos tratamientos se explica por la fisiopatología de la reparación del tendón: el tejido cicatricial resultante carece de las propiedades funcionales del tendón original^{3,12-16}. Existen evidencias de que el tendón cura en base a la producción de un tejido cicatricial fibrocondrogénico con propiedades funcionales inferiores a las del tejido original normal¹⁷.

LA TERAPIA REPARATIVA EN ARTICULACIONES

Los tratamientos que abordan la patología articular, con independencia de la causa, consideran objetivos primordiales el retorno de la articulación a su situación normal en el menor tiempo posible y la prevención o minimización de la gravedad de la osteoartritis. Por tanto, cualquier situación patológica, desde una sinovitis aguda que pueda producir inestabilidad articular por exceso de líquido sinovial y derivar en osteoartritis, hasta aquellas situaciones que requieren intervenciones quirúrgicas, deberían ser tratadas en el momento más adecuado a efectos de prevenir o minimizar la OA¹⁸.

Sin considerar ahora las técnicas quirúrgicas, la medicina reparativa ha abordado esta patología mediante diversos tratamientos médicos (AINES, corticoides, hialuronato sódico, glicosaminoglicanos polisulfatados, pentosán, suplementos orales nutracéuticos a base de glucosamina y/o condroitín sulfato) que muchas veces sólo tienen un efecto paliativo transitorio, dependiendo de la gravedad de la lesión.

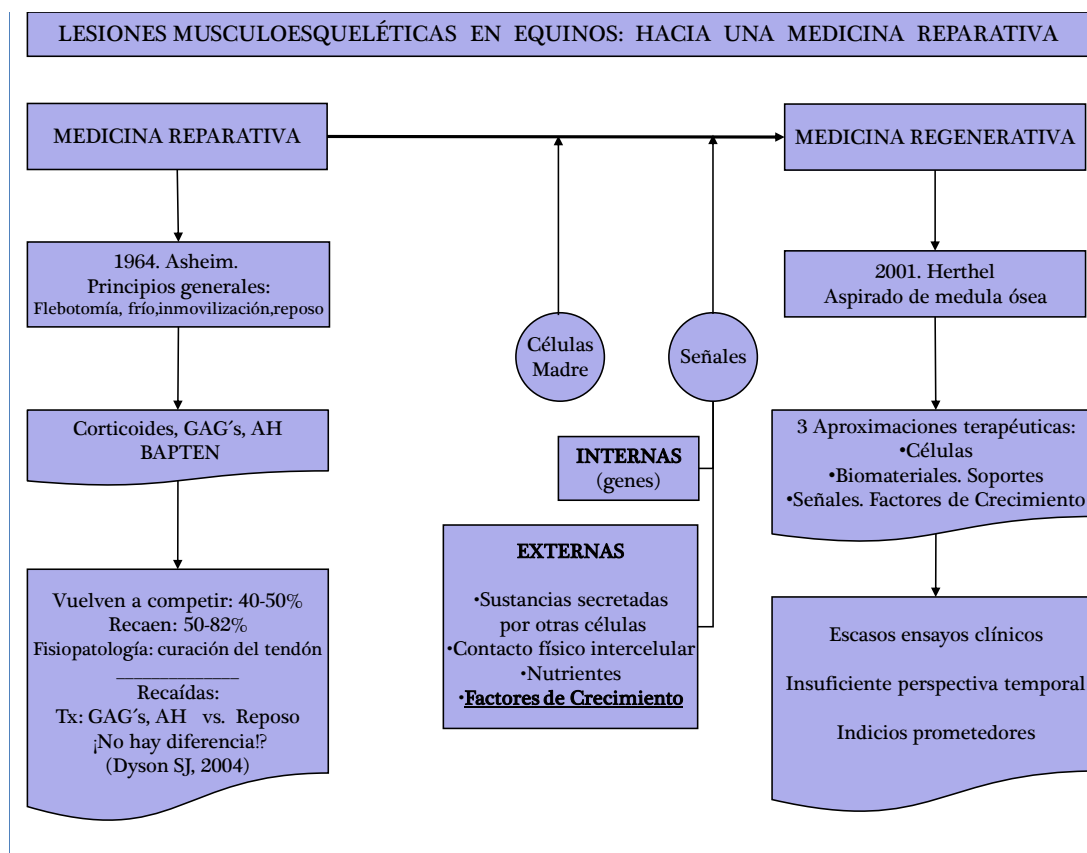
Llegados a este punto, podemos establecer una analogía con lo dicho anteriormente sobre los tendones y ligamentos. La baja eficacia de estos tratamientos se explica por la fisiopatología de la curación de la articulación: el tejido cicatricial resultante del proceso de curación es un tejido fibrocartilaginoso de inferior calidad porque carece de las características histológicas y propiedades funcionales del cartílago original y algo parecido ocurre con el hueso subcondral¹⁹.

HACIA UNA MEDICINA REGENERATIVA.

Ante esta perspectiva, una parte de la comunidad científica se encuentra inmersa en la transición de una **medicina reparativa** a una **medicina regenerativa**^{15,20-29}, esta última basada en tratamientos por los cuales las células madre son inducidas a diferenciarse en uno o varios tipos celulares específicos requeridos para curar los tejidos o poblaciones celulares dañadas.

Aún hoy, resulta difícil definir qué es una **célula madre**, resultando más fácil hablar de algunas de sus características o capacidades: autorenovación, diferenciación y estabilidad a lo largo del tiempo³⁰. Según su potencial de diferenciación en diferentes linajes celulares se tipifican como totipotentes, pluripotentes, multipotentes y adultas, siendo los límites entre cada uno de estos tipos cada vez más confusos desde que se ha introducido el concepto de transdiferenciación y reprogramación.

Las células se localizan en un entorno, ambiente o **nicho**, ya sea "in vivo" o "ex vivo", que condiciona o influye en su evolución. Así pues, en un determinado nicho, se habla de diferenciación y de **señales** reguladoras. Estas últimas incluyen aquellos factores **internos** (genes) y **externos** (sustancias secretadas por otras células, contacto físico con otras células, nutrientes y **factores de crecimiento**) que controlan los cambios estructurales y funcionales de las células y la matriz extracelular.



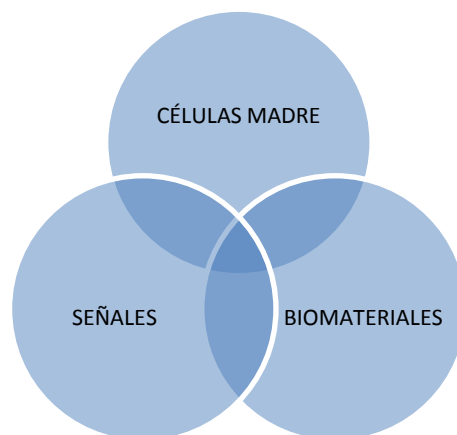
Fuente: Elaboración propia

INGENIERÍA TISULAR. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS.

La Ingeniería de Tejidos ha sido definida como “un campo interdisciplinar que aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de substitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos o de un órgano completo”²⁸. La ingeniería de tejidos se solapa con los campos de la medicina regenerativa y con la biología de las células madre desde el momento en que se necesitan las técnicas de estas dos últimas disciplinas para diferenciar células en fenotipos que puedan ser ensamblados en los distintos diseños de estructuras biológicas.

Actualmente la ingeniería de tejidos aplicada al tratamiento de lesiones tendinosas se encuentra menos desarrollada que la aplicada a las lesiones articulares y esto se debe a varios motivos. En primer lugar, los conocimientos sobre la biología del desarrollo del tendón no son suficientes y aún no se entiende cómo intervienen las señales y las células en la formación y desarrollo de este tejido; este conocimiento resulta fundamental para que las técnicas y procedimientos de la medicina regenerativa puedan mimetizarlo. Por otra parte, tampoco se han diseñado buenos modelos in-vivo e in-vitro que permitan el estudio de la diferenciación de las células del tendón y ensayar técnicas de reparación; además, dichos modelos tampoco recrean o reproducen la forma natural de producirse la lesión. Probablemente el caballo sea una de las mejores especies para estudiar las lesiones tendinosas e intentar extrapolar los resultados a otras especies, pero resulta un modelo caro y con inconvenientes de tipo ético. Por otra parte, la información que llega desde la investigación en medicina humana también es mucho más extensa en lo que concierne a la patología articular, ya que la osteoartritis sustenta una morbilidad mucho más alta que la patología de los tendones.

En estos momentos, las estrategias de **ingeniería tisular** incluyen la utilización de una o varias de las siguientes aproximaciones: (a) soportes o biomateriales, *scaffolds*, (b) factores de crecimiento (FC) y (c) aporte de células^{23,24,29}. Estas últimas pueden ser diferenciadas o células madre. Las células madre tienen la ventaja de su potencial de diferenciación en diversos tipos celulares capaces de sintetizar las matrices de distintos tejidos.



PRIMERA APROXIMACIÓN. BIOMATERIALES, SOPORTES ESTRUCTURALES.

La primera aproximación incluye el uso de sustancias que actúan como soporte o *scaffolds*. En ingeniería tisular, las células se siembran o fijan sobre una estructura artificial capaz de permitir el desarrollo tridimensional del tejido. Los biomateriales o *scaffolds* tienen las siguientes funciones:

- a) Permitir la fijación, diferenciación, multiplicación y migración de células y la síntesis de matriz extra celular (MEC), tanto en los cultivos *ex vivo* como en la lesión tratada.
- b) Simular las características espaciales y biomecánicas del tejido que se pretende curar.
- c) Favorecer la difusión de nutrientes celulares vitales y productos expresados.
- d) No modificar el fenotipo celular que se pretende implantar.

Los retos en el diseño de estos biomateriales se centran en sincronizar la degradación polimérica del biomaterial con la formación de matriz extracelular del tejido lesionado, producir biomateriales con la suficiente resistencia mecánica y que ésta se mantenga durante las fases iniciales de la curación, es decir, hasta que el nuevo tejido formado asuma las cargas biomecánicas.³¹

Los biomateriales que se han diseñado hasta ahora apenas mimetizan la morfología del tejido natural a nivel estructural. Se supone que este mimetismo es muy importante cuando se trata de intervenir en tejidos que tienen una estructura con una orientación direccional muy definida, como es el caso de los tendones. Se están desarrollando biomateriales a base de fibrillas de diámetro y orientación controlables. En la actualidad, aún no se ha producido ningún material con estas características para ser utilizado en los tendones a nivel clínico.

USO IN VIVO. TENDONES, LIGAMENTOS Y ARTICULACIONES.

Muy alejado de estos requisitos teóricos se encuentra el uso de matriz extracelular de vejiga urinaria de porcino (UBM), que se inyecta en forma líquida en el interior de la lesión tendinosa. Se supone una sustancia rica en factores de crecimiento y con capacidad quimiotáctica positiva para atraer células indiferenciadas a la zona lesionada. Se han observado algunas reacciones inflamatorias importantes que tienen que ser controladas con la aplicación local de frío y la administración de AINES. En un estudio clínico³² en el que esta sustancia se combina con otros procedimientos, se afirma que un 85,9% de los caballos tratados volvieron a la competición, aunque no se menciona el porcentaje de recaídas.

Otros materiales utilizados en los tendones incluyen fibras reabsorbibles implantadas longitudinalmente de ácido poliglicólico (PGA) o ácido poliláctico (PLA).

Los biomateriales que se utilizan en el tratamiento de problemas articulares incluyen hidrogeles, estructuras esponjosas y mallas, de polímeros naturales (alginato, agarosa, fibrina, gel de plasma rico en plaquetas (PRP), colágeno, gelatina, quitosán, condroitin sulfato y celulosa) o sintéticos (PGA, PLA, polidioxanona, fosfato tricálcico o de biohueso). El

inconveniente de los naturales reside en el potencial efecto inmunogénico, mientras que los sintéticos no favorecen la relación célula-soporte y los productos de su degradación pueden resultar tóxicos³³.

SEGUNDA APROXIMACIÓN. SEÑALES. FACTORES DE CRECIMIENTO.

Algunos de los nuevos tratamientos para las tendinitis/desmitis y algunos problemas articulares se basan en la administración de uno o varios FC en el lugar de la lesión. Los FC son moléculas proteicas que regulan el metabolismo celular. Aceleran la curación tisular por medio de la estimulación de la proliferación celular, el incremento de la síntesis de matriz extracelular y estimulando la neovascularización. Además de los efectos anabólicos, los FC inhiben las citoquinas catabólicas que degradan la matriz, tales como las interleuquinas y las metaloproteinasas de la matriz (MMP). Por ello, los FC constituyen un área de creciente interés en las estrategias de ingeniería tisular. Los más estudiados en el área de la regeneración musculo-esquelética son: *platelet derived growth factor (PDGF)*, *bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)*, *transforming growth factor- β (TGF- β)*, *epidermal growth factor (EGF)*, *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *basic fibroblast growth factor (b-FGF)*, *insulin-like growth factor-I (IGF-I)*, *hepatocyte growth factor (HGF)*, *growth/differentiation factor (GDF)*. (Ver tabla 1).

Tabla 1. Efectos de los factores de crecimiento plaquetarios más conocidos.

	PDGF	TGF- β	IGF-I	VEGF	b-FGF	EGF	HGF	PDAF
Mitogénesis	++	+	++		+ -	++		+
Quimiotaxis	++	+	++		+	+		
Diferenciación			+			+		
Angiogenesis	++		++	++	++		+	+
Síntesis MEC (Colágeno, COMP)	Colag+ I	COMP +	Colag+		Colag+ I y III			+
Antiinflamatorio		++						

Los factores de crecimiento, también llamados citoquinas anabólicas, pueden clasificarse, según su procedencia, en (a) sintéticos o heterólogos y (b) autólogos.

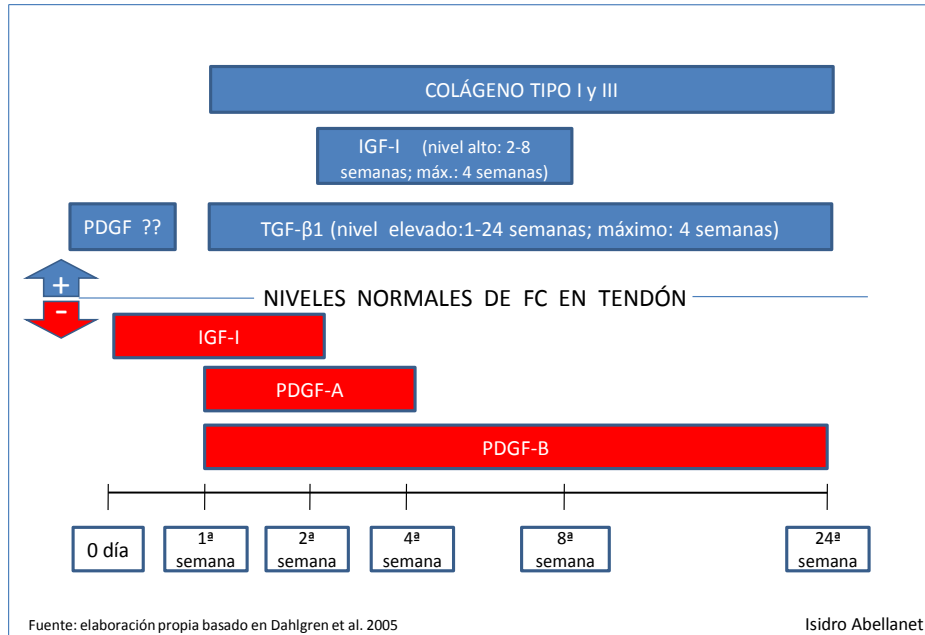
A) FACTORES DE CRECIMIENTO SINTÉTICOS O HETERÓLOGOS

TENDONES Y LIGAMENTOS. ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.

Se están estudiando sus efectos, solos o combinados, sobre cultivos de explantes de tendones^{28-41,45,47-50}. Se ensayan aportes de FC procedentes de médula ósea (MO), aspirado de médula ósea (AMO), PRP, plasma pobre en plaquetas (PPP), liposomas que contienen FC específicos (TGF- β , IGF-I, etc)⁴² o mediante plaquetas liofilizadas (TrombosomasTM. Cellphire Inc., Rockville, MD), que pueden ser almacenadas a temperatura ambiente durante varios meses. El liofilizado contiene una cantidad conocida de plaquetas y se reconstituye con suero salino fisiológico o agua⁴³⁻⁴⁵.

Resulta esencial conocer la secuencia de intervención de los FC, sinergias y cascadas bioquímicas que acontecen en los tendones y ligamentos^{34-41,45}. Se sabe que IGF-I se expresa sobre todo en la fase temprana de la inflamación, manteniendo niveles superiores a los normales entre la 2ª y 8ª semanas y con un pico máximo alrededor de las 4 semanas^{37,41}, e interviene en la proliferación y migración de fibroblastos y tenocitos y, por tanto, en la síntesis de colágeno de la matriz extracelular³⁴⁻³⁷. TGF-β1 interviene durante la fase inflamatoria, elevándose la expresión génica a partir de la primera semana y manteniéndose alta durante 24 semanas y máxima a las 4 semanas^{37,41}. TGF-β tiene varios efectos sobre la migración y proliferación celular y las uniones de fibronectina. TGF-β estimula la síntesis de la proteína de la matriz oligomérica cartilaginosa (COMP)^{37,38,41} y también actúa como antiinflamatorio ya que neutraliza o inhibe la expresión de IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8⁴⁶, la actividad de MMP⁴⁷. Estas citoquinas catabólicas están ausentes en el tendón sano⁴⁸. VEGF se produce sobre todo después de la fase inflamatoria, que es cuando estimula la angiogénesis³⁷; tiene cierto efecto estimulante sobre la expresión de TGF-β pero no sobre los genes del colágeno⁴⁹. El PDGF se produce poco después de la lesión y estimula la producción de otros FC, incluyendo IGF-I y TGF-β1.⁴¹ El b-FGF es un potente estimulador de la angiogénesis y un regulador de la migración y proliferación celular y la síntesis de colágeno^{37,41}. (Ver figura 1).

Figura 1. SECUENCIA DE INTERVENCIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE CRECIMIENTO



En los cultivos in vitro se ha observado⁴⁵ que el TGF-β es liberado por las plaquetas bajo una forma inactiva con una vida biológica media de unos 90 minutos; una vez activado se aclara rápidamente. El PDGF-BB se libera en forma activa y tiene una vida media de 2 minutos. Si

las plaquetas vivas se añaden a los cultivos de explantes de TFDS y LS sin haberlas activado previamente, liberan FC (TGF- β y PDGF-BB) durante unos 4 días según una curva creciente-decreciente⁴⁵. Si los FC se aportan en forma directa o como plaquetas liofilizadas, la concentración de FC es máxima desde el principio y luego sigue una curva rápidamente decreciente dada la corta vida media de los FC⁴⁵. (Fig. 3)

Sobre cultivos de explantes de TFDS y LS, se ha visto que el PRP y las plaquetas liofilizadas (PL), en comparación con el AMO, presentan un mejor balance anabólico, con un mejor ratio COL1A1:COL3A1, una mayor expresión de COMP y una menor expresión de MMP-3 y MMP-13, como consecuencia probable de un mayor aporte de TGF- β y PDGF-BB y un menor contenido en leucocitos⁴⁵.

Los FC también se ensayan para estudiar el comportamiento de los distintos cultivos en presencia de determinados biomateriales⁵⁰.

Existen preparados comerciales conteniendo IGF-I. Un estudio clínico⁵¹ sobre 6 caballos evidencia una mayor velocidad de reparación de las lesiones tendinosas a la vez que una mayor síntesis de colágeno tipo I. Existen pocos estudios con la perspectiva suficiente para valorar los resultados a largo plazo; uno de ellos²⁷, menciona que en una muestra de 39 caballos purasangre inglés (PSI) de carreras, evaluados a los dos años del tratamiento, el 50% volvió a competir al menos una vez y que el 47% recayó después de haber corrido un significativo número de carreras.

ARTICULACIONES. ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.

En el campo de la patología articular los FC sintéticos o heterólogos se están empleando sobre todo para estudiar sus efectos in vitro sobre cultivos de condrocitos y hueso subcondral o en cirugía experimental⁵⁶. Se sabe que IGF-I estimula la producción de MEC⁵² y la proliferación de los condrocitos, pero que este efecto se reduce en sujetos de edad avanzada y en caso de articulaciones con osteoartritis⁵³⁻⁵⁵. Así como IGF-I surte escaso efecto sobre los condrocitos alterados⁵⁷, TGF- β actúa como antiinflamatorio ya que neutraliza o inhibe la expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8⁴⁶, y puede estimular la reparación del cartílago lesionado mediante el estímulo de los condrocitos y la síntesis de COMP. BMP-2 puede estimular la síntesis de proteoglicanos por parte de los condrocitos si IL-1 no está presente⁵⁷. TGF- β y BMP-2 estimulan la formación de condrocitos en los márgenes articulares y la consiguiente formación de osteofitos en articulaciones artríticas⁵⁷. Es necesaria la acción conjunta sinérgica de TGF- β y IL-1 para inducir la expresión de los genes del colágeno tipo II y del agregano de los condrocitos humanos⁵⁹. Estos son sólo algunos de los efectos aislados que se conocen.

Es de singular importancia el conocimiento de las secuencias de intervención de los FC, sus sinergias y las cascadas bioquímicas que originan para poder intervenir en el curso de la enfermedad⁵⁶⁻⁵⁹.

Como aplicación práctica en el campo de la cirugía clínica articular podemos mencionar la adición de algunos FC (IGF-I) a la masa de medula ósea, enriquecida o no con cultivos de células mesenquimales, que se compacta en el interior de los quistes subcondrales. Este abordaje se puede hacer mediante artroscopia. La adición de FC también se puede hacer mediante liposomas que contienen FC específicos (TGF- β , IGF-I)⁴² o mediante plaquetas liofilizadas (Thrombosomes[®])⁴³⁻⁴⁵, como se ha comentado anteriormente.

B) FACTORES DE CRECIMIENTO AUTÓLOGOS

Los preparados con FC autólogos, se pueden obtener a partir de aspirados de medula ósea (AMO), por punción de las estérnebras o de la tuberosidad coxal, o bien de plasma rico en plaquetas (PRP).

AMO

Los aspirados de medula ósea, utilizados de forma directa o cruda, se ensayaron⁶⁰⁻⁶¹ y difundieron inicialmente como fuente de células mesenquimales, aunque su concentración en este tipo celular es mínima ($1/10^5$ hasta $1/4 \times 10^3$ células nucleadas, según la edad del paciente) y se sospecha que sus posibles efectos favorables se deben más bien a la concentración de factores de crecimiento presentes en el aspirado^{14,64}. Existen varias técnicas de obtención de AMO y algunas no están exentas de riesgos (perforación pleural); por otra parte, el aspirado contiene partículas óseas que, al ser inyectadas, podrían ser las responsables de las reacciones inflamatorias y calcificaciones observadas en los tendones. Por estos motivos, los clínicos que actualmente utilizan este método, centrifugan el aspirado antes de proceder a su aplicación intralesional con la finalidad de eliminar las partículas óseas y seleccionar el estrato del centrifugado que contiene algunas células mesenquimales. Herthel (2001) informó que con este procedimiento el 84% de los caballos tratados volvieron a recuperar sus capacidades atléticas⁶⁰⁻⁶¹.

Como se ha comentado, comparado con el PRP, el AMO contiene más leucocitos y esto puede explicar, al menos en parte, el peor balance anabólico/catabólico^{45,64,65,103,106}.

PRP

En lo que concierne al plasma rico en plaquetas, existen algunos estudios in vitro que valoran sus efectos sobre explantes de tendones y ligamentos equinos⁶²⁻⁶⁵ y muy pocos que analicen el efecto del PRP a nivel articular o sobre cultivos de condrocitos⁶⁶. Las investigaciones realizadas in vivo en equinos son también muy escasas y se han llevado a término con un pequeño número de casos clínicos, pero ya advierten de las posibilidades terapéuticas del PRP⁶⁷⁻⁷⁰.

Este apartado se desarrolla más adelante.

ANTAGONISTA DE LOS RECEPTORES IL-1 (IL-1ra)

Las nuevas terapias articulares focalizan mucho la atención sobre la búsqueda de agentes neutralizantes de los mediadores de la inflamación (citoquinas catabólicas, MMPs, etc)⁷¹. En este sentido, existe otra modalidad de tratamiento relacionada con las citoquinas que se basa en la obtención de suero autólogo rico en IL-1ra⁷²⁻⁷⁵, que actúa bloqueando los receptores para IL-1, uno de los principales mediadores en la osteoartritis equina. Existen varias isoformas de IL-1ra, las secretadas (sIL-1ra) y las intracelulares (icIL-1ra) y pueden ser liberadas por distintos tipos celulares tales como neutrófilos, macrófagos, condrocitos y fibroblastos sinoviales. El suero obtenido con este procedimiento (IRAP. Orthokine) contiene, además, algunos FC (FGF-1, HGF, TGF- β 1). Los estudios publicados se han centrado en las articulaciones. En un estudio realizado sobre 262 caballos con patologías articulares, a los 6 meses de finalizar el tratamiento, un 53% de los casos recuperó el nivel atlético previo⁷⁶.

Sin embargo, algunos estudios piloto indican que IL-1ra podría tener aplicación terapéutica fuera del ambiente articular, en tejidos blandos⁷⁷ y a nivel sistémico. La administración intravenosa de IL-1ra en roedores pone de manifiesto un efecto protector contra las agresiones isquémicas, excitotóxicas y traumáticas del cerebro, aunque sólo un pequeño porcentaje (4%) atraviesa la barrera hemato-encefálica⁷⁸. Se está explorando su valor terapéutico como tratamiento sistémico (vía intravenosa) en distintas patologías (urticaria).

TERCERA APROXIMACIÓN. CÉLULAS MADRE

Finalmente, la tercera aproximación, se fundamenta en el aporte de células, ya sean diferenciadas o células madre. En medicina equina la mayoría de estudios se están realizando con células mesenquimales **autólogas** obtenidas a partir de aspirados de medula ósea⁷⁹⁻⁸¹, bien de tejido graso⁸²⁻⁸⁴ o, más recientemente y de gran interés, de sangre periférica (CD34+)⁸⁵⁻⁸⁸.

Aunque, en principio, las células mesenquimales pueden diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, adipocitos, tenocitos, fibroblastos y miofibroblastos, las células mesenquimales obtenidas de los tres tejidos antes mencionados (medula ósea, adiposo y sangre periférica) no presentan la misma capacidad de diferenciación⁸⁹, ni tienen el mismo fenotipo, que puede variar aún más tras su cultivo ex-vivo.

Los estudios preliminares realizados con células progenitoras mesenquimales **alogénicas** inyectadas en lesiones tendinosas no muestran una respuesta inmune frente a dichas células⁹⁰.

CÉLULAS MADRE EN TENDONES Y LIGAMENTOS

Varios estudios²⁰⁻²⁴ mencionan los resultados obtenidos, tras un año de seguimiento, de un grupo de casos clínicos diagnosticados de tendinitis y tratados con células mesenquimales cultivadas a partir de AMO, comparándolos con los datos estadísticos preexistentes sobre el mismo tipo de caballo de deporte y tratados con métodos convencionales^{10,11}, resultando que

un 51% de los caballos tratados volvieron a la competición (31% grupo de referencia) y que un 30% recayó (56% grupo de referencia). Resulta muy interesante resaltar el hecho de que todos los caballos que respondieron bien al tratamiento celular fueron implantados en el intervalo entre el inicio de la lesión y los 44 días siguientes, mientras que los caballos que recayeron habían sido implantados más tarde, en el intervalo de 83 días. Los autores hipotetizan sobre la posibilidad de que a los 83 días pudiera haber ya un exceso de fibrosis que limitase la eficacia del tratamiento. Otros investigadores mencionan más limitaciones, ya que la aplicación de células mesenquimales requiere la existencia de una lesión tendinosa de tipo anecoico en la que poder depositar el cultivo celular^{15,20-24}; si la lesión supera el 30% de la sección del tendón el porcentaje de resultados favorables disminuye significativamente¹¹⁷.

Estas últimas hipótesis recuerdan la importancia que tiene el conocimiento de la cronología de las fases de la curación de un tendón, para determinar el intervalo de tiempo óptimo en el cual deberían aplicarse este tipo de tratamientos regeneradores.

FASES DE LA CURACIÓN DEL TENDÓN

Se aceptan tres fases (inflamatoria o aguda, reparadora o subaguda y remodeladora o crónica) que se solapan unas con otras:

(A) AGUDA O INFLAMATORIA

Tras la lesión se produce una hemorragia intratendinosa y se inicia la reacción inflamatoria, con incremento de flujo sanguíneo, edema, infiltración con neutrófilos, monocitos y macrófagos y liberación de enzimas proteolíticas.

(B) SUBAGUDA O REPARADORA

A los 5- 7 días, se observa una disminución significativa de los neutrófilos y macrófagos que aparecieron en la fase aguda y, al mismo tiempo, se detecta una importante presencia de fibroblastos (derivados de los tenocitos del tendón, de células del endotenon y paratenon y de monocitos de origen vascular), responsables de la síntesis de colágeno (tejido cicatricial) que se va deponiendo de forma aleatoria. El nuevo colágeno sintetizado tiene una alta proporción de fibras tipo III en relación al tipo I (1:1) si lo comparamos con un tendón normal (1:10). Simultáneamente, se detectan unas altas concentraciones de glucosaminoglicanos y unos niveles de COMP íntegra inferiores a los normales⁹¹.

Alrededor de los 15 días, la concentración de la enzima lisil-oxidasa, producida por células de tipo fibroblástico y responsable del *cross-linking* (entrecruzamiento), empieza a aumentar progresivamente hasta alcanzar un máximo alrededor del día 30 y luego disminuir progresivamente hasta los niveles iniciales alrededor del día 50. Se considera que el efecto de entrecruzamiento de la enzima lisil-oxidasa empiezan a ser significativo a los 30 días, cuando simultáneamente empieza a detectarse la deposición de colágeno orientado y el incremento de su resistencia tensil. Puede decirse que el periodo de máximo entrecruzamiento del colágeno está comprendido entre los 20 y 50 días⁹².

(C) CRÓNICA O REMODELADORA

Finalmente, durante la fase final remodeladora, que de forma natural se extiende hasta los 14-18 meses, se produce una conversión incompleta de fibras de colágeno tipo III en tipo I, resultando un tejido cicatricial sin las propiedades funcionales del tendón original (capacidad de elongación y resistencia a la tensión, compresión e incremento de temperatura durante el ejercicio)^{3,12-15,93}.

FASE IDEAL PARA LA REALIZACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS REGENERADORES

Por todo ello, se admiten que la segunda fase sería la más apropiada para este tipo de tratamientos regenerativos, ya que existen oportunidades para intervenir en la reorganización estructural de la lesión, lo que en términos de tiempo comprendería entre los primeros 5-7 días y unos dos meses. Por ejemplo, algunos autores sugieren la administración de IGF-1 durante las dos primeras semanas, ya que los niveles de IGF-1 en la lesión no empiezan a aumentar hasta las 4 semanas³⁷. También existe bastante consenso para no utilizar AMO y PRP durante los primeros 10-15 días de la lesión ya que la hemorragia inicial que acompaña a la lesión aún está presente^{103,116}.

CÉLULAS MADRE EN ARTICULACIONES

Las lesiones que afectan a todo el grosor del cartílago se curan con un tejido fibroso que, mediante un proceso de metaplasia, se convierte en un tejido fibrocartilaginoso que carece de las propiedades originales del cartílago hialino⁹⁴.

A la luz de los conocimientos actuales, los mecanismos de reparación del cartílago incluyen una combinación de una limitada capacidad intrínseca orquestada por los condrocitos residentes, una reparación extrínseca basada en las células mesenquimales procedentes del hueso subcondral y, finalmente, un *matrix flow* consistente en un crecimiento cartilaginoso a partir de unas proliferaciones o labios cartilaginosos que, desde la periferia de la lesión, se extienden hacia el centro de la misma para recubrirla⁹⁵.

IN VITRO

Se estudian procedimientos para que las células mesenquimales sigan una diferenciación condrogénica. Este proceso se puede facilitar con la adición de FC, como TGF- β 3⁹⁶.

Determinados FC también incrementan el tamaño y peso de los fragmentos cartilaginosos obtenidos a partir de células mesenquimales⁹⁸.

IN VIVO

En la práctica clínica se han realizado esfuerzos en diversos sentidos para lograr un recubrimiento cartilaginoso. La técnica quirúrgica por la que se realizan microfracturas en el hueso subcondral para proporcionar células de la médula ósea y FC al entorno articular y

promover así la reparación del cartílago, mejora los resultados clínicos pero el tejido cicatricial no es como el original. En este caso, el éxito de la ingeniería tisular de base celular depende de la precisa diferenciación de las células madre en condrocitos y del ensamblaje de matriz cartilaginosa con la misma capacidad para soportar cargas que el cartílago natural⁹⁷. Así como la diferenciación en condrocitos hoy día parece asequible^{31,98}, la retención de estos implantes celulares en el sitio preciso de la superficie articular continúa siendo un reto quirúrgico.

TERAPIA GÉNICA

Se basa en la transferencia de genes terapéuticos (por ejemplo, el gen responsable de la síntesis de IL-ra) mediante la inserción de su secuencia génica en un vector adenovirus. In vitro, se ha demostrado la expresión de la proteína IL-ra equina en los cultivos de sinoviocitos al introducirse el gen equino IL-ra mediante vectores adenovirus portadores de dicho gen (AdeqIL-ra). Simultáneamente in vivo, en los modelos de estudio de la OA equina, la adición del vector adenovirus (AdeqIL-ra) se acompaña de una reducción de la cojera y efusión sinovial, así como de una disminución de las lesiones anatomopatológicas en comparación con los grupos control^{99,100}. Sin embargo, la aplicación práctica de esta tecnología se encuentra con un problema inmunológico, ya que el virus vector actúa como un antígeno y activa el sistema inmunológico del paciente con lo que, a partir de la segunda dosis, pueden aparecer problemas de intolerancia que se manifiestan con sinovitis⁹⁹. Se están estudiando otros vectores menos inmunogénicos.

Otras líneas de investigación están explorando los resultados de las combinaciones de la terapia génica (adenovirus vectores AdeqIL-ra) con factores de crecimiento (IGF-I ó BMP-2) y observando los efectos sobre lesiones del cartílago articular o sobre el hueso afectado por osteomielitis^{52,53,101,102}.

Para poder llevar a término una terapia génica se precisa un mayor conocimiento de los genes que intervienen en el metabolismo articular. En este sentido, en un reciente estudio (Katja Düsterdieck, 2008 *PhD dissertation under the guidance of Dr. David Frisbie. Ohio State University*) se ha presentado una técnica para el aislamiento de RNA de condrocitos de estratos cartilaginosos superficiales y profundos y determinar qué genes se expresan de forma diferente según se trate de un cartílago osteoartítico vs. normal y según sea el estrato cartilaginoso del cual proceden los condrocitos. El RNAm obtenido se ha analizado mediante un chip de genes equino con capacidad para analizar 3.000 secuencias génicas. Se han detectado 154 genes que se expresan de forma diferente según procedan de condrocitos de las capas superficiales o profundas. Los genes que se expresan en los condrocitos de las capas superficiales apoyan la proliferación celular, la supresión de la apoptosis y la estimulación de varios genes involucrados en la interacción célula-matriz o en procesos inflamatorios; sin embargo, la expresión génica en los condrocitos presentes en las capas más profundas se concentra en la síntesis de proteínas y proteoglicanos, lo que sugiere una mayor involucración en la actividad de síntesis de la matriz. Además, se han detectado 17 genes que se expresan de forma diferente según se trate de un cartílago normal o

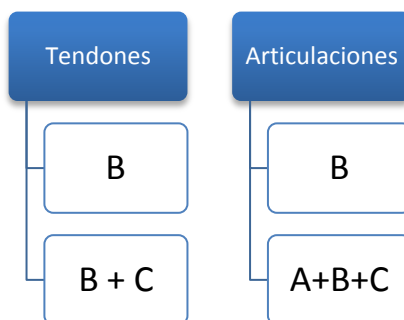
osteoartrítico. El esquema de expresión génica en el cartílago OA da lugar a una menor resistencia de las células ante el estrés y a una inhibición de la síntesis de proteoglicanos y del sistema de producción de energía de la célula.

APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

A) BIOMATERIALES. SOPORTES	B) FACTORES DE CRECIMIENTO	C) APORTE DE CÉLULAS
<ul style="list-style-type: none"> • Matriz extracelular de vejiga urinaria de porcino (UBM) • Aporte de factores de crecimiento Quimiotaxis .C mesenquimales <ul style="list-style-type: none"> • Inyección intralesional • Reacciones inflamatorias intensas • Combinando UBM con otros TX: 85,9% volvió a competir ¿Recaídas? (Mitchell, R. 2006) <hr style="width: 10%; margin: 10px auto;"/> <ul style="list-style-type: none"> • Colágeno. Fosfato tricálcico. Biohueso 	<ul style="list-style-type: none"> a) Sintéticos. IGF-1. Aumenta velocidad de reparación síntesis de colágeno I, matriz extracelular 39 P.S.I.: 50% volvió a competir 47% recayó después comp. (Nixon,AJ. 2007) b) Autólogos. Medula ósea. PRP Medula ósea. (Herthel.2001) Efectos favorables in vitro. Riesgos aplicación in vivo Faltan estadísticas de resultados PRP Efectos favorables in vitro y en estudios piloto in vivo (Carmona, Argüelles,Climent, Prades, Abellanet. 2005, 2006) 	<ul style="list-style-type: none"> • C. Mesenquimales autólogas Medula ósea (Smith 2003) Tejido graso (2005) Sangre periférica (2006) • In vitro e in vivo mejoran el patrón histológico • Medula ósea Resultados vs. Muestra Control 56% vs 23-31% volvió a competir 17% vs 56% recayeron tras competir (Mountford, Smith. 2006) • Estricta selección de candidatos al tratamiento • Sólo lesiones anecoicas

FACTORES DE CRECIMIENTO + CULTIVOS CELULARES

En la práctica, es frecuente la asociación de varias aproximaciones²⁵⁻²⁷.



Ejemplos prácticos de estas combinaciones:

- a) En tendones, la adición de PRP al cultivo de células mesenquimales obtenidas a partir de AMO o tejido graso justo antes de la inyección intralesional.
- b) En articulaciones, la adición de IGF-I sintética a la masa de fosfato tricálcico y/o de médula ósea, enriquecida con cultivos de células mesenquimales obtenidas a partir de AMO, que se utiliza para el relleno de quistes subcondrales óseos. Una vez compactada la masa en el interior se sella el orificio de entrada con gel de PRP.

TERAPIA DE ONDAS DE CHOQUE. *SHOCKWAVE THERAPY (SWT)*

A medida que se van conociendo los efectos a nivel bioquímico y celular de la SWT, se tiende a incluir esta modalidad terapéutica dentro de la medicina regenerativa.

Bajo esta denominación, con frecuencia se incluyen dos tecnologías distintas^{118,119}: la ESWT (*extracorporeal shock-wave therapy*) y la RPWT (*radial pressure-wave therapy*). (Tabla 2).

Tabla 2

	ESWT	RPWT
Dispositivo	Electrohidráulico	Neumático
Ondas	Ondas de Choque	Ondas de presión
Presión (Megapascal)	20-40 MPa	5 MPa (en el aplicador)
Energía en el punto focal	0,05-3 mJ/mm ²	0,1-0,3 mJ/mm ²
Emisión de energía	Focalizada	Radial
Cavitación	En la zona focalizada	En el cabezal aplicador
Pérdida energía en profundidad	Mínima	Proporcional a (distancia) ²

Existe cierta controversia sobre la variedad de lesiones en las que cada una de estas tecnologías han demostrado su eficacia y, por tanto, son de aplicación¹¹⁸; también resultan controvertidos los estudios que comparan la eficiencia de estas dos tecnologías en relación a una determinada lesión.

Hasta la fecha, las evidencias que apoyan la utilización de las SWT como terapia de las cojeras se dividen en dos grupos¹²⁰:

a) Evidencias concernientes a la estimulación de la curación:

En tendones:

1. Incremento de la proliferación de fibroblastos (equinos)¹²¹⁻¹²³.
2. Incremento del colágeno fibrilar (equinos)¹²¹⁻¹²³.
3. Incremento de la neovascularización en tendinopatías (caballos y conejos)^{123,124}.
4. Incremento de la fuerza tensil (conejos)¹²⁴.
5. Incremento del contenido en hidroxiprolina (conejos)¹²⁴.
6. Incremento de la expresión de IGF-I y TGF-β1 (caballos y ratas)^{122,126}.

En huesos:

1. Incrementa la osteogénesis (caballos y ratas)^{118,120}.
2. Buenos resultados en el tratamiento de no-uniones (humanos)¹²⁰.

b) Evidencias concernientes a la disminución del dolor:

En algunas lesiones crónicas, la ESWT ha evidenciado un efecto analgésico local perceptible a las 8 horas y que aumenta hasta alcanzar un pico máximo alrededor de las 48 horas, siendo aún significativo al tercer día después de la aplicación¹²⁷. Los resultados obtenidos con la RPWT no parecen tan evidentes¹²⁸.

A pesar de estas evidencias, el mecanismo de acción aún resulta casi totalmente desconocido [estímulo hiperhémico (¿?), estímulo de las citoquinas anabólicas (¿?), inhibición de la expresión de IL-10 y TNF¹²⁹].

APLICACIONES

Entesiopatías

Desmitis:

Ligamento suspensor.

Ligamentos colaterales de las articulaciones interfalangianas.

Ligamentos sesamoideos distales.

LATFDP.

Ligamentum Nuchae.

Tendinitis:

TDFS.

TDFP (incluido el trayecto dentro del casco).

Síndrome navicular: sólo efecto paliativo transitorio

Osteoartritis tarso-metatarsiana

Quistes subcondrales

Sesamoiditis

Periostitis y sobrehuesos en el metacarpiano/tarsiano III

Valgus/varus

Dorsalgias

A continuación, profundizaremos un poco más sobre los factores de crecimiento de origen autólogo y, concretamente, sobre el plasma rico en plaquetas, ya que este trabajo de investigación se basa en la utilización del PRP en tejidos blandos y articulaciones.

PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

El PRP está emergiendo como un método económico para obtener y administrar factores de crecimiento (FC) autólogos. Se reconocen unas ventajas: es rico en FC y contiene proteínas biológicamente activas; posibilita la acción conjunta de múltiples FC al mismo tiempo; incrementa la vascularización de los tejidos a través de la estimulación de la angiogénesis, proporciona un inmediato agente hemostático biocompatible, efectivo y seguro, que es absorbido por el cuerpo iniciando una regeneración local; estimula la quimiotaxis, diferenciación y multiplicación de múltiples linajes celulares, la síntesis de MEC y ácido hialurónico; compacta injertos o biomateriales, lo que facilita su manipulación y las reconstrucciones estructurales, y luego se reabsorbe y se sustituye una vez iniciado el proceso de regeneración tisular; acelera la regeneración de los tejidos blandos e inicia la cascada de la osteogénesis en un implante de hueso; a nivel dérmico, acelera los procesos de reparación de tejidos estimulando la epitelización; reduce el dolor; al ser autólogo, no hay riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y la tolerancia es excelente; el tiempo de preparación es breve (20-30 minutos); se concentran plaquetas entre 2,5 y 10 veces el nivel sanguíneo basal, según el procedimiento de obtención empleado, y se obtiene el volumen necesario fácilmente.

En medicina humana el PRP se ha utilizado para el tratamiento de heridas, queratitis, cirugía maxilofacial, plástica y ortopédica y sus aplicaciones siguen incrementándose. En medicina equina su utilización principal se centra en problemas ortopédicos tales como tratamiento de lesiones de tejidos blandos y articulaciones, ya sea utilizándolo solo o como vehículo de implantaciones celulares. También se utiliza en el tratamiento de heridas y queratitis.

La composición del PRP es compleja ya que, además de las plaquetas, contiene algunos eritrocitos, leucocitos, células mesenquimales circulantes y varias proteínas séricas, como el fibrinógeno, fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospondina, que intervienen en el proceso de curación. Sin embargo, el componente que motiva más interés son los FC plaquetarios contenidos en los gránulos α y que se liberan durante el proceso de activación plaquetaria.

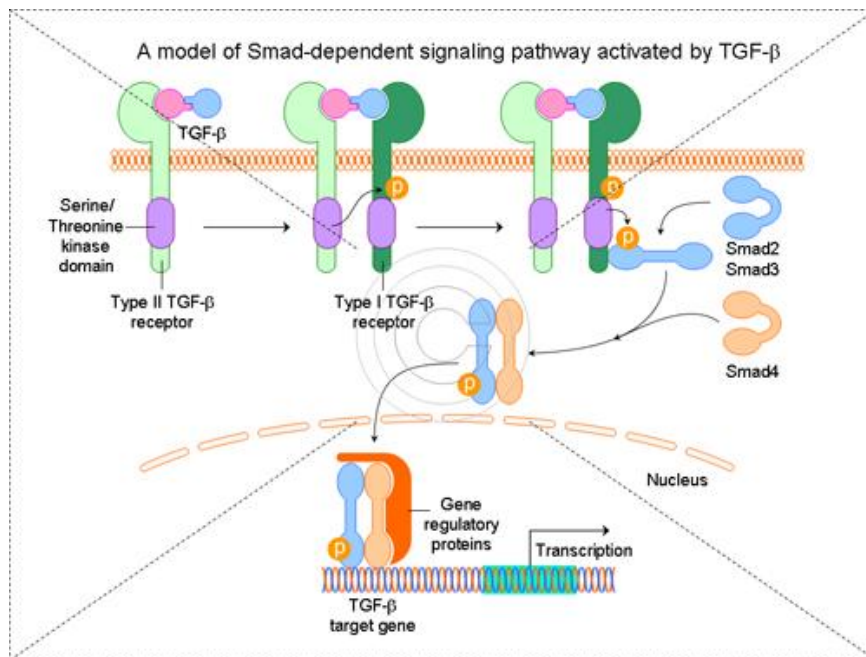
FACTORES DE CRECIMIENTO. DEFINICIÓN.

Los FC son péptidos que promueven la proliferación celular, la diferenciación, quimiotaxis y migración de varios tipos de células. Como consecuencia de este estímulo a nivel celular, se produce un incremento de síntesis de los componentes de la MEC.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Los FC se unen a los receptores tirosina-kinasa (TKR) de las membranas celulares. Los TKR son proteínas que, desde la membrana citoplasmática, se extienden hacia el interior del citoplasma de la célula. Tras la unión FC-TKR se activan proteínas mensajeras en el citoplasma mediante una reacción en cascada. Estas proteínas llegan al núcleo y activan los genes responsables del control de la división celular. En consecuencia, se induce la transcripción de RNA-m, produciéndose una respuesta biológica que inicia las cascadas bioquímicas que inducen la reparación/regeneración tisular. Se desconoce la duración de la unión FC-TKR (Figura 2).

Figura 2



Los FC pueden tener tres mecanismos de acción diferentes. Pueden actuar de forma paracrina (Los FC son secretados por una célula estimulando así una segunda célula vecina), autocrina (las células liberan FC que actúan sobre sí mismas, incrementando su actividad) y endocrina (los FC pueden influenciar una célula de un fenotipo diferente y que además está en un lugar anatómico remoto).

CLASIFICACIÓN

Los FC se pueden clasificar en dos grupos: morfométricos y mitogénicos. Los morfométricos están relacionados con el crecimiento óseo y pueden inducir la diferenciación de células madre mesenquimales multipotentes en células osteoprogenitoras inmaduras y maduras. Estos FC se llaman BMP's (*bone morphometric proteins*), que pertenecen a la superfamilia de TGF-β. Pero la mayoría de FC presentes en el PRP pertenecen al grupo de los mitogénicos.

Los más conocidos son: *platelet derived growth factor* (PDGF), *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2), *transforming growth factor-B* (TGF-β), *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (b-FGF), *insulin-like growth*

factor-I (IGF-I), *hepatocyte growth factor* (HGF), *growth/differentiation factor* (GDF). Existen formas isoméricas para muchos de ellos (PDGF-AA,-BB,-CC,-DD; TGF- β -1, -2, -3; VEGF-A, -B, -C, -D; FGF-1, -2, -4, -7, -9, -10, -19; IGF-1, -2). Se cree que todas estas formas son activas pero son específicas para ciertos tejidos y sus efectos no son los mismos en todos ellos. Estas diferencias en cuanto a la especificidad de acción se remarcan aún más cuando se comparan los efectos entre distintas especies de mamíferos. Estos FC no son exclusivos de las plaquetas y muchos de ellos se sintetizan y encuentran en otros tejidos. En este sentido, se sabe que IGF-I se sintetiza en el hígado y que su concentración en el PRP y el AMO es similar a la del suero porque las plaquetas no contienen IGF-I o su contenido es mínimo^{103,116}.

CORRELACIÓN ENTRE PLAQUETAS, FACTORES DE CRECIMIENTO Y REPARACIÓN TISULAR

Existe una correlación positiva entre la concentración de plaquetas y la concentración de factores de crecimiento. Además, las concentraciones de FC están muy positivamente correlacionadas con la expresión de los genes responsables de la síntesis de la MEC. En otras palabras, si las concentraciones de plaquetas son altas, hay más factores de crecimiento y más síntesis de proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno y COMP³⁴⁻⁴¹, producidas por las células del TFDS y LS equino⁴⁵. Se ha probado que existe una relación dosis-dependiente entre algunos factores de crecimiento y la síntesis de algunos componentes; por ejemplo, IGF-1 y la síntesis de colágeno^{34-36,41}, TGF- β -1 y COMP^{37,38,41}, PDGF-bb y colágeno tipo I³⁹⁻⁴¹. Algunos FC son antiinflamatorios, como el TGF, que neutraliza o inhibe la expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8⁴⁶, lo que acentúa la importancia de seleccionar un producto con alta concentración plaquetaria y baja concentración en leucocitos, es decir, con bajo riesgo de aporte de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α)^{45,103}.

Un buen parámetro para medir el resultado de la regeneración de los tendones y ligamentos reside en la síntesis de colágeno. Tras producirse la lesión tendinosa, se incrementa la síntesis de COL3A1 y se forman entrecruzamientos (*crosslinks*) irregulares para contribuir a la estabilidad del tejido mientras se va incrementando la síntesis de COL1A1 para recuperar la arquitectura normal del tendón. El tejido fibroso cicatricial que se forma tras la lesión se compone de una alta proporción de COL3A1, carece de haces de fibras y, en cambio, presenta un esquema de fibras no lineales desorganizadas que pueden persistir durante 14 meses o más. Se considera que la baja calidad de las propiedades biomecánicas del tejido cicatricial y la lentitud de la curación son las responsables de la alta incidencia de recaídas. El PRP disminuye la expresión de COL3A1 e induce una mayor expresión de COL1A1⁴⁵.

También resulta interesante hacer notar que la degradación del tendón mediada por MMPs inducidas por IL-1 y TNF- α de origen leucocitario conduce a un incremento de la producción de COL3A1 y que los tejidos tratados con AMO manifiestan una mayor expresión de MMP-3, MMP-13^{64,65} y de COL3A1⁴⁵ que los tratados con PRP.⁴⁵ Varios investigadores han establecido que hay una correlación positiva entre la creciente concentración de leucocitos en los

concentrados plaquetarios y la acumulación de citoquinas inflamatorias (IL-1, TNF, IL-6, IL-8) desde el 2º al 7º día de almacenamiento a temperatura ambiente. Los leucocitos se mantienen metabólicamente activos a 22°C y las crecientes cantidades de mediadores de la inflamación se explican porque se mantienen activas la síntesis y liberación de las mismas¹⁰³. Durante el almacenamiento, las concentraciones de IL-1 y TNF se incrementan muy ligeramente, pero el aumento de IL-8 es muy significativo¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Por otra parte, también se ha observado que durante el almacenamiento los neutrófilos secretan IL-1ra en cantidades significativamente superiores a IL-8¹⁰⁷ y es posible que el balance neto favorezca el anabolismo¹⁰⁸.

Debe observarse bastante cautela tanto al extrapolar los resultados in vitro a in vivo como de un tejido blando a otro (tendón/ligamento) dentro de una misma especie⁴⁵ y entre especies distintas¹⁰⁹. Este hecho a veces explica la aparente contradicción entre los resultados de distintos experimentos¹¹⁰.

NOTAS SOBRE LA PREPARACIÓN DEL PRP. EFECTOS DE LA CONGELACIÓN DEL PRP

Como se ha comentado, la composición del PRP es compleja e incluye algunas células, los leucocitos, sobre las cuales existe cierta controversia. Algunos autores relacionan la presencia de leucocitos con algunas eventuales reacciones inflamatorias pasajeras que se han observado tras la administración de PRP. Fortier¹⁰³ considera que los resultados terapéuticos del PRP dependen de si éste se ha congelado o no antes de la aplicación y de la concentración de leucocitos en el preparado final. De tal manera que, si el PRP se aplica sin congelar, la concentración de leucocitos está significativamente correlacionada con el incremento de la expresión génica de los mediadores de la inflamación (metaloproteinasas de la matriz -3 y -13; MMP-3,-13) en ambos TFDS y LS equinos¹⁰³. Sin embargo, cuando el PRP se congela, los leucocitos se lisan, las MMP-3 y -13 se inactivan, se amortigua la respuesta catabólica y desaparece la correlación entre la concentración de leucocitos y la expresión de las citoquinas catabólicas. El PRP puede ser mantenido en congelación durante 6 meses. (Cuadro 1)

En contraposición a las ventajas mencionadas, pensamos que la congelación del PRP supone también la lisis de otro de sus componentes, las células indiferenciadas circulantes en la sangre periférica, que están presentes en pequeño número pero cuyo efecto sobre el resultado terapéutico final aún no se ha evaluado. Tampoco se sabe si se trata de varios tipos celulares ya que se nombran de diferentes formas: LUC's (Large unstained cells), pericitos, precursores de los monocitos, mesangioblastos, precursores de las células endoteliales vasculares, células progenitoras endoteliales. Según algunos autores estas células se forman en la médula ósea¹¹¹. Para obtenerlas se administra al paciente GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) con el fin de movilizar las células desde el interior del hueso a la sangre. Al cabo de un tiempo, se procede a la extracción de sangre periférica, se aíslan las células progenitoras endoteliales marcándolas (AC133+, CD34+) y se cultivan⁸⁶⁻⁸⁷. Los cultivos autólogos obtenidos son reinyectados en la lesión del paciente.

MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE PRP

Existen diferentes procedimientos y tecnologías para la obtención de PRP¹¹²⁻¹¹⁵ que se promocionan en base al coste de obtención del PRP y a la concentración de plaquetas conseguida.

EL COSTE

Es un argumento que recientemente se ha visto relativizado desde que se sabe que el PRP se puede congelar y que a -20°C conserva la actividad de los factores de crecimiento durante 6 meses. Los factores de crecimiento, como todas las proteínas, pierden su actividad tras repetidas congelaciones, por lo que el PRP inicialmente obtenido debería dividirse en alícuotas de 3 -5 ml en jeringas de 6ml y congelarse.

LA CONCENTRACIÓN DE PLAQUETAS

Es probable que la concentración de plaquetas aún siendo importante, se haya sobreestimado. Los factores de crecimiento actúan por unión a los receptores presentes en la superficie de las membranas celulares y activando cascadas de señales intracelulares. Una vez que los receptores han sido ocupados por los FC, estos son internalizados por la célula de forma que el estímulo de esa señal no actúa de forma perpetua, lo que podría conducir a una proliferación celular y crecimiento incontrolados (como en el cáncer). Así pues, una vez que la población de receptores celulares se ha saturado, la adición de más factores de crecimiento no parece tener mucho sentido. Se desconoce la duración de la unión FC-TKR. Se desconoce la concentración óptima de plaquetas o de FC que hay que aportar en el tratamiento de las lesiones de los tejidos de los equinos, pero se sabe que en los tejidos sanos (TFDS y LS) la respuesta a los FC se maximiza cuando la concentración de plaquetas es 4 veces la del plasma normal o algo menor⁶⁴. No existen datos equivalentes para el caso del cartílago. Por tanto, no hay un motivo claro para utilizar procedimientos o tecnología por los que se obtiene una concentración de plaquetas superior a 4 veces la concentración basal. Por otra parte, la concentración de leucocitos debería minimizarse y, en cualquier caso, no sobrepasar la concentración o recuento presente en la sangre venosa.

FARMACOCINÉTICA

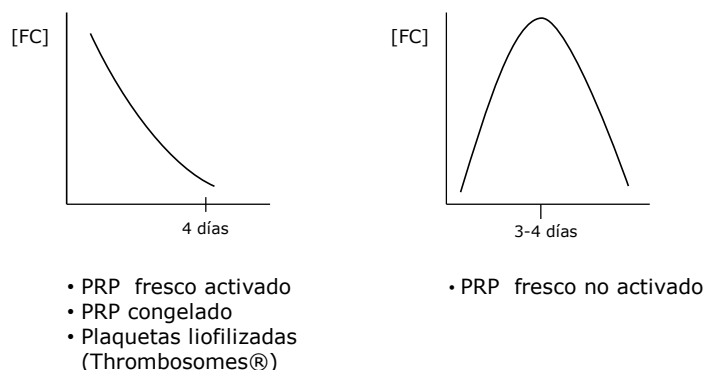
La administración de PRP fresco activado (cloruro cálcico), PRP congelado o plaquetas liofilizadas, proporciona la máxima concentración inicial de FC. Dicha concentración va disminuyendo a lo largo de los siguientes 3 ó 4 días. Sin embargo, cuando se administra PRP fresco no activado, se estima que la liberación de los FC se va produciendo progresivamente durante las siguientes 92 horas^{45,116}. (Fig. 3)

Cuadro 1. **Tipos de PRP.**

TIPOS	VENTAJAS	INCONVENIENTES
FRESCO:		
ACTIVADO	Máx [FC]	MMP's (-3,-13)? muerte CMs
NO ACTIVADO: Uso inmediato:	Liberación FC 3-4 días CMs	MMP's (-3,-13)?
Uso diferido : (horas)	Idem + IL-ra (IRAP)	MMP's (-3,-13)?
CONGELADO :	Máx [FC] Inactivación MMP's Conservación: 6 meses	Muerte CMs

Elaboración propia. Isidro Abellanet

Fig. 3. **Farmacocinética del PRP**



Elaboración propia. Isidro Abellanet. Basado en Mc Carrel T, Fortier L. (2009)

REACCIONES ADVERSAS

Las escasas reacciones adversas que se citan se han observado cuando el PRP se ha inyectado durante la fase inflamatoria inicial (1 a 10 días del inicio de la lesión), por lo que se desaconseja el uso de PRP durante los primeros 10-15 días de la lesión. Se sospecha que dichas reacciones son de tipo citotóxico y motivadas por los leucocitos^{79,103-106}.

COMENTARIO

Hasta aquí se ha querido hacer un breve recorrido sobre las aproximaciones maestras de la terapia regenerativa. A continuación se expondrá el trabajo realizado durante estos últimos cuatro años (2004-2008), centrado en una modalidad de la segunda aproximación, el PRP. El plasma rico en plaquetas utilizado en esta investigación no se ha congelado, por lo que en su compleja composición también incluye algunas células indiferenciadas cuyo potencial efecto sobre el resultado final es difícil de evaluar; en cualquier caso, ese efecto pertenecería al **complejo "PRP no congelado"**.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ross MW: Lameness in Horses: Basics facts before starting. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 4.
2. Dyson S, Murray R, Tranquille C, Adams V. Association of Type of Sport and Performance Level with Anatomical Site of Orthopaedic Injury and Injury Diagnosis. In Proceedings EspoM Aachen 2006.
3. Smith RKW, Goodship AE. Tendon and ligament physiology. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, (eds): *Equine Sports Medicine and Surgery*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2004.
4. Caron JP, Genovese RL. Principles and practices of joint disease treatment. In: Ross MW, Dyson SJ(eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 746-64.
5. Asheim A: Surgical treatment of tendon injuries in the horse, J Am Vet Med Assoc 1964; 145:447.
6. Dowling BA, Dart Aj, Hodgson DR, Smith RK. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet J*. 2000 Se;32(5):369-78.
7. Wilson JH, Robinson LA, Jensen RC, McArdeJ CJ. Equine Soft Tissue Injuries Associated with Racing: Descriptive Statistics from American Racetracks. Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996.
8. Genovese R, Reef VB, Longo KL, Byrd JW, Davis WM. Superficial Digital Flexor Tendonitis: Long Term sonographic and Clinical Study of racehorses. Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996.
9. Jorgensen JS, Genovese RL. Superficial Digital Flexor tendonitis. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 628-635.
10. Dyson SJ, Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J*. 2004;36;415-9.
11. Marr CM, Love S, McKellar Q. Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses. *Vet. Rec.*1993;132;476-479.
12. Davis CS, Smith RKW, Diagnosis and Management of Tendon and Ligament Disorders. In: Auer JA, Stick JA, *Equine Surgery.3rd* Saunders Elsevier, 2006.

13. Smith RKW. Pathophysiology of Tendon Injury. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 616-628.
14. Goodship A. The Pathophysiology of the tendon and ligament injuries and the role of the stem cells in their treatment. Proceedings EspoM Aachen 2006.
15. Clegg P. Tendon Injury and Repair at a Cellular Level. Proceedings BEVA Congress 2005.
16. Richardson LE, Dughia J, Clegg PD, Smith R. Stem cells in veterinary medicine- attempts at regenerating equine tendon after injury. Trends in biotechnology. 2007 sep;25(9):409-16.
17. Clegg PD, Strassburg S, Smith RK. Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. International Journal of experimental pathology. 2007 Aug;88(4):227-35.
18. McIlwraith CW. Management of osteoarthritis and traumatic joint disease. In: Proceedings of Conference on Equine Sports Medicine and Science 2006. Cambridge. England. Pp109-131.
19. Steinert A, Ghivizzani S, Rethwilm A, et al: Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. Arthritis Res and Therapy. 2007;9:213.
20. Smith RKW. State-Of-The-Art and Future Prospects for Tendon Repair. Proceedings BEVA 2005.
21. Smith RKW. Mesenchymal Stem Cells- Theory and Application. Proceedings 15th ECVS Annual Meeting. Sevilla. Spain. 2006.
22. Bilzer T. Grundlagen der Stammzelltherapie. In Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten. Essen. Deutschland. 2007.
23. Mountford D. The development, Clinical Application and Evidence based Outcomes of Stem Cell Therapy for Tendon and Ligament Injuries. Proceedings EspoM Aachen 2006.
24. Mountford D. The Clinical Use of Stem Cells in the Treatment of Equine Tendon and Ligament Injuries. In Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten. Essen. Deutschland. 2007.
25. Nixon A. From growth Factors to Cell Transplants – What is the Way Forward in Cartilage Repair?. Proceedings 15th ECVS Annual Meeting. Sevilla. Spain. 2006.
26. Nixon A. New Therapies in the Treatment of Cartilage Trauma and Arthritis. In Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten. Essen. Deutschland. 2007.

27. Nixon A. Injectable Treatment Options for Tendinitis: Choosing Between Growth Factors, Bone Marrow Aspirate, Platelet Enriched Plasma or Cultured Stem Cell. In Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten. Essen. Deutschland. 2007.
28. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. Science. 1993 May;260(5110):920-6
29. Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Gooch C, Galloway MT, West JR, Dunn MG, Butler DL. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. Tissue Eng. 2006. 12,369-379.
30. Kolf C, Cho E, Tuan RS. Biology of adult stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Research & Therapy. 2007;9:204.
31. Vidal MA, Kilroy GE, Johnson JR, López MJ, Moore RM, Gimble Jm. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. Vet Surg. 2006. 35:601-610.
32. Mitchell RD. Treatment of Tendon and Ligament Injuries with UBM Powder. In Proceedings of Conference on Equine Sports Medicine and Science . Cambridge. England. 2006.
33. Chung C, Burdick JA: Engineering Cartilage Tissue. Adv Drug Deliv Rev. 2008; 1460(2):243-262.
34. Murphy DJ, Nixon AJ. Biochemical and Site-Specific Effects of Insulin-Like Growth Factor I on Intrinsic Tenocyte Activity in Equine Flexor Tendons. Am J Vet Res. 1997 Jan;58(1):103-9.
35. Dahlgren LA, Marjorlein CH, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ. Insulin-like Growth Factor-I Improves Cellular and Molecular Aspects of Healing in a Collagenase-Induced Model of Flexor Tendinitis. J Orthop Res 2002;20:910-919.
36. Dahlgren LA, Mohamed HO, Nixon AJ. Expression of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Healing Tendon Lesions. J Orthop Res 2006 Feb;24(2):183-92.
37. Dahlgren LA, Mohamed HO, Nixon AJ. Temporal expression of Growth Factors and Matrix Molecules in Healing Tendon Lesions. J Orthop Res 2005 Jan;23(1):84-92.
38. Goodman SA, May SA, Heinegard D, Smith RK. Tenocyte Response to Cyclical Strain and Transforming Growth Factor Beta is dependent upon Age and Site of Origin. Biorheology. 2004;41(5):613-28.

39. Donnelly BP, Nixon AJ, Haupt JL, Dahlgren LA. Nucleotide Structure of Equine Platelet-derived Growth Factor-A and -B and Expression in Horses with Induced Acute Tendinitis. *Am J Vet Res.* 2006 Jul;67(7):1218-25.
40. Haupt JL, Donnelly BP, Nixon AJ. Effects of Platelet-derived Growth Factor-BB on the Metabolic Function and Morphologic Features of Equine Tendon in Explant Culture. *Am J Vet Res.* 2006 Sep;67(9):1595-600.
41. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendón and ligament healing. *Sports Med* 2003;33(5):381-94.
42. Tong, JC; Yao, SL. Novel scaffold containing transforming growth factor-beta 1 DNA for cartilage tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers.* 2007;22:232-244.
43. Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F, et al: Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology.* 2001;42:79-87.
44. Pietramaggiore G, Kaipainen A, Ho D, et al: Trehalose lyophilized platelets for wound healing. *Wound Repair Regen.* 2007; 15: 213-220.
45. 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.* 2009.
46. van Miert AS: Present concept on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. *Vet Res Commun.* 2002; 26:111-126.
47. Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, et al: Flexor tendón healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. *J Hand Surg Am.* 2002;27:615-620.
48. Hosaka Y, Kirisawa R, Yamamoto E, et al: Localization of cytokines in tendinocytes of the superficial digital flexor tendón in the horse. *J Vet Med Sci.* 2002 ;64:945-947.
49. Wang XT, Liu PY, Tang JB: Tendon healing in vitro: modification of tenocytes with exogenous vascular endothelial growth factor gene increases expression of transforming growth factor beta but minimally affects expression of collagen genes. *J Hand Surg.* 2005 ;30(2):222-9.
50. Jann HW, Stein LE, Slater DA: In Vitro Effects of Epidermal Growth Factor or Insulin-Like Growth Factor on Tenoblast Migration on Absorbable Suture Material. *Veterinary Surgery.* 2004; 28(4):268-278.)
51. Britton A, Humphrys S, Woodward R. Intratendinous Administration of Tendotrophin® (IGF-1) Injection Following Induced Tendonitis Leads to Superior Tendon Healing. In

- Proceedings of Conference on Equine Sports Medicine and Science . Cambridge. England. 2006.
- 52.Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE: A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(5):403-12.
- 53.Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ. Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-I enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg Br*. 2007 May;89(5):672-85.
- 54.Fortier LA, Müller Bj, Cerione RA. The small G-protein Cdc42 is involved in insulin-like growth factor-I resistance in aging chondrocytes.
- 55.Martin JS, Ellerbrocke SM, Buckwalter JA. Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factors binding proteins. *J Orthop Res* 1997;15;491-98.
- 56.Hickey DG, Frenkel SR, Di Cesare PE. Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am J Orthop* 2003 Feb;32(2):70-6.
- 57.van den Berg WB, van der Kraan PM, Scharstuhl A, van Beningen HM. Growth factors and cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001 oct;(391 suppl):244-50.
- 58.Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis cartilage* 2006 May;14(5)403-12.
- 59.Yaeger P, Masi TL, Buck JL, Binette F, Ross T, McPherson JM. Synergistic action of transforming growth factor- β and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Experimental Cell Res*. 1997;237;2;15 dec;318-25.
- 60.Herthel DJ. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. *AAEP Proceedings* 2001; 319-321.
- 61.Herthel DJ. Clinical use of stem cells and marrow components to stimulate suspensory ligament regeneration. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 673-674.
- 62.Fortier LA, Management of Superficial Digital Flexor Tendonitis. Proceedings of Conference on Equine Sports Medicine and Science . Cambridge. England. 2006.
- 63.Smith JJ, Ross MW, Smith RK. Anabolic Effects of Acellular Bone Marrow, Platelet Rich Plasma, and Serum on Equine Suspensory Ligament Fibroblasts in Vitro. *Vet. Comp Orthop Traumatol*. 2006;19(1):43-7.

64. Schnabel LV, Mohammed HO, Jacobson MS, Fortier LA. Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explants cultures. *Equine Vet J.* 2008;40(3):260-5.
65. Schnabel LV, Mohamed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, Fortier LA. Platelet rich Plasma Enhances Gene Expression Patterns in Flexor Digitorum Superficialis Tendons. *J. Orthop Res.* 2007, Feb;25(2):230-40.
66. Akeda K, An HS, Okuma M, et al: Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(12):1272-80.
67. Carmona JU, Argüelles D, Climent F. Report of the intraarticular treatment with platelet rich plasma in 7 horses with joint disease. In *Proceedings 14th ECVS Annual Meeting.* Lyon. France. 2005.
68. Argüelles D, Carmona JU, Climent F. Platelet Rich Plasma as a Treatment of Tendon and Ligament Injuries in the Horse. In *Proceedings 14th ECVS Annual Meeting.* Lyon. France. 2005.
69. Prades M, Abellanet I, Carmona JU, Argüelles D, Masri M. Platelet Rich Plasma: A Realistic Alternative in Tissue Repair. *Proceedings 15th ECVS Annual Meeting.* 2006. Sevilla. Spain.
70. Waselau M, Sutter WW, Genovese RL, Bertone AL. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *JAVMA* 2008; 232,10, 1515-20.
71. McIlwraith CW. Management of osteoarthritis and traumatic joint disease. In: *Proceedings of Conference on Equine Sports Medicine and Science 2006.* Cambridge. England. pp120.
72. Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW. Evaluation of autologous conditioned serum using an experimental model of equine osteoarthritis. *AAEP Proceedings* 2005;51:374-375.
73. McIlwraith W. Orthokine: A Revolution in Therapy of OA?. *Proceedings 15th ECVS Annual Meeting.* 2006. Sevilla. Spain.
74. Jarloev N. IRAP: A Treatment in Chronic Inflammation in Joints, Tendon Sheaths and Bursa Podotrochlearis. In *Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten.* Essen. Deutschland. 2007.
75. Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res.* 2007 Mar;68(3):290-6.

76. Weinberger T. Regenerative therapies- IRAP / Orthokine. In: AGP-meeting Applying Regenerative Therapies for tendón and Joint caused Lameness of Horses. Bonn. 6-7 october 2008.
77. Miyatake S, Tohyama H, Kondo E, et al: Local administration of interleukin-1 receptor antagonist inhibits deterioration of mechanical properties of the stress-shielded patellar tendón. *J Biomech* 2008; 41(4): 884-9.
78. Gueorguieva I, Clark SR, McMahon, et al: Pharmacokinetic modelling of interleukin-1 receptor antagonist in plasma and cerebrospinal fluid of patients following subarachnoid haemorrhage. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65(3):317-25.
79. Smith RKW, Korda M, Blunn GW, Goodship AE. Isolation and implantation of autologous stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J.* 2003; 35; 99-101.
80. Smith RKW, Webbon DM. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn?. *Br. J.Sports Med.* 2005;39;582-584.
81. Brehm, W. Stammzelltherapie von Sehnenläsionen beim Pferd. In Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten. Essen. Deutschland. 2007.
82. Nixon AJ, Haupt JL, Dahlgren LA. Adipose-derived nucleated cell fractions improve tendón repair in collagenase-induced tendinitis model. *Equine Vet J.* 2007.
83. Nixon Aj, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res.* 2008 Jul;69(7):928-37.
84. Del Bue M, Ricco S, Ramini R, Conti V, Gnudi G, Grolli S. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Vet Res Comm.* 2008 ;32: 51-55.
85. Giovannini S, Brehm W, Mainil-Barlet P, Nesic D. Multilineage potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. In: Proceedings ECVS 2006; 159-161.
86. Hester J: Peripheral blood stem cell collection: the interaction of technology, procedure, and biological factors. *Transfus Sci.* 2000;23(2):125-32.
87. Moog R: Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells. *Current Stem Cell Ther.* 2006;1(2):189-201.
88. Higuchi A, Sekiya M, Gomei Y, et al: Separation of hematopoietic stem cells from human peripheral blood through modified polyurethane foaming membranes. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85(4):853-61.

89. Im G, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?. *Osteoarthritis cartilage*. 2006;13:845-53.
90. Guest DJ, Smith MRW, Allen WR: Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet J* 2008; 40(2): 178-181.
91. Smith RKW, Zunino L, Webbon PM, Heinegard D. The distribution of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in Tendons and its variation with Tendon Site, Age and Load. *Matrix Biol* 1997;16:255-271.
92. Davis WM. The Clinical Application of Scar Remodeling in Disease States. In *Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996*.
93. Watkins JP, Auer JA, Gay S, Morgan SJ. Healing of Surgical Created Defects in the Equine Superficial Digital Flexor tendon: Collagen-Type Transformation and Tissue Morphologic Reorganisation. *Am J Vet Res*. 1985;46:2091-2096.
94. Vachon AM, McIlwraith CW, Trotter GW, Norrdin RW, Powers BE. Morphologic study of repair of induced osteochondral defects of the distal portion of the radial carpal bone in horses by use of glued periosteal autografts. *Am J Vet Res*. 1991; 52:317-327.
95. McIlwraith CW. Diseases of joints, tendons, ligaments and related structures. In: *Adam's Lameness in Horses, 5th ed*, Ed: T. Stashak, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 459-587.
96. Barry FP, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 2001;268:189-200.
97. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nature Clin Pract* 2006; 2:373-382.
98. Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA, Bent SJ, Williams J, Nixon AJ. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop Res* 2001 ;19:738-749.
99. Frisbie DD, McIlwraith CW. Gene therapy: Future therapies in osteoarthritis. In: *AAEP Proceedings* 2001; 47:21-216.
100. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD et al.. treatment of experimental equine osteoarthritis by an in vivo delivery of the equine—1 receptor antagonist gene. *Gene therapy* 2002; 9:12-20.

101. Southwood LL, McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE et al. Evaluation of Ad-BMP-2 enhancing fracture healing in an infected non-union fracture in a rabbit model. *J Orthop Res* 22:66-72.
102. Morriset S, Frisbie DD, Robbins PD, Nixon AJ, McIlwraith CW: IL-1ra/IGF-1 gene therapy modulates repair of microfractured chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;462:221-8.) (Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE: A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(5):403-12.
103. Fortier LA. Evidence of platelet rich plasma to resolve lameness. In: AGP-meeting Applying Regenerative Therapies for Tendón and Joint Caused Lameness of Horses. Bonn (Germany). 6-7 october 2008.
104. Kluter H, Schlenke P, Muller-Steinhardt, Paulsen M, Kirchner H: Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion* 2003;37:362-367.
105. Stack G, Snyder EL: Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 2003 ;34:20-25.
106. Wadhwa M, Seghatchian J, Lubenko M, Contreras P, Dilger C, Bird R: Cytokine levels in platelet concentrates: quantitation by bioassays and immunoassays. *Br J Haematology* 2003 ;93:225-234.
107. Bütternova I, Bäuml H, Kern F, et al: Release of WBC-derived IL-1 receptor antagonist into supernatants of RBCs: influence of storage time and filtration. *Transfusion* 2002;41:67-73.
108. Schröder AK, von der Ohe M, Fleischer D et al: Differential synthesis of two interleukin-1 receptor antagonist variants and interleukin-8 by peripheral blood neutrophils. *Cytokine*. 2005 7;32(5):246-53.
109. Van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, et al: Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng*. 2006; 12(11):3067-73.
110. De Mos M, van der Windt AE, Jahr H, et al: Can platelet-rich plasma enhance tendón repair ?. A cell culture study. *Am J Sports Med*. 2008; 36(6):1171-8.
111. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11:1198-1211. 2005.
112. Carter Ca, Jolly DG, Worden CE. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 2003;74:244-255.

113. Sutter WW, Kaneps AJ, Bertone AL. Comparison of hematologic values and transforming growth factor- β and insulin-like growth factor concentrations in platelets concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am J Vet Res* 2004;65:924-930.
114. Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M. Evaluation of Single and Double Tube Methods for Concentrating Equine Platelets. *Res Vet Science* 81 (2006)237-245.
115. Nixon A. Preparation and Application of Platelet-Rich Plasma (PRP). In Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten. Essen. Deutschland. 2007.
116. Fortier L.A. Platelet rich plasma - use in tendons, suspensory ligaments and joints. Materials and methods. In: AGP-meeting Applying Regenerative Therapies for Tendon and Joint Caused Lameness of Horses. Bonn (Germany). 6-7 october 2008.
117. Clegg P. Stem Cell Therapy. In: AGP-meeting Applying Regenerative Therapies for Tendon and Joint Caused Lameness of Horses. Bonn (Germany). 6-7 october 2008.
118. McClure S. Shockwave Therapy. In: AGP-meeting Applying Regenerative Therapies for Tendon and Joint Caused Lameness of Horses. Bonn (Germany). 6-7 october 2008.
119. Cleveland RO, Chitnis PV, McClure S. Acoustic Filed of a Ballistic Source: The veterinary EMS Swiss Doloclast. *J Ult Med Biol* 33:1327-13335. 2007.
120. McClure S. Evidence that Shock Waves Resolves Lameness. In: AGP-meeting Applying Regenerative Therapies for Tendon and Joint Caused Lameness of Horses. Bonn (Germany). 6-7 october 2008.
121. McClure S, van Sickle D, Evans R, et al: The effects of extracorporeal shock-wave therapy on the ultrasonographic and histologic appearance of collagenase-induced equine forelimb suspensory ligament desmitis. *J Ultrasound Med Biol* 30: 461-467. 2004.
122. Camimoto EH, Alves AL, Amorim RL, et al. Ultrastructural and immunocytochemical evaluation of the effects of extracorporeal shock wave treatment in the hind limbs of horses with experimentally induced suspensory ligament desmitis.
123. Kersh K, McClure S, Van Sickle D. The Evaluation of Extracorporeal Shock Wave Therapy on Collagenase-Induced Superficial Digital Flexor Tendonitis. *Vet Comp Orthop Trauma* 19:99-105, 2006.
124. Wen-Wei Hsu R, Wei-Hsiu Hsu, Ching-Lung Tai, et al. Effect of shock-wave therapy on patellar tendinopathy in a rabbit model. 2003

125. Ching-Jen Wang, Feng-Sheng Wang, Kuender D Yang, et al. The effect of shock wave treatment at the tendon-bone interface. AN histomorphological and biomechanical study in rabbits.
126. Young-Jen Chen, Ching Jen Wang, Kuender D Yang, et al. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF- β 1 and IGF-I expression.
127. Dahlberg JA, McClure S, Evans RB, et al. Force platform evaluation of lameness severity following extracorporeal shock wave therapy in horses with unilateral forelimb lameness.
128. Bolt DM, Burba DJ, Hubert JD, Pettifer GR, and Hosgood GL. Evaluation of cutaneous analgesia after non-focused extracorporeal shock wave application over the 3rd metacarpal bone in horses. *Can J Vet Res.* 2004.October; 68(4): 288–292.
129. Moretti B, Iannone F, Notarnicola A, et al..Extracorporeal shock waves down-regulate the expression of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008; 9:16.

3. OBJETIVOS

1. El objetivo de este trabajo es evaluar la posible eficacia del tratamiento de las lesiones agudas y crónicas que afectan al tendón flexor digital superficial (TFDS), tendón flexor digital profundo (TFDP), ligamento accesorio del tendón flexor digital profundo (LATFDP), ligamento suspensor (LS) y articulaciones de caballos de distintas disciplinas deportivas, mediante la administración de PRP autólogo, obtenido por el método de tubo y doble centrifugación.
2. Evaluar el efecto del PRP autólogo, obtenido por el método de tubo y doble centrifugación, sobre algunos biomarcadores (GAGs, COMP y AH), cuando se administra como tratamiento de lesiones agudas y crónicas de los tejidos blandos y articulaciones de caballos de deporte.
3. Obtener conclusiones que puedan ayudar a orientar un protocolo de tratamiento, mediante la documentación y evaluación de:
 - a) Los recuentos plaquetarios en el momento de la obtención de la muestra de sangre.
 - b) El número de dosis de PRP administradas y los efectos dependientes.
 - c) Los resultados del examen clínico y ecográfico.
 - d) Los resultados deportivos y las recaídas.
 - e) Los efectos del PRP a nivel bioquímico, basándose en la valoración cuantitativa de algunos biomarcadores (GAGs, COMP, AH).
4. Evaluar la inocuidad del tratamiento con PRP autólogo, obtenido por el método de tubo y doble centrifugación, de las lesiones de tejidos blandos y articulaciones del caballo.

CAPÍTULO 1
TEJIDOS BLANDOS

1.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

EPIDEMIOLOGÍA

Las lesiones de los tendones y ligamentos son frecuentes en los caballos y representan un reto terapéutico. A pesar del esfuerzo de mentalización y difusión cultural realizado entre todas las personas dedicadas a la medicina veterinaria del caballo sobre la importancia de la detección precoz de la lesión, de la tecnología orientada al diagnóstico por imagen y del rango de tratamientos disponibles¹, el porcentaje de recaídas es muy alto, variando según la especialidad deportiva entre el 43% y el 93%²⁻⁶.

La incidencia de las lesiones de los tendones y ligamentos se ha estimado entre el 11% y el 46%⁷⁻⁹. Concretamente en el PSI, las lesiones de los tendones constituyen la causa más importante de retirada de las carreras¹⁰. Las lesiones del TFDS son las más frecuentes entre los tejidos blandos distales al carpo. El 93% de las lesiones de tendones y ligamentos en los caballos National Hunt afectan al TFDS¹. En otras disciplinas deportivas, tales como las carreras de trotadores (*Standardbreds*) y las competiciones de salto, doma, resistencia, polo, doma vaquera y enganches, se observa un incremento de lesiones del LS, TFDP y el ligamento accesorio del TFDP (LATFDP). Se supone que el TFDS y el LS son más propensos a las lesiones que el TFDP porque los primeros reciben la carga en el momento de apoyo, mientras que el TFDP interviene algo más tarde. Cada especialidad deportiva conlleva un escenario propio donde el caballo, el hombre y el terreno interactúan de forma particular, requiriendo esfuerzos anatómicos específicos y propendiendo a determinadas lesiones.

TENDONES Y LIGAMENTOS. DEFINICIÓN Y FUNCIONES.

La distinción entre tendones y ligamentos normalmente se ha basado en aspectos anatómicos; los tendones se interponen en la unión músculo-hueso, mientras que los ligamentos intervienen en la unión hueso-hueso. Las investigaciones sobre la topografía, la biomecánica, la ultraestructura y la composición de la matriz han revelado una combinación de estas dos estructuras en una serie de tendones y ligamentos anatómicamente "puros"⁷.

Los tendones y ligamentos pueden tener una función meramente "posicional", tal es el caso del tendón extensor digital común (TEDC), o actuar como elementos "elásticos que almacenan energía" para lograr una locomoción eficiente, como es el caso de los tendones TFDS y TFDP y el ligamento LS. La energía acumulada se libera durante la fase de propulsión. Estos tendones "acumuladores de energía" cuentan con unos ligamentos accesorios que unen el tendón directamente al hueso, brindando un soporte en los momentos de carga máxima^{7,40,41}.

Los ligamentos periarticulares alinean y estabilizan huesos adyacentes y proporcionan una resistencia pasiva frente al movimiento. Los ligamentos están sujetos a fuerzas con múltiples vectores direccionales dependiendo del grado de movilidad de la articulación¹¹.

DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ASOCIADAS A LA FUNCIÓN.

Estas distintas funciones parecen llevar parejas algunas especificidades en la composición química y en la estructura de estos tejidos¹².

Por lo que respecta a los tendones, las cargas que soportan son muy distintas. Los tendones extensores sólo reciben cargas bajas, mientras que los flexores las reciben altas y de forma sostenida (7-10 KN en el TFDS)¹³. Los tendones extensores están menos hidratados y contienen más colágeno que los flexores. El contenido en la COMP es más alto en los flexores que en los extensores, especialmente en edades tempranas antes de llegar a la madurez del tendón (2 años de edad) y, en los adultos, en las zonas de compresión, donde hay un cambio de dirección del tendón^{7,15}.

En lo que concierne a los ligamentos periarticulares, a pesar de presentar una composición similar a los tendones, son más complejos desde el punto de vista anatómico, con múltiples haces fasciculares que a menudo presentan una apariencia espiralada, y se tensan y relajan en distintas posiciones articulares, dependiendo del haz fascicular. Además de proveer un soporte para la articulación, también aportan información propioceptiva. La capsula articular fibrosa está muy vinculada a estos ligamentos y funciona de un modo muy similar, de forma que puede considerarse como un ligamento "honorario"⁷.

Las fibras de colágeno en los tendones siguen una disposición paralela, mientras que en los ligamentos se disponen en distintas direcciones y con menos entrecruzamientos a efectos de poder asistir cargas multiaxiales. Los ligamentos contienen algo menos de colágeno total y con una mayor proporción de colágeno tipo III y Glicosaminoglicanos (GAG). Los fibroblastos de los ligamentos tienden a tener una forma más alargada.

ESTRUCTURA BÁSICA COMÚN

Los tendones y ligamentos son tejidos conectivos fibrosos caracterizados por una precisa organización de fibroblastos embebidos en una matriz extracelular (MEC) rica en colágeno. Las fibras de colágeno guardan una disposición en fascículos paralelos a lo largo de las líneas de tensión. Los fibroblastos también se disponen longitudinalmente entre las fibras de colágeno y sus citoplasmas se extienden transversalmente, envolviendo las fibras de colágeno, creando una red tridimensional de uniones GAP célula-célula y célula-MEC.

1. CÉLULAS

Aunque al conjunto de células se les denomina tenocitos, es probable que no se trate del mismo tipo celular. Se han identificado 4 grupos: I, II, III y IV, este último en el endotenon. Se desconoce su actividad individual porque no hay marcadores específicos para cada tipo ni procedimientos para la recogida específica. Los tenocitos están relacionados con los fibroblastos pero no se sabe hasta qué punto⁷.

Además, hay otras células: los fibroblastos del endotenon, epitenon y paratenon y células de tipo sinovial del epitenon en aquellas zonas en las que el tendón está incluido en la vaina.

Es probable que el metabolismo del tenocito esté regulado por los estímulos mecánicos y por el estímulo de las citoquinas. Los tenocitos requieren la adición de FC (TGF- β) para que respondan a estímulos tensiles. La síntesis y distribución de TGF- β en el TFDS varía con la edad; los niveles más altos se detectan en animales jóvenes y, sobre todo, en el endotenon.

2. MATRIZ DEL TENDÓN

La MEC de los tendones y ligamentos se puede dividir en dos componentes principales: la sustancia básica amorfa y los elementos fibrosos.

a) La sustancia básica es un gel amorfo constituido por complejos de carbohidratos-proteínas hidrofílicos (glicoproteínas estructurales no colágenas) y agua. Los tendones y ligamentos normales contienen un 65% a 70% de agua. Las proteínas no colágenas suponen el 5%-6% de la materia seca del tendón y ligamento, pero juegan un papel muy importante en las interacciones célula-célula y célula-MEC, así como en la fibrillogénesis del colágeno, el control del diámetro de las fibrillas de colágeno y la homeostasis del tendón y ligamento.

Las glicoproteínas no colágenas son esenciales para la organización y función del tejido¹⁴ y se suelen dividir en tres grupos:

COMP: Los niveles de la COMP son más altos al nacer y van aumentando sobretodo en las zonas de tensión. Después de la madurez del tendón (2 años de edad), los niveles de la COMP decaen en las zonas de tensión pero no en las zonas de compresión (Ej: a nivel del menudillo)^{14,15}. Se sospecha que su función es unir colágeno fibrilar: puede capturar 5 moléculas de colágeno para unir las en una fibrilla durante las fases iniciales de formación de fibrillas. Luego se suelta. No se une a fibrillas ya formadas. In vitro se ha visto que puede acelerar la fibrillogénesis y parece que actúa más como una molécula organizadora que estructural¹⁶. Esto podría explicar el hecho de que su presencia sea máxima durante la edad de crecimiento y madurez del tendón y que luego vaya decayendo con la edad. Se ha observado que existe una clara y positiva correlación entre los niveles de la COMP y las propiedades mecánicas del TFDS durante la maduración esquelética¹⁷.

Proteoglicanos: Pueden dividirse en dos grupos: los proteoglicanos grandes (agrecanos, presentes en el cartílago articular, y su equivalente en el tejido blando, los versicanos) y los pequeños (decorín, biglucano, fibromodulina, lumicano, mimicano). Los proteoglicanos grandes retienen agua y son más abundantes en las zonas de compresión. De los pequeños, el decorín está muy presente en las zonas de tensión; una fibra de colágeno tipo I e interviene en los entrecruzamientos (*crosslinks*) no covalentes, es decir, en la capacidad tensil. La fibromodulina interviene en la morfología fibrilar. Estos pequeños proteoglicanos se unen a factores de crecimiento como TGF- β .

Otras proteínas no colágenas: Su función no está aclarada. Trombospondina 4, tenascina C, fibronectina, ácido hialurónico, elastina. Y una gama de colágenos menores especialmente presentes en el endotenon.

b) La porción fibrosa Está compuesta de colágeno y elastina. La elastina supone el 1%-2% de la sustancia seca y contribuye dotando de elasticidad a estos tejidos. El colágeno representa cerca del 80% de la materia seca. En los tendones el 95% del colágeno total es colágeno tipo I, mientras que en los ligamentos este porcentaje es menor (85%). El resto del colágeno total está constituido por colágeno tipo III y, en menor proporción, por otros tipos de colágeno.

El colágeno tipo II es el que predomina en el cartílago articular, pero también se detecta su presencia en las uniones tendón-hueso y en las zonas de compresión del tendón.

El colágeno tipo III se detecta sobre todo en el endotenon y ligamentos.

La estructura del colágeno se asienta en la organización jerarquizada de subunidades de tamaño decreciente, que podemos esquematizar de la siguiente forma:

Tropocolágeno > microfibrillas > subfibrillas > fibrillas > fibras > fascículos (forma ondulada) > unión de fascículos por endotenon. El endotenon se continúa hacia la periferia del tendón, envolviéndolo con lo que se conoce como epitenon. En las zonas en las que el tendón no está incluido en la vaina sinovial, alrededor del epitenon se localiza otra capa fibrosa conocida como paratenon (Figura 1).

El ojo humano puede apreciar la estructura fascicular, pero se necesita la microscopía óptica para observar las fibras y la electrónica para poder ver las fibrillas y las subunidades inferiores.

Las fibrillas de colágeno se unen unas con otras mediante entrecruzamientos covalentes ("crosslink"), que en el caso del colágeno tipo I se produce entre la lisina e hidroxiprolina. El β -aminopropionitrilo (BAPTEN) inhibe estos entrecruzamientos covalentes¹⁸. Otro tipo de entrecruzamiento es el no-covalente (electrostático), que se produce entre los proteoglicanos y glicoproteínas que envuelven las fibrillas de colágeno. Este tipo de enlace no es tan fuerte como el covalente, pero se produce en gran número y se supone que, finalmente, es el responsable más importante de las propiedades mecánicas del tendón.

3. ENDOTENON, EPITENON Y PARATENON

El endotenon porta vasos y nervios y en él residen tipos celulares que se sospecha son mesenquimales indiferenciados. En el endotenon se encuentran FC como TGF-beta. El endotenon se continúa alrededor del tendón en lo que se conoce como epitenon. Alrededor del epitenon, en las zonas sin vaina sinovial, existe una envoltura fibrosa y elongable, el paratenon, que se supone aporta vasos sanguíneos y elementos celulares para la reparación.

En aquellas zonas donde la trayectoria del tendón cambia de dirección, el tendón queda envuelto en una vaina que contiene líquido sinovial para facilitar el deslizamiento del tendón. En el interior de la cámara sinovial se encuentra el mesotenon, a modo de tabique que puede dividir la vaina en dos compartimentos completamente separados o no. Algunas veces el mesotenon porta vascularización para el tendón.

4. IRRIGACIÓN

Los tendones se nutren por perfusión y por difusión. Por perfusión a partir del flujo sanguíneo intratendinoso, procedente de la unión músculo-tendinosa y de la inserción ósea, y a partir del flujo extratendinoso procedente de vasos que penetran en el tendón vía paratenon (en la zona sin vaina) o vía mesotenon (en la zona con vaina). El otro mecanismo es por difusión desde el líquido sinovial (en la zona con vaina).

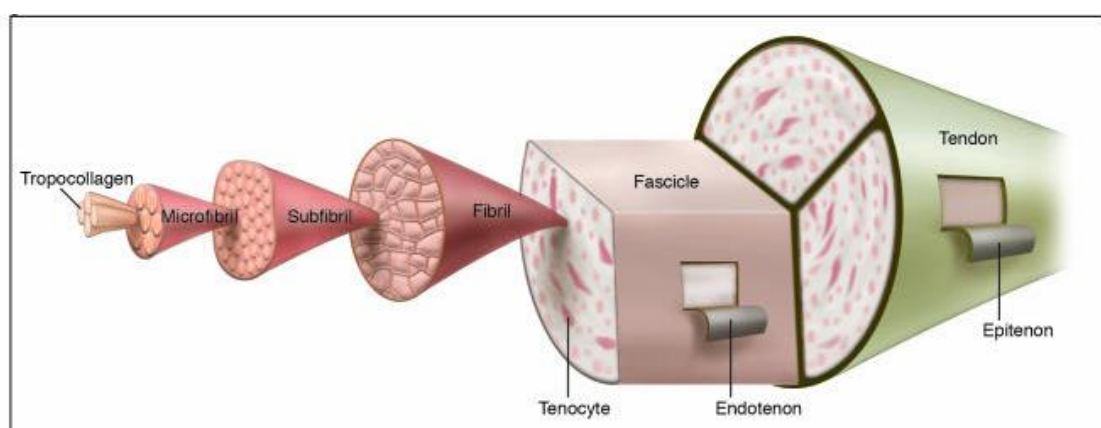


Figura 1. *Tendon structure and composition*. (Aslan H, et al. 2008); J Clin Invest. 2008 February 1; 118(2): 439–444.

CONTROL DE LA HOMEOSTASIS DEL TENDÓN

Los tendones y ligamentos normales están sujetos a finos equilibrios entre procesos anabólicos y catabólicos. Bajo determinadas condiciones de ejercicio, los fibroblastos de los tendones y ligamentos mantienen un equilibrio entre la degradación de la MEC y la síntesis de proteínas reemplazantes. Este equilibrio recae sobre dos grupos de proteínas: las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y los inhibidores tisulares de la metaloproteinasas (TIMPs). MMPs son una familia de enzimas proteolíticas que degradan la MEC y facilitan la remodelación, por lo que son esenciales para el mantenimiento y reparación de los tejidos. La actividad de MMPs está controlada por los TIMPs. Sobre este hecho se basan algunas teorías que explican la fisiopatología de las lesiones.

PATOGENIA DE LA LESIÓN. TEORÍAS. IMPLICACIONES PRÁCTICAS

TEORÍAS CLÁSICAS. SOBRESFUERZO O SOBRESTIMULACIÓN.

Los tendones pueden lesionarse bien por “sobreesfuerzo” o como consecuencia de un traumatismo percutáneo, penetrante o lacerante.

Se cree que las lesiones por sobreesfuerzo se producen como consecuencia de dos posibles situaciones: 1) se produce una sobrecarga repentina que excede la capacidad de resistencia biomecánica, o 2) existe una fase de degeneración previa a la lesión.

Con el primer supuesto explicaríamos que todos los tendones y ligamentos tienen propiedades viscoelásticas, lo que significa que sus propiedades mecánicas varían a medida que se tensan. En la fase inicial de la tensión se produce una elongación otorgada por el alineamiento de los fascículos; en una segunda fase la elongación se basa en la fuerza tensil estructural del tendón o ligamento; cuando se sobrepasa la resistencia tensil, la elongación continúa en base a la ruptura de los entrecruzamientos covalentes entre las fibrillas que permite un deslizamiento entre ellas; si se sobrepasa este punto se produce la rotura tendinosa, que en el caso del TFDS se produce aproximadamente al alcanzar los 12 KN^{7,40,41}.

En el segundo supuesto, la fase de degeneración se podría considerar como la primera fase de la tendinopatía. Durante esta fase algunos autores hablan de una "inflamación molecular"^{17,19} que no induce un proceso de reparación, sino que va debilitando el tendón de forma progresiva. Se sospecha que existen varios mecanismos que pueden contribuir a la degeneración del tendón. Por una parte, se ha observado que con la edad disminuye la presencia de TGF- β en el endotenon a la vez que se observa un cierto grado de senescencia celular que afecta a los tenocitos del endotenon que intervienen en la reparación de los microtraumas. Se cree que la falta de factores de crecimiento es la causa más probable de que los tenocitos no logren sintetizar matriz tendinosa^{20,21}. En los tendones inflamados se ha visto que las citoquinas inflamatorias (IL- α , IL-1 β , TNF- α e IFN γ) se localizan básicamente en el endotenon y en las células epiteliales vasculares²⁰. En la síntesis de matriz tendinosa se ha podido comprobar el efecto sinérgico de TGF-B y el estímulo de las cargas²¹. Por otra parte, las repetidas elongaciones y transferencias de energía que se producen durante el ejercicio conllevan un calentamiento que puede degenerar las proteínas de la matriz²² debido a que la hipertermia local induciría la síntesis de citoquinas proinflamatorias (TNF- α y IL-1 β) por parte de los tenocitos; dichas citoquinas, a su vez, inducen la liberación de MMPs²³. Se han registrado temperaturas de 44°C en el TFDS, aunque parece que los tenocitos pueden resistirlas^{24,25}.

Se han identificado varios **factores de riesgo** que intervienen en la tendinitis: la velocidad, el tipo de superficie, el peso que soporta el caballo, la fatiga^{24,25}, el herraje²⁶.

TEORÍA DE LA ESTIMULACIÓN INSUFICIENTE. *UNDERSTIMULATION*.

Esta propuesta intenta explicar la cascada de sucesos degenerativos en base a los estudios experimentales que muestran que la falta de estímulos sobre las células tendinosas puede ser la responsable de la expresión génica catabólica que deriva en la degradación de la MEC y pérdida de función^{22,23,31}. La falta de cargas equivale a una privación de estrés lo cual, experimentalmente, conduce a un incremento de la expresión génica de MMPs y de apoptosis^{27,28}. Por otra parte, la aplicación de un estrés cíclico inhibe la apoptosis y la expresión de MMP^{28,29}. Esta teoría recibe apoyo adicional con los trabajos que muestran que

la privación de stress disminuye la expresión de TIMP³⁰ y que la aplicación de un estrés cíclico conduce a un incremento de la expresión de TIMP en los fascículos de tendón³⁰. La relación entre el ejercicio y las células del tendón aún no está dilucidada³²⁻³⁴.

Esta teoría apoya la prescripción clínica de cargas de ejercicio controladas durante los periodos de recuperación de las lesiones.

TEORÍA BIOQUÍMICA

Un estudio reciente³⁵ sobre las tendinopatías humanas ha evidenciado en los tenocitos la producción localizada y de origen no neuronal, de sustancias "señales" tradicionalmente confinadas a las neuronas. Estas sustancias incluyen acetilcolina, catecolaminas, sustancia P y glutamato. Además, los receptores para estas sustancias se han encontrado en fascículos nerviosos y en las paredes de los vasos sanguíneos del tejido tendinoso, así como en los propios tenocitos. Estos hallazgos podrían sentar las bases para entender la influencia de estas señales en el dolor, la regulación vascular y/o los cambios tisulares en las tendinopatías. Los mediadores bioquímicos presentes en el tendón pueden influenciar o irritar los nociceptores, localizados en el tendón o su alrededor, y causar dolor crónico. Se ha demostrado la presencia de altas concentraciones de glutamato en humanos con tendinosis crónicas que cursan con dolor³⁶. Más explícitamente, se ha investigado³⁷ mediante métodos inmunohistoquímicos la respuesta de las biopsias de tendones normales y con tendinosis a los anticuerpos contra la tirosina hidroxilasa (TH) y neuropéptido Y, y contra los adrenoreceptores alpha1-, alpha2A- y beta1. De esta forma, se observó que la mayor parte de la inervación simpática se detecta en las paredes de los vasos sanguíneos que entran en el tendón a través del tejido paratendinoso y que el tejido tendinoso propiamente dicho, ya sea normal o patológico, está poco inervado. Se detectaron inmunoreacciones contra los receptores adrenérgicos en fascículos nerviosos que contienen fibras nerviosas sensoriales y simpáticas. Se detectaron niveles altos de estos receptores en las paredes de los vasos sanguíneos; las inmunoreacciones contra los adrenoreceptores alpha1 fueron claramente más pronunciadas en los tendones con tendinosis que en los sanos. Curiosamente, se detectaron inmunoreacciones contra los adrenoreceptores y TH en los tenocitos, sobre todo en aquellos de los tendones con tendinosis. La observación de adrenoreceptores en los propios tenocitos es interesante porque la estimulación de dichos receptores puede guiar las células hacia la proliferación celular o la degeneración y la apoptosis, tal como se ha reconocido en las tendinosis³⁷.

Utilizando la misma base metodológica, en los caballos se ha demostrado la presencia de sustancia P y neurokinina A acompañando la microvascularización de diversos tejidos blandos (TFDP, ligamento impar y ligamento sesamoideo colateral) y la pared dorsal del casco³⁸. En los caballos también se ha demostrado y la presencia de receptores CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) en la bursa navicular, hueso navicular y en los tejidos blandos circundantes (TFDP, ligamento sesamoideo colateral, ligamento impar)³⁹.

IMPLICACIONES PRÁCTICAS

Aunque ninguna de las tres teorías ofrece una explicación integral del problema, sus distintas interpretaciones de la patogenia de la lesión pueden derivarse en sendas consecuencias prácticas. (Tabla 1).

Tabla 1.

TEORÍA	EXPLICA	IMPLICACIONES PRÁCTICAS
"Sobreesfuerzo"	Mecanismo de producción lesión.	Métodos entrenamiento. Profilaxis.
"Infraestimulación"	Adaptación al estrés. La curación requiere un estímulo mínimo.	Métodos entrenamiento. Profilaxis. Programación de la rehabilitación.
"Bioquímica"	Inflamación neurogénica. Ciclo dolor/inflamación.	Orienta tratamiento farmacológico

Existen publicaciones que constituyen una referencia básica en esta temática. En ellas puede verse la evolución de los conocimientos a lo largo de estos últimos años (2003-2007)^{7,40-42}.

MOTIVOS PARA UTILIZAR EL PRP EN TEJIDOS BLANDOS

Creemos que hay dos motivos básicos para utilizar el PRP: por sus efectos sobre la estructura del tendón y del ligamento (neutralización o atenuación de los mecanismos catabólicos de la inflamación; estímulo anabólico regenerativo) y por sus efectos sobre el control del dolor.

1.- PRP incluye FC con efectos anabólicos sobre los tenocitos (diferenciación y multiplicación) y la síntesis de la MEC (Colágeno, COMP)^{18,42,43,45}.

2.- Algunos factores de crecimiento inhiben o neutralizan los efectos de las citoquinas catabólicas, con lo que se preserva la integridad estructural. TGF- β 1 actúa como un antagonista de IL-1, ya sea inhibiendo directamente IL-1 o estimulando la liberación de IL-1ra⁴⁴⁻⁴⁶.

3.- Dependiendo de la concentración de leucocitos y del tiempo de almacenamiento, en los sobrenadantes de los concentrados plaquetarios se detecta IL-1ra liberada por los neutrófilos⁴⁷⁻⁵¹.

4.-El PRP reduce el dolor⁵²⁻⁵⁴. Este efecto puede ser el resultado del sumatorio de varios efectos: la inhibición o neutralización de citoquinas proinflamatorias (TGF- β / IL-1 via p38 MAPK) y sustancias (sustancia P) que hipersensibilizan los nociceptores^{35-39,55}, el estímulo sobre la síntesis de ácido hialurónico^{56,57} y, en general, por el reequilibrio homeostático.

5.-El PRP estimula la síntesis de ácido hialurónico por los fibroblastos sinoviales, lo que contribuye a disminuir el dolor y controlar o revertir la inflamación^{56,57}.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Snyder JR. Management of Selected Soft Injuries in the Performance Horse. Proceedings EspoM Aachen 2006.
2. Wilson JH, Robinson LA, Jensen RC, McArdel CJ. Equine Soft Tissue Injuries Associated with Racing: Descriptive Statistics from American Racetracks. Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996.
3. Genovese R, Reef VB, Longo KL, Byrd JW, Davis WM. Superficial Digital Flexor Tendonitis: Long Term sonographic and Clinical Study of racehorses. Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996.
4. Jorgensen JS, Genovese RL. Superficial Digital Flexor tendonitis. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 628-635.
5. Dyson SJ, Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J*. 2004;36:415-9.
6. Marr CM, Love S, McKellar Q. Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses. *Vet. Rec.*1993;132;476-479.
7. Smith RKW, Goodship AE. Tendon and ligament physiology. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, (eds): *Equine Sports Medicine and Surgery*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2004.
8. Williams RB, Hammond CJ, Wood JLN. Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996,1997 and 1998. *Equine Vet J* 2001;33:478-486.
9. Perkins NR, Reis SWJ, Morris RS. Profiling the New Zealand Thoroughbred racing industry.2. Conditions interfering with training and racing. *N Z Vet J* 2005. 53:69-76.
10. Lam Kh, Parkin TDH, Riggs CM et al. Descriptive analysis of retirement of Thoroughbred racehorses due to tendón injuries at the Hong Kong Jockey Club (1992-2004). *Equine Vet J* 2007;39:143-148.).
11. Rumian AP, Wallace AL, Birch HL. Tendons and ligaments are anatomically distinct but overlap in molecular and morphological features: a comparative study in an ovine model. *J Orthop Res* 2007; 25:458-464.

12. Batson EL, Paramour RJ, Smith TJ, Birch HL, Paterson-Kane JC, Gooship AE. Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions?. *Equine Vet J* 2003;35:314-318.
13. McGuigan MP, Wilson AM. The effect of gait and digital flexor muscle activation on limb compliance in the forelimb of the horse *Equus Caballus*. *J Exp Biol* 2003;206:1325-1336.
14. Smith RKW, Gerard M, Dowling B et al. Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendón with mechanical properties: a proposed rol of COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons. *Equine Vet J* 2002; suppl 34:241-244.
15. Smith RKW, Zunino L, Webbon PM, Heinegard D: The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendón and its variation with tendón site, age and load. *Matrix Biol.* 1997;16:255-271.
16. Rosenberg K, Olsson H, Mörgelin M, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem* 1998;273:20397-20403.
17. Smith RKW, Gerard M, Dowling B et al. Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendón with mechanical properties: a proposed rol of COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons. *Equine Vet J* 2002; suppl 34:241-244.
18. Dahlgren LA, Nixon AJ, Brower-Toland BD: Effects of beta-aminopropionitrile on equine tendón metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. *Am J Vet Res.* 2001;62(10):1557-62.
19. Tsuzaki M, Guyton G, Garret W et al. IL-1 induces COX2, MMP-1,-3, and -13, ADAMTS-4, IL-1beta and IL-6 in human tendón cells. *J Orthop Res* 2003;21:256-264.
20. Hosaka Y, Kirisawa R, Yamamoto E, et al: Localization of Cytokines in Tendinocytes of the Superficial Digital Flexor Tendon in the Horse. *J Vet Med Sci.* 2002. 64(10): 945-947.
21. Smith RKW, Birch HL, Goodman S et al. The influence of aging and exercise on tendon growth and degeneration- hypothesis for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002;133:1039-1050.
22. Wilson AM, Gooship AE. Exercise induced hypertermia. *J Biomech* 1993;27:889. (Johnson A, Smith R, Saxne T, et al. Fibronectin fragments cause the release and

- degradation of collagen-binding molecules from equine explant cultures. *Osteoarthritis cartilage* 2004;12:149.
23. Hosaka Y, Ozoe S, Kirisawa R, et al: Effect of Heat on Synthesis of Gelatinases and Pro-inflammatory Cytokines in Equine Tendinocytes. *Biomed Res.* 2006; 27(5):233-241.
 24. Butcher MT, Hermanson JW, Ducharme NG, et al: Superficial flexor tendon lesions in racehorses as a sequela to muscle fatigue: A preliminary study . *Equine Vet J* . 2007;39(6):540-5.
 25. Birch HL, Wilson AM, Goodship AE. The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *J Exp Biol* 1997;200:1703.
 26. Williams RB, Hammond CJ, Wood JLN. Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996,1997 and 1998. *Equine Vet J* 2001;33:478-486.
 27. Lavagnino M, Arnoczky SP, Egerbacher M et al. Isolated fibrillar damage in tendons stimulates local collagenase mRNA expression and protein synthesis. *J Biomech* 2006; 39:2355-2362.
 28. Lavagnino M, Arnoczky SP, Tian T et al. Effect of amplitude and frequency of cyclic tensile strain on the inhibition of MMP-1 mRNA expression in tendon cells: an in vitro study. *Connective Tissue Res* 2003;44:181-187.
 29. Egerbacher M, Caballero O, Lavagnino M et al. Cyclic loading inhibits activation of the apoptotic pathway caused by loss of homeostatic tendon strain: the importance of the mechanobiological "survival signal". *Int Symp Ligaments Tendons* 2007;7: 32.
 30. Gardner K, Arnoczky SP, Caballero O, et al. The effect of stress-deprivation and exercise on the ratio of TIMP/MMP mRNA expression in tendons: an in-vitro experimental study. *Int Symp Ligaments Tendons* 2007;7: 34.
 31. Lavagnino M, Arnoczky SP. In vitro alterations in cytoskeletal tensional homeostasis control gene expression in tendon cells. *J Orthop Res* 2005; 23:1211-1218.
 32. Stanley RL, Edwards LJ, Goodship AE, et al: Effects of exercise on tenocyte cellularity and tenocyte nuclear morphology in immature and mature equine digital tendons. *Equine Vet J.* 2008 ;40(2):141-146.
 33. Moffat PA, Firth EC, Rogers CW, Smith RKW, Barneveld A, Goodship AE, Kawcak CE, McIlwraith CW, van Weeren PR: The influence of exercise during growth on ultrasonographic parameters of the superficial digital flexor tendon of young Thoroughbred horses. *Equine Vet J* 2008 ;40(2):136-140.

34. Kasashima Y, Takahashi T, Birch HL, Smith RK, Goodship AE: Can exercise modulate the maturation of functionally different immature tendons in the horse?. *J Appl Physiol.* 2008 ;104(2):416-2.
35. Danielson P. Let us revive the "biochemical" hypothesis for tendinopathy- New findings suggest the involvement of locally produced signal substances. *Br J Sports Med.* 2008.
36. Alfredson H, Lorentzon R: Chronic tendon pain: no signs of chemical inflammation but high concentrations of the neurotransmitter glutamate. Implications for treatment?. *Curr Drug Targets.* 2002 Feb;3(1):43-54.
37. Danielson P, Alfredson H, Forsgren S.: Studies on the importance of sympathetic innervation, adrenergic receptors, and a possible local catecholamine production in the development of patellar tendinopathy (tendinosis) in man. *Microsc Res Tech.* 2007 ;70(4):310-24.
38. Van Wulven KK, Bowker RM: Evaluation of tachykinins and their receptors to determine sensory innervation in the dorsal hoof wall and insertion of the distal sesamoidean impar ligament and deep digital flexor tendon on the distal phalanx in healthy feet of horses. *Am J Vet Res.* 2002 ;63(2):222-8.
39. Bowker RM, Linder K, Sonea IM, Holland RE: Sensory innervation of the navicular bone and bursa in the foal. *Equine Vet J.* 1995 ;27(1):60-5.
40. Smith RKW. Pathophysiology of Tendon Injury. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse.* Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 616-628.
41. Davis CS, Smith RKW, Diagnosis and Management of Tendon and Ligament Disorders. In: Auer JA, Stick JA, *Equine Surgery.3rd* Saunders Elsevier, 2006.
42. Dahlgren LA. Pathobiology of tendon and ligament injuries. In: *Clinical Techniques in Equine Practice.* 2007;6 (3):168-173.
43. de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, et al: Can Platelet-rich plasma enhance tendon repair?. A cell cultura study. *Am J Sports Med* 2008;36(6):1171-8.
44. Perrier S, Kherratia B, C Deschaumes C, Ughetto S,et al: IL-1ra and IL-1 production in human oral mucosal epithelial cells in culture: differential modulation by TGF- β 1 and IL-4. *Clin Exp Immunol.* 2002; 127(1):53-59.
45. Bodo M, Carinci P, Baroni T,et al: Role of growth factor son extracellular matrix production by chick embryo fibroblast in vitro: antagonist effect of TGF-beta through the control of IL-1 and IL-1ra secretion. *Cytokine.* 1998;10(5):353-60.
46. Bodo M, Carinci P, Baroni T,et al: Interleukin pattern on Apert fibroblast in vitro. *Eur J Cell. Biol.* 1998;7(4):383-388.

47. Bütternova I, Bäumlner H, Kern F, et al: Release of WBC-derived IL-1 receptor antagonist into supernatants of RBCs: influence of storage time and filtration. *Transfusion* 2002;41:67-73.
48. Kluter H, Schlenke P, Muller-Steinhardt, Paulsen M, Kirchner H: Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion* 2003;37:362-367.
49. Stack G, Snyder EL: Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 2003 ;34:20-25.
50. Wadhwa M, Seghatchian J, Lubenko M, Contreras P, Dilger C, Bird R: Cytokine levels in platelet concentrates: quantitation by bioassays and immunoassays. *Br J Haematology* 2003 ;93:225-234.
51. Schröder AK, von der Ohe M, Fleischer D et al: Differential synthesis of two interleukin-1 receptor antagonist variants and interleukin-8 by peripheral blood neutrophils. *Cytokine*. 2005 7;32(5):246-53.
52. Zavadil DP, Satterle CC, Costigan JM, Holt DW, Shostrom VK. Autologous platelet gel and platelet-poor plasma reduce pain with total shoulder arthroplasty. *J Extra Corpor Technol* 2007;39(3):177-82.
53. Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Klepchick PR, Mooar PA. The efficacy of autologous platelet gel in pain control and blood loss in total knee arthroplasty. An analysis of the haemoglobin, narcotic requirement and range motion. *Int. Orthop* 2007; 31(3):309-13.
54. Sampson S, Gerhardt M: Platelet rich plasma injections grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2009.
55. Brown K, Heitmeyer S, Hoofkin E, et al: P38 MAPK inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with osteoarthritis. *J of Inflammation*. 2008; 5:22.
56. Anitúa E, Sánchez M, Nurden AT, Zalduendo MM, de la Fuente M, Azofra J, Andía I: Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology* 2007;46:1769-1772.
57. Oguchi T, Ishiguro N: Differential stimulation of three forms of hyaluronan synthase by TGF-beta, IL-1beta and TNF-alpha. *Connect Tissue Res* 2004;45:197-205.

1.2. ESTUDIOS CLÍNICOS

1.2.1 TENDÓN FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL (TFDS)

INTRODUCCIÓN

La incidencia de las lesiones de los tendones y ligamentos se ha estimado entre el 11% y el 46%¹⁻³. Concretamente en el PSI, las lesiones de los tendones constituyen la causa más importante de retirada de las carreras⁴. Las lesiones del TFDS son las más frecuentes entre los tejidos blandos distales al carpo. El 93% de las lesiones de tendones y ligamentos en los caballos National Hunt afectan al TFDS⁴. En otras disciplinas deportivas tales como las carreras de trotadores (*standardbreds*) y las competiciones de salto, doma, resistencia, polo, doma vaquera y enganches, se observa un incremento de lesiones del LS, TFDP y LATFDP.

Se supone que el TFDS y el LS son más propensos a las lesiones que el TFDP porque los primeros reciben la carga en el momento de apoyo, mientras que el TFDP interviene algo más tarde. El punto de ruptura del TFDS se sitúa alrededor de los 12 KN¹.

La lesión se presenta de diversas formas. Repentinamente, sin signos prodrómicos, durante o inmediatamente después del ejercicio; algunas veces los signos de calor y dolor aparecen a las 24 horas después del ejercicio. Otras veces, durante un tiempo, aparecen signos poco específicos como un ligero "empastamiento", sin cojera aparente. La tendinitis puede ir acompañada de distensión de las vainas carpal o digital. No siempre hay una correlación entre la severidad de la inflamación y grado de la cojera con la gravedad de la lesión, y no es extraño observar lesiones graves que no van acompañadas de cojera tras unos pocos días de descanso; en éstas, el regreso prematuro al trabajo puede causar una lesión aún mayor.

FACTORES DE RIESGO

Las lesiones de los TFDS acontecen principalmente en aquellas especialidades deportivas en las que se alcanza una velocidad alta (carreras de galope, obstáculos, trotadores).

La superficie de trabajo juega un papel importante. En las especialidades en las que prima la velocidad las superficies son relativamente más duras; las pistas duras conllevan cargas puntuales muy altas lo que, a su vez, deriva en lesiones por sobrecarga.

El balance del casco es tan importante como controvertido. Una conformación pobre de talones y con las lumbres largas se ha considerado tradicionalmente que predispone a lesiones de los tendones. Sin embargo, otros estudios de biomecánica sugieren que tiene efectos protectores sobre el TFDS^{2,5}. Las investigaciones actuales sugieren que la elevación de los talones disminuye la carga sobre el TFDP y la aumenta sobre el TFDS y LS.

La fatiga es otro factor de riesgo ya que a medida que ésta aumenta, se modifican las características del tranco y, por tanto, las cargas sobre los tendones. La fatiga muscular conduce a una pérdida de coordinación y a un aumento del riesgo de lesión^{25,26}.

El peso del jinete y el sobrepeso del propio caballo también influyen como carga añadida.

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

En este estudio se incluyeron 72 caballos de diferentes sexos, edades, razas y aptitudes (37 trotadores, 13 salto, 10 doma, 12 silla). Se trataron un total de 72 extremidades. Del total de la muestra, 61 casos presentaban lesiones agudas y 11 crónicas. Se realizó un completo examen de la cojera incluyendo una determinación del grado de la misma, bloqueos anestésicos perineurales e intraarticulares para localizar las lesiones, radiografías y ecografías.

Después de realizar los respectivos exámenes ultrasonográficos, la muestra de 72 caballos pacientes con lesiones TFDS presentaba la siguiente distribución: 16 pacientes Categoría III, de los cuales 4 recibieron 1 dosis de PRP y 12 recibieron 2 ó más dosis; 29 pacientes Cat. IV, de los cuales 11 recibieron 1 dosis de PRP y 18 recibieron 2 ó más dosis; 21 pacientes Cat. V, de los cuales 10 recibieron 1 dosis de PRP y 11 recibieron 2 ó más dosis; 6 pacientes Cat. VI, de los cuales 3 recibieron 1 dosis y otros 3 recibieron 3 ó más dosis. (Tabla 1; Fig. 1-4)

Por tanto, 28 caballos recibieron 1 dosis de PRP y 44 caballos recibieron 2 ó más dosis.

Los pacientes se volvieron a evaluar antes de cada tratamiento y a los 45 días, 2 meses y 4 meses del inicio del tratamiento. El seguimiento continuó durante un periodo mínimo de un año y hasta tres años y medio.

Tabla 1 CATEGORÍA	Nº caballos 1 dosis	Nº Caballos 2-4 dosis
III Aguda	3	10 (d=2,1)
III Crónica	1	2 (d=2,0)
IV Aguda	10	15 (d=2,5)
IV Crónica	1	3 (d=2,3)
V Aguda	8	10 (d=2,6)
V Crónica	2	1 (d=2,0)
VI Aguda	3	2 (d=3,0)
VI Crónica	0	1 (d=4,0)
TOTAL	28	44 (d=2,43)

Fig. 1

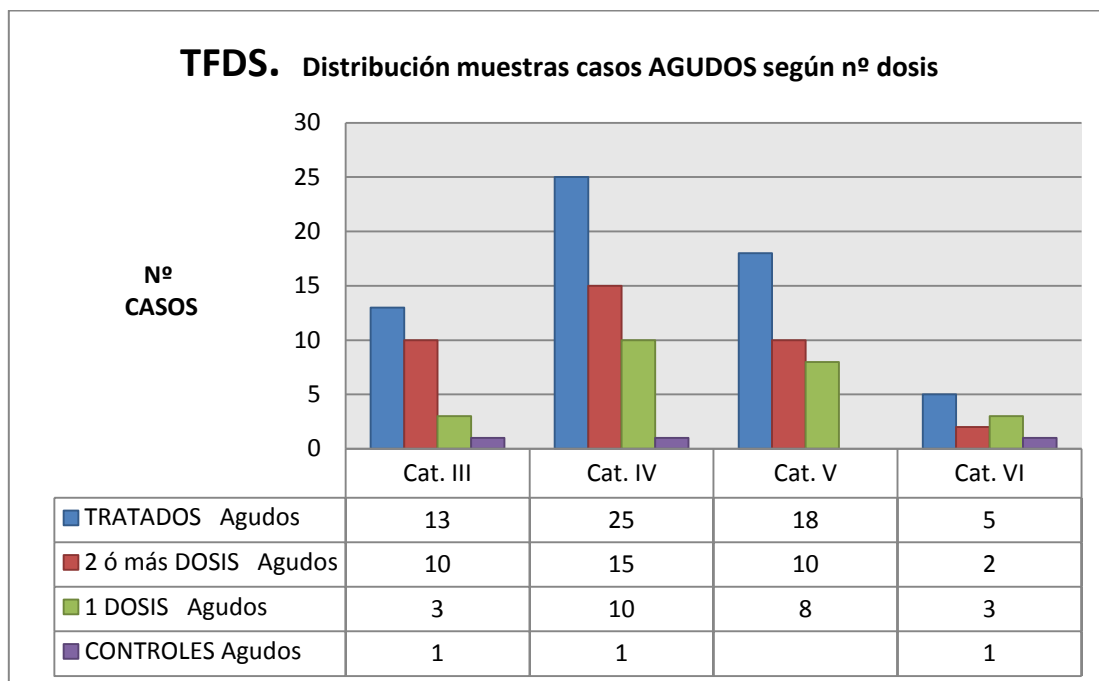
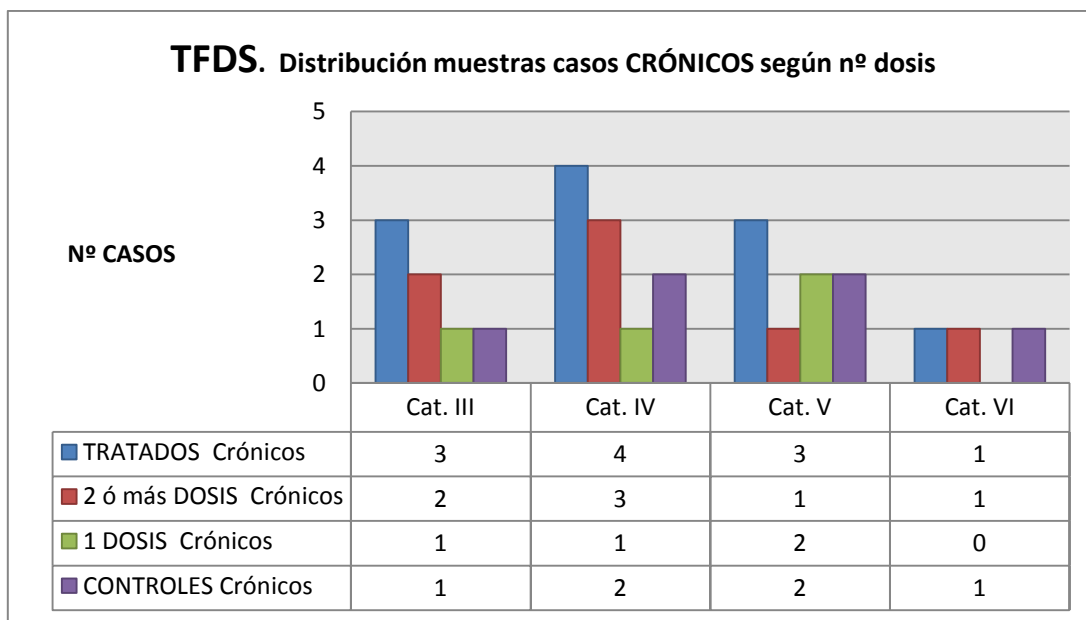


Fig. 2



GRUPO CONTROL

Se aplicó la misma metodología de examen de cojera sobre un grupo de 9 caballos de diferentes sexos, edades, razas y aptitudes (4 trotadores, 2 salto, 1 doma, 2 silla) que por diversos motivos no se sometieron a ningún tratamiento, lo que representa un total de 9 extremidades. Del total de la muestra, 3 caballos presentaban lesiones agudas y otros 6, crónicas. Después de practicar los correspondientes exámenes ecográficos, la muestra del grupo control de 9 caballos con lesiones TFDS presentaba la siguiente distribución: 2 pacientes Cat. III, 3 pacientes Cat. IV, 2 pacientes Cat. V, 2 pacientes Cat. VI. (Fig. 1-4).

Fig. 3

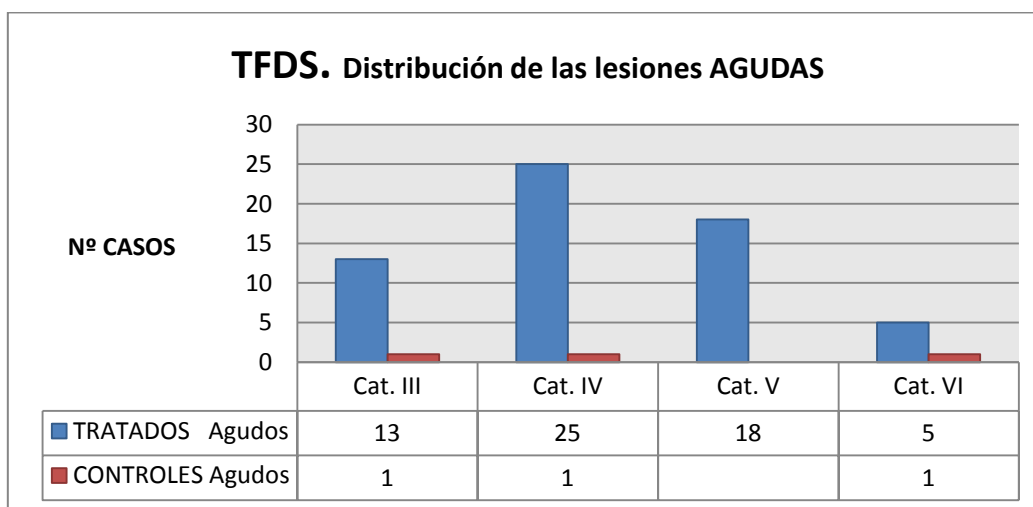
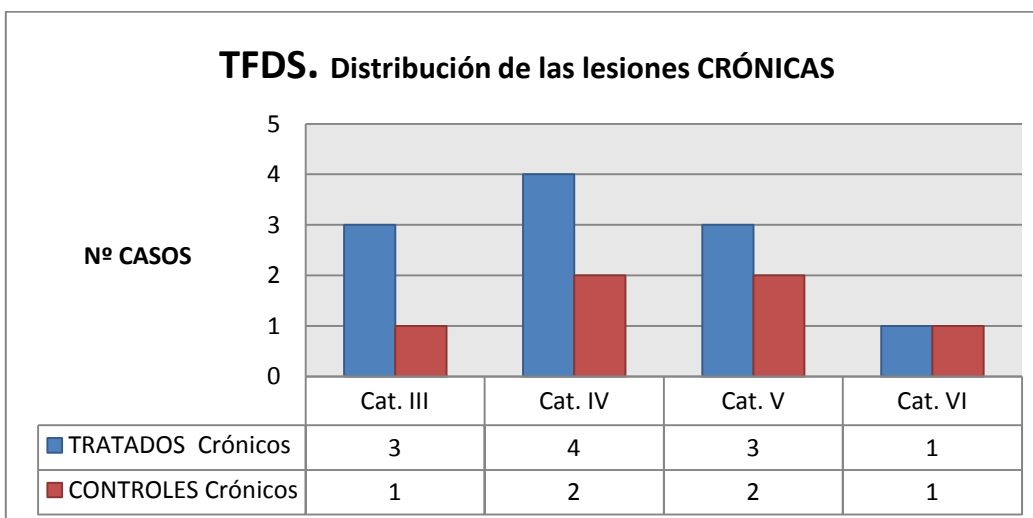


Fig. 4



EVALUACIÓN DE LA COJERA

Las cojeras se clasificaron de 0 a 5, siguiendo los criterios de la *American Association of Equine Practitioners (AAEP)*⁶. Donde 0= normal y 5= el caballo no es capaz de soportar peso sobre la extremidad.

Los resultados de los test de flexión durante un minuto se clasificaron en una escala de 0 a 3, donde 0= resultado negativo, 1= ligero incremento de la cojera, 2= moderado incremento de la cojera y 3= severo incremento de la cojera.

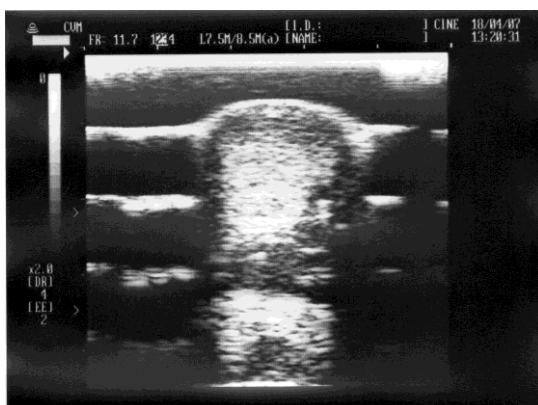
Se evaluó el calor local, la sensibilidad a la palpación y el aspecto del tendón.

EVALUACIÓN ECOGRÁFICA

Las lesiones ecográficas se clasificaron según las seis categorías (I-VI) descritas en una modificación de la clasificación original de Rantanen et al⁷ para las lesiones de tendones y ligamentos. Los parámetros ultrasónicos utilizados incluyen: el área de la sección transversal, el área de la máxima lesión, porcentaje de la zona de máxima lesión respecto a la porción sana en la sección transversal, patrón ecogénico de la lesión y orientación de las fibras en corte longitudinal. (Tabla 2)

Después de realizar los tratamientos no se catalogó ningún resultado en la Cat I debido al sutil límite entre las Cat I y II. Ambas categorías se clasificaron como Cat II, clínicamente equivalente a "tendones y ligamentos curados".

Categoría III



Categoría V

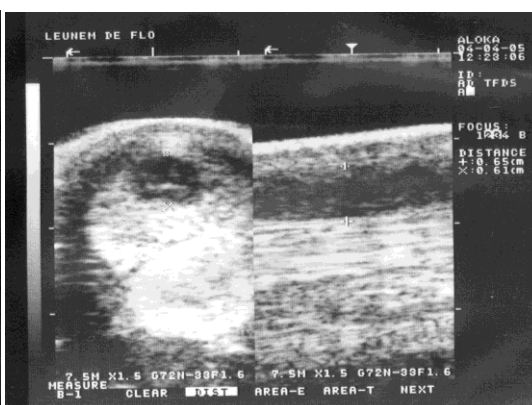
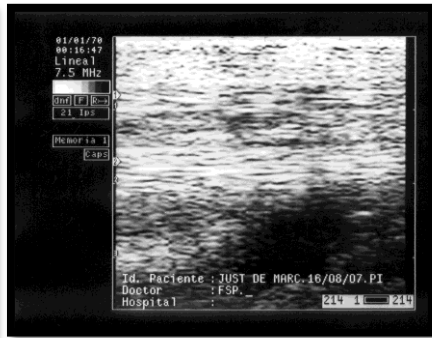
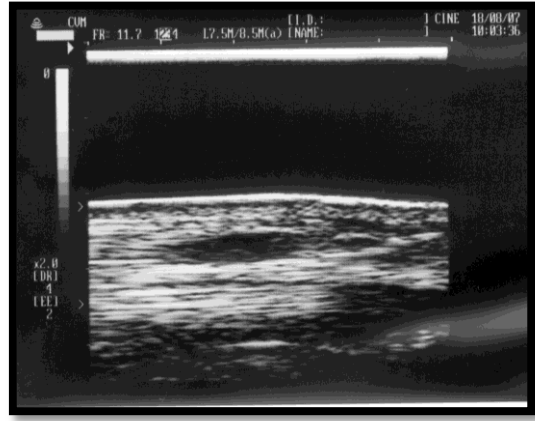
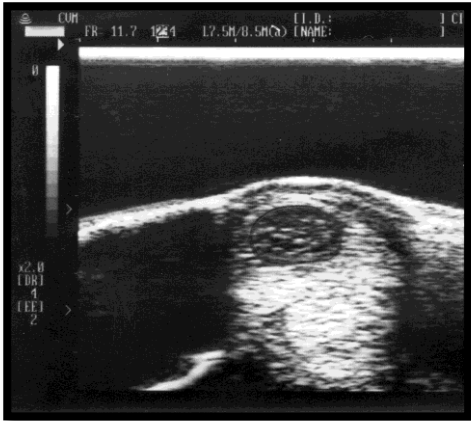


Tabla 2

**EVALUACIÓN ECOGRÁFICA DE LAS LESIONES
(ESCALA RANTANEN et al. I - VI)**

	Isoecoico	Incremento Grosor	Hipoecoico	Anecoico	3 Zonas	5 Zonas	6-7 Zonas	11 Zonas
Cat. I	SI	<25-39%						
Cat. II	SI	>39%						
Cat. III			SI	NO				
Cat. IV				SI	1-25%	1-20%	1-15%	1-10%
Cat. V				SI	26-35%	21-30%	16-25%	11-20%
Cat. VI				SI	>35%	>30%	>25%	>20%



Imágenes: Arriba izda: Cat. VI en fase curación. Patrones longitudinales anormales (Cat. V a III)

SEGUIMIENTO CLÍNICO

El estudio se inició en diciembre de 2004 y se finalizó en octubre de 2008.

De la muestra de 28 caballos que sólo recibieron 1 dosis de PRP, se registraron los datos correspondientes a la evaluación clínica y ecográfica de la cojera durante los dos primeros meses; a partir de este periodo, no se pudieron obtener datos suficientes sobre su evaluación ecográfica, carrera deportiva y las recaídas de un número significativo de caballos, por lo que esta muestra sólo se analiza estadísticamente con los datos obtenidos durante los 2 primeros meses.

De la muestra de 44 caballos que recibieron 2 ó más dosis de PRP, se registraron los datos correspondientes a la evaluación clínica y ecográfica y a sus carreras deportivas, prestando especial atención al rendimiento atlético y a las recaídas acontecidas antes y después de volver a la competición. El seguimiento oscila entre un mínimo de un año y hasta tres años y medio desde la fecha de inicio del tratamiento.

PREPARACIÓN DEL PRP

El PRP se preparó según el método de tubo y doble centrifugación⁸, obteniendo 100 ml de sangre de forma aséptica de la vena yugular mediante una palomilla 16G (Braun) y depositándola en tubos al vacío, estériles, de 5 ml., conteniendo citrato sódico al 3,2 %. A continuación los tubos se centrifugan a 120g durante 5 minutos. En condiciones asépticas, se aspira el 50% de la columna de plasma que está adyacente a la capa leucocitaria. El plasma obtenido se vuelve a centrifugar a 240g durante 5 minutos y se recupera el 25% de la columna de plasma adyacente al sedimento y éste mismo. Esta última fracción, contenida en jeringas estériles, se activa con cloruro cálcico (4.5mEq/5ml) adicionando 50µl / 1 ml PRP. Se realizó el recuento plaquetario de cada muestra de sangre.

ESQUEMA DE TRATAMIENTO CON PRP

La zona afectada de la extremidad se preparó de forma aséptica para las inyecciones. Los caballos se sedaron con detomidina (Domosedan[®], Pfizer) – butorphanol (Torbugesic[®], Fort Dodge Laboratories Inc.). El PRP se inyectó intralesionalmente entre 1 y 4 veces en intervalos de 10-15 días, según la evolución de la escala ecográfica. Durante las semanas que duró el tratamiento los caballos se mantuvieron en reposo o dando paseos a la mano. No se administró ningún otro tratamiento sistémico o tópico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, sobre la muestra total, se aplicó el test T para muestras cuantitativas independientes para averiguar si la distribución de la muestra de los casos control era representativa o comparable con las muestras de los casos tratados con 1 dosis de PRP y 2 ó más dosis.

En segundo lugar, sobre la muestra de casos control, que no recibieron dosis de PRP, se aplicó el test Paired-T (2-tailed) y el test Wilcoxon para muestras cuantitativas dependientes a efectos de comparar la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-VI) en el momento del inicio del control y a los 2 meses. También se aplicó el test ANOVA para determinar la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica" y "lesión en los polos" (extremos del corte transversal del TFDS) en el resultado a los 2 meses de haberse iniciado el control.

En tercer lugar, sobre las muestras de casos tratados con 1 dosis y 2 ó más dosis, se aplicó el test Paired-T (2-tailed) y test Wilcoxon para muestras cuantitativas dependientes a efectos de comparar la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-VI) en el momento del inicio, a los 2 meses y a los 4 meses del tratamiento.

En cuarto lugar, sobre las muestras de casos tratados con 2 ó más dosis, se aplicó el test ANOVA a efectos de valorar la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica", "lesión en los polos" (extremos del corte transversal del TFDS) y "recuento plaquetario" en la evolución de las lesiones a los 2 y 4 meses de haber iniciado el tratamiento.

En quinto lugar, sobre las muestras de casos tratados con 2 ó más dosis, se aplicó el test ANOVA a efectos de valorar la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica", "lesión en los polos" (extremos del corte transversal del TFDS) y "recuento plaquetario" en las recaídas.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante software SPSS ver.14. Se estableció un intervalo de confianza de 95% y se consideraron valores de $P < 0,05$ como significativos.

RESULTADOS

1. El análisis estadístico resultante de la comparación de las muestras independientes, pacientes y grupo control, mediante el test T mostró una diferencia no significativa ($p=0,681$; 2-tailed, al comparar las muestras "control" y "1 dosis"; y $p=0,564$; 2 tailed, al comparar las muestras "control" y "2 ó más dosis"), por lo que se consideró que la muestra "control" era representativa de las muestras de casos tratados con 1 dosis y 2 ó más dosis (Fig. 5, 6).

Fig. 5

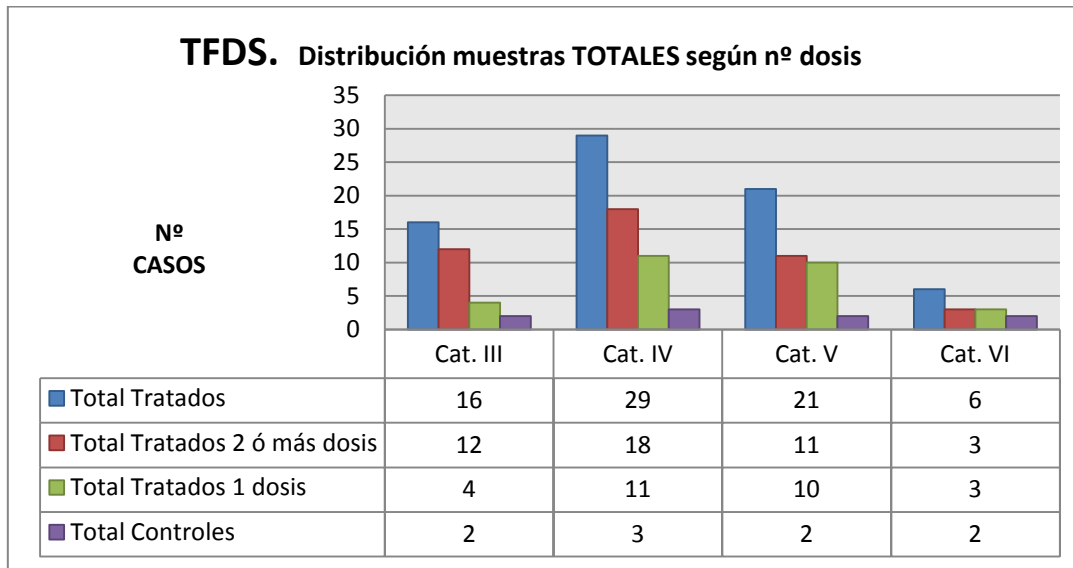
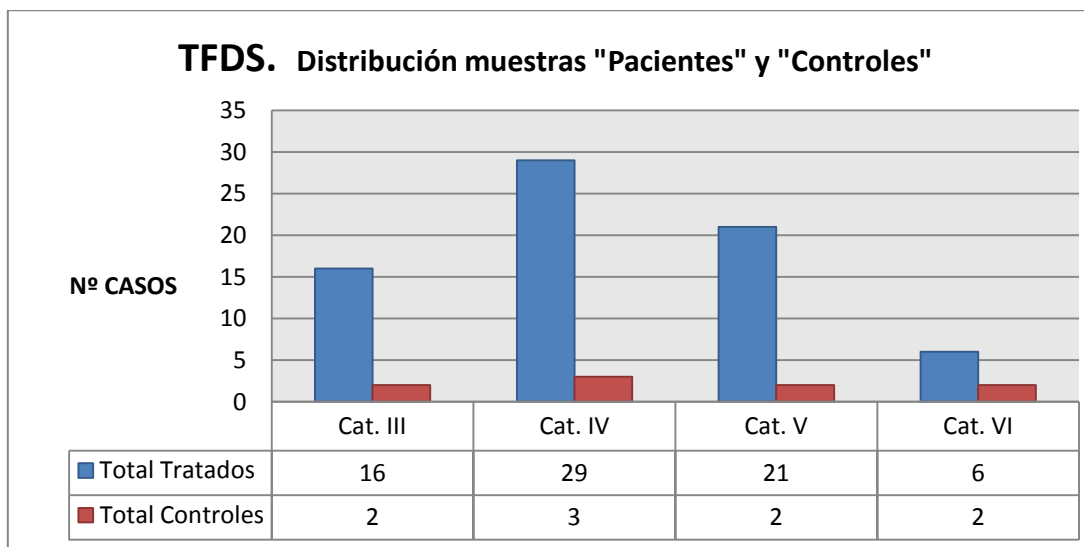
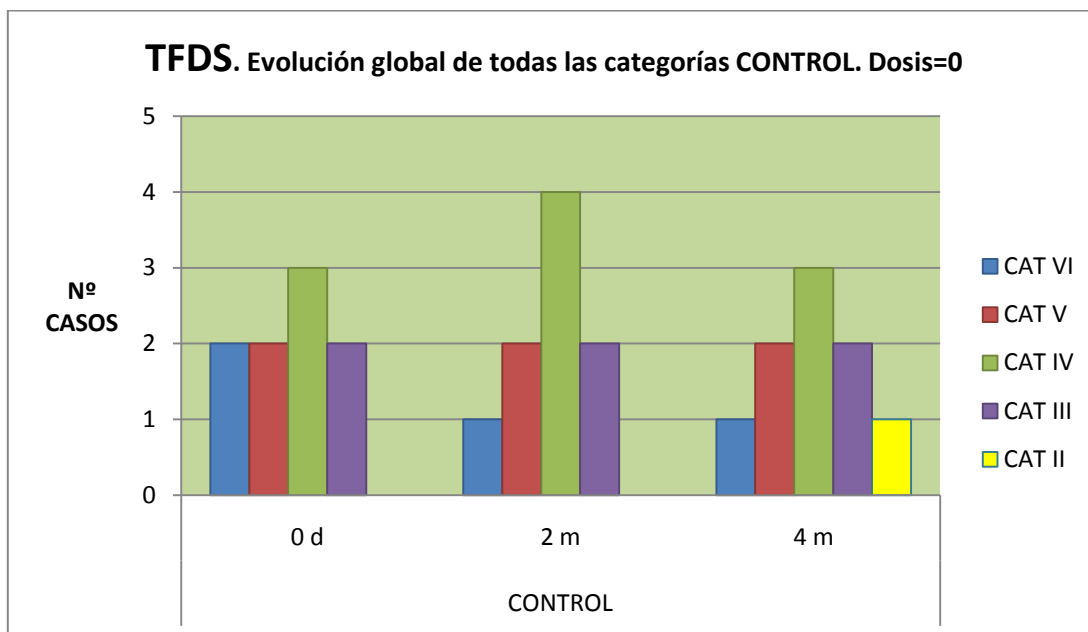


Fig. 6



2. El análisis estadístico de la muestra control revela que no se observan diferencias significativas en la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-VI) comparadas en el momento del inicio del control y a los 2 y 4 meses de haber iniciado el control (Paired T test $p=0,165$; 2-tailed y test Wilcoxon $p=0,157$; 2-tailed) (Fig. 7). El test ANOVA para determinar la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica" y "lesión en los polos" (extremos del corte transversal del TFDS) en el resultado a los 2 meses de haber iniciado el control, revela que estos factores no influyen significativamente en dicha evolución (ANOVA factor "lesión aguda vs crónica", $p=0,659$ y ANOVA factor "polos", $p=0,826$).

Fig. 7



3. El análisis estadístico aplicado sobre las muestras de casos tratados con 1 dosis y 2 ó más dosis revela diferencias significativas en la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-VI) comparadas en el momento del inicio del tratamiento y a los 2 y 4 meses de haber iniciado el tratamiento (Paired-T test $p < 0,000$; 2-tailed), tanto en la muestra que recibió 1 dosis como en la que se administraron 2 ó más dosis. Ahora bien, a los 2 meses, la diferencia respecto a la situación inicial es aún más significativa en el grupo de pacientes que recibieron 2 ó más dosis (Wilcoxon: $Z = -4,347$ para 1 dosis; $Z = -5,853$ para 2 ó más dosis), tanto es así que al comparar la evolución de las lesiones de estas dos muestras a los 2 meses, se observa una diferencia significativa ($p < 0,001$). (Figs. 8 y 9)

Fig. 8

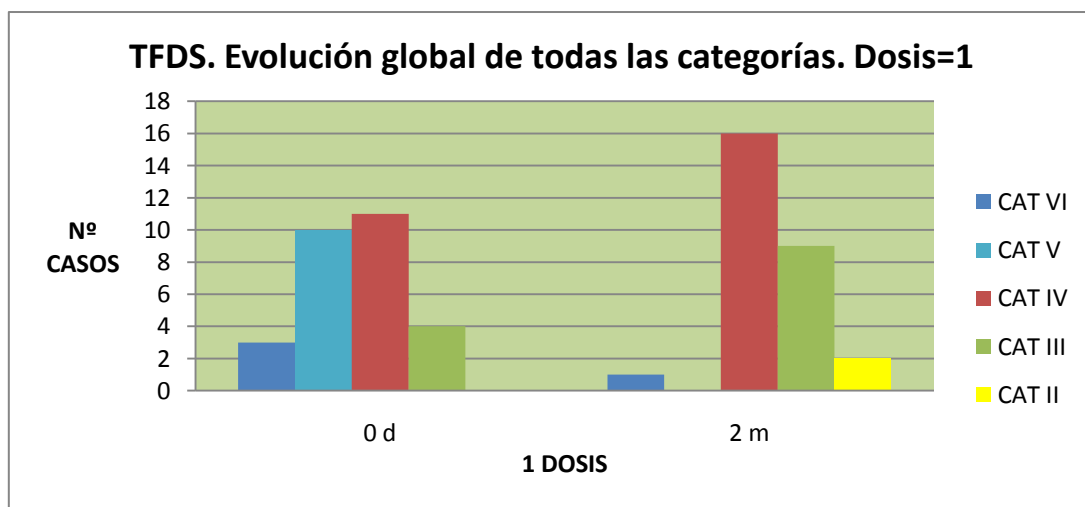
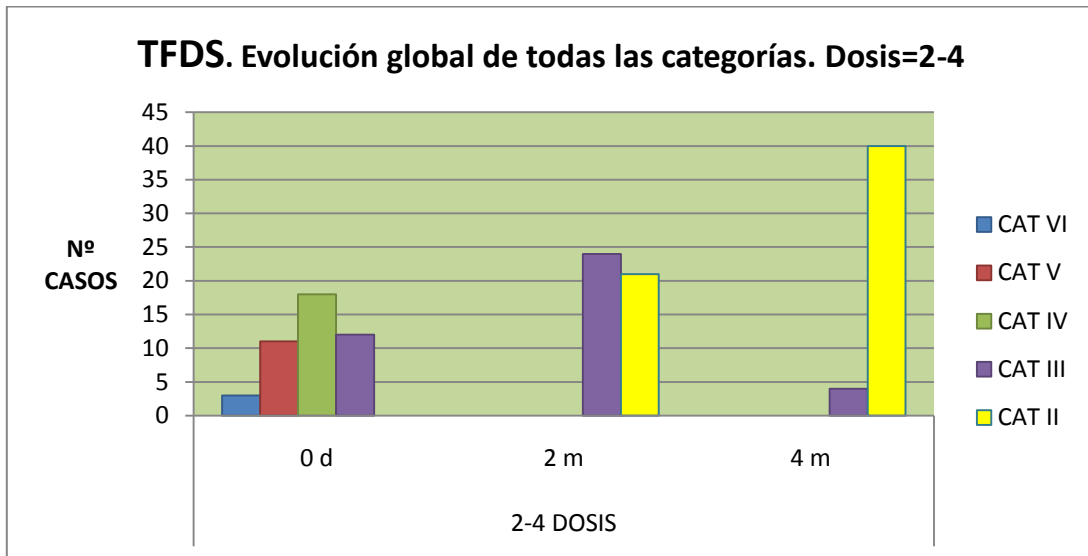


Fig. 9



En otras palabras, si definimos las variables $t_{50\%CatII}$ y $t_{90\%CatII}$ como el tiempo necesario para que el 50% y 90% de la muestra evolucione hasta la categoría II más benigna (equivalente a curación), observamos los siguientes resultados:

- Lesiones iniciales Categoría III. Para los pacientes que recibieron 1 dosis, $t_{50\%CatII}$ = 2 meses y $t_{90\%CatII}$ = desconocido (>2meses). Para los pacientes que recibieron 2 ó más dosis, $t_{50\%CatII}$ = 45 días y $t_{90\%CatII}$ = 2 meses. (Figs 10-13, 21, 22)
- Lesiones iniciales Cat IV. Para los pacientes que recibieron 1 dosis, $t_{50\%CatII}$ = desconocido (>2meses) y $t_{90\%CatII}$ = desconocido (>2meses). Para los pacientes que recibieron 2 ó más dosis, $t_{50\%CatII}$ = 3 meses y $t_{90\%CatII}$ = 4,5 meses. (Figs. 13-15, 21, 22)
- Lesiones iniciales Cat V. Para los pacientes que recibieron 1 dosis, $t_{50\%CatII}$ = desconocido (>2meses) y $t_{90\%CatII}$ = desconocido (>2meses). Para los pacientes que recibieron 2 ó más dosis, $t_{50\%CatII}$ = 2,3 meses y $t_{90\%CatII}$ = 4 meses. (Figs. 16-18, 21, 22)
- Lesiones iniciales Cat VI. Para los pacientes que recibieron 1 dosis, $t_{50\%CatII}$ = desconocido (>2meses) y $t_{90\%CatII}$ = desconocido (>2meses). Para los pacientes que recibieron 2 ó más dosis, $t_{50\%CatII}$ = 3 meses y $t_{90\%CatII}$ = 4 meses. (Figs. 19 - 22).

Fig 10-12

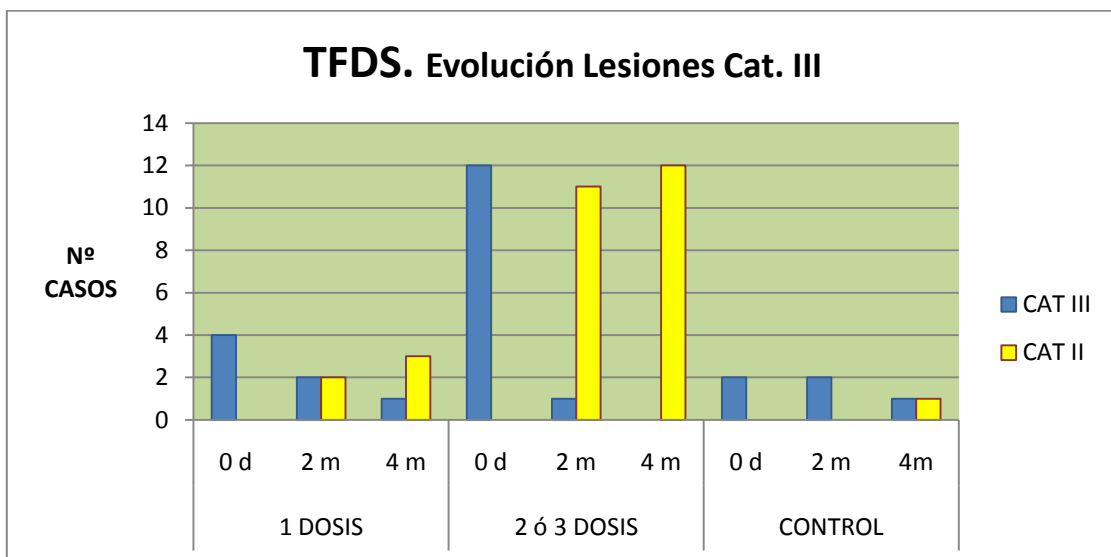
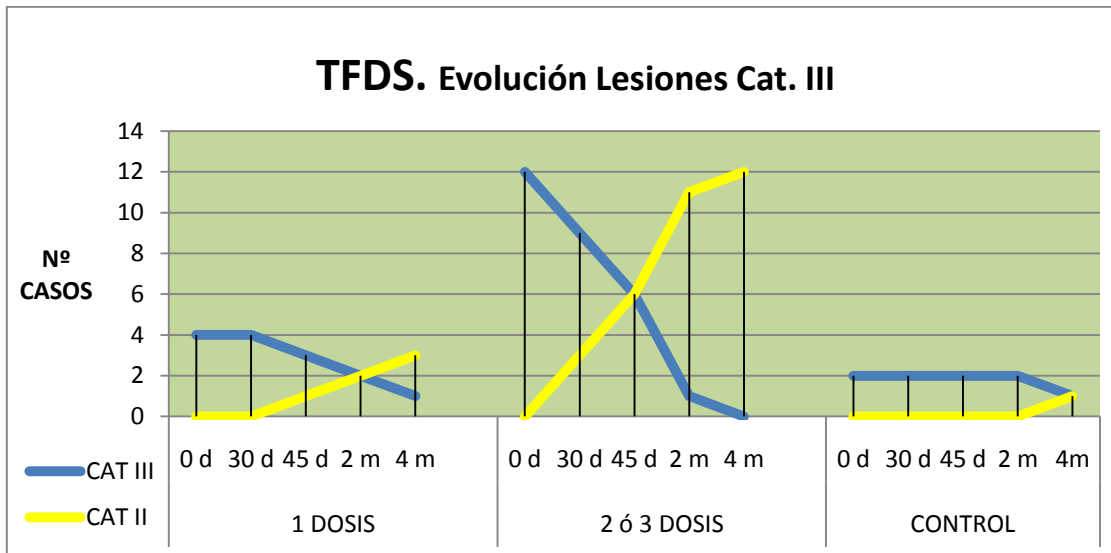
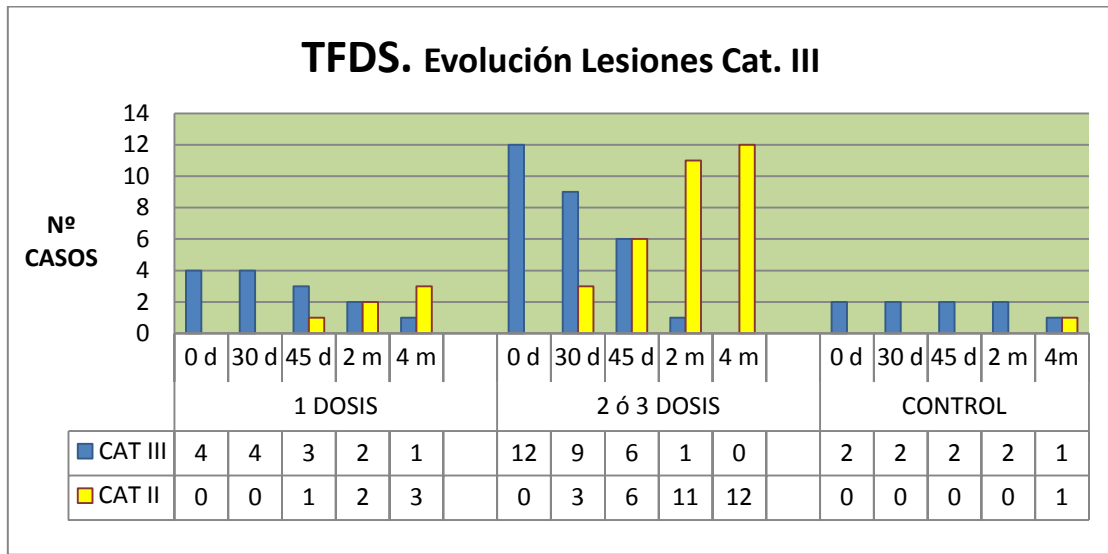


Fig. 13-15

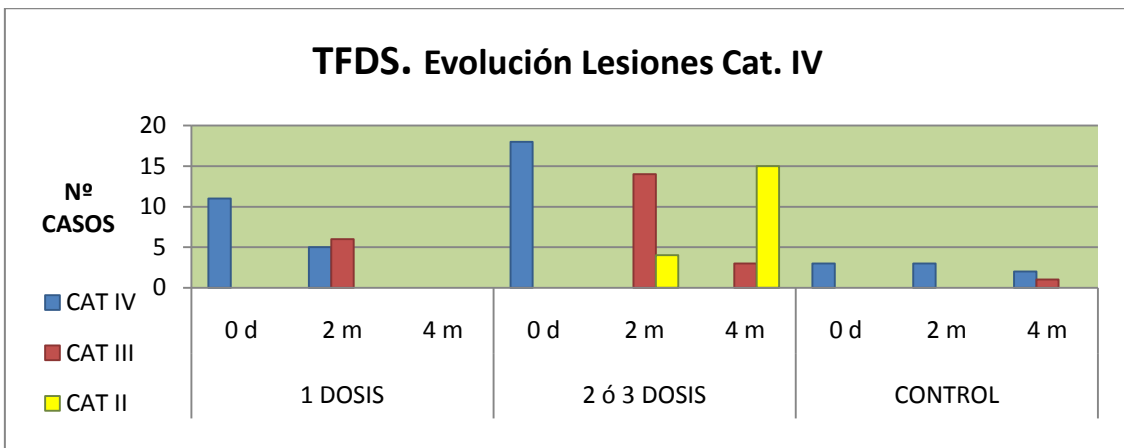
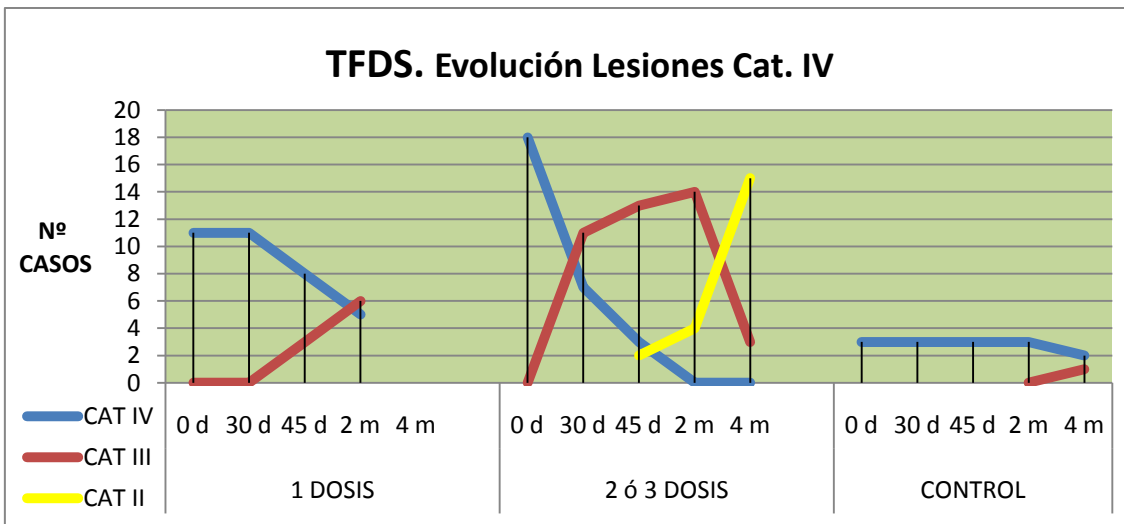
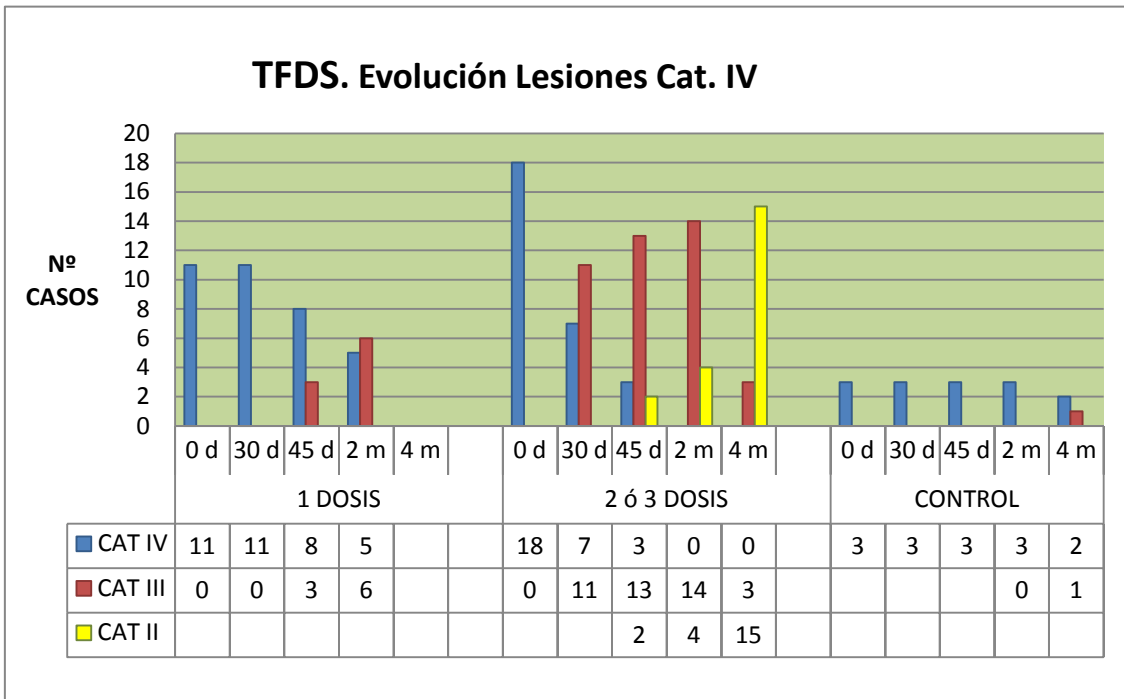


Fig. 16-18

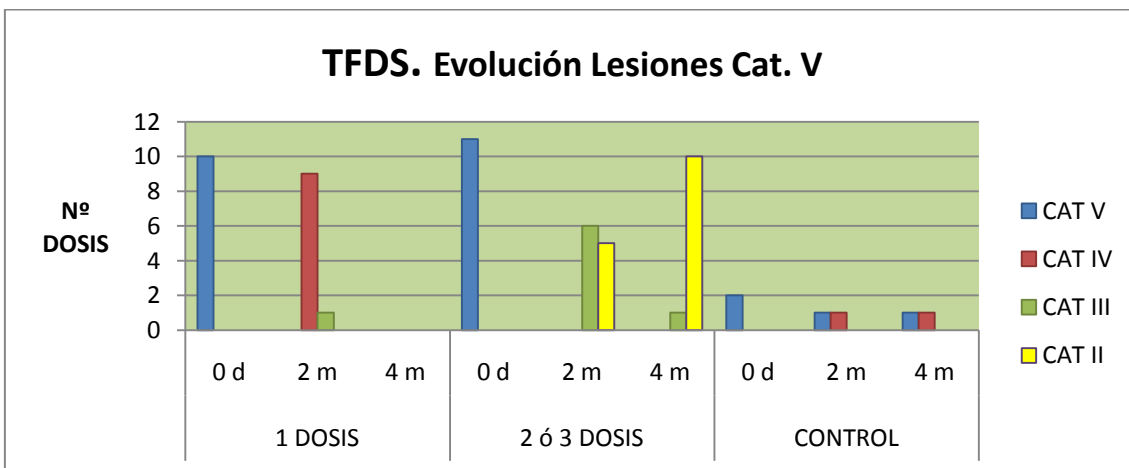
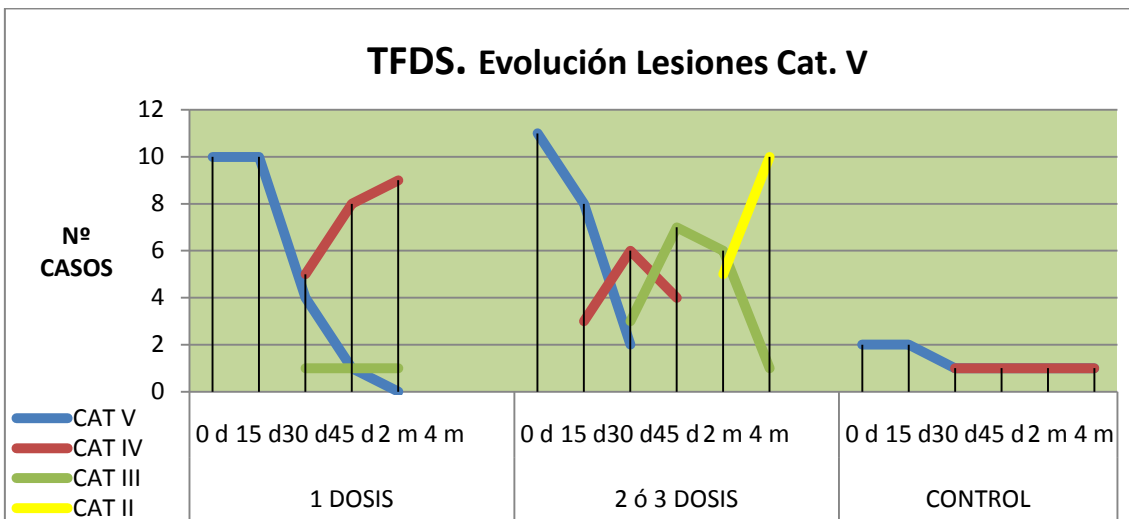
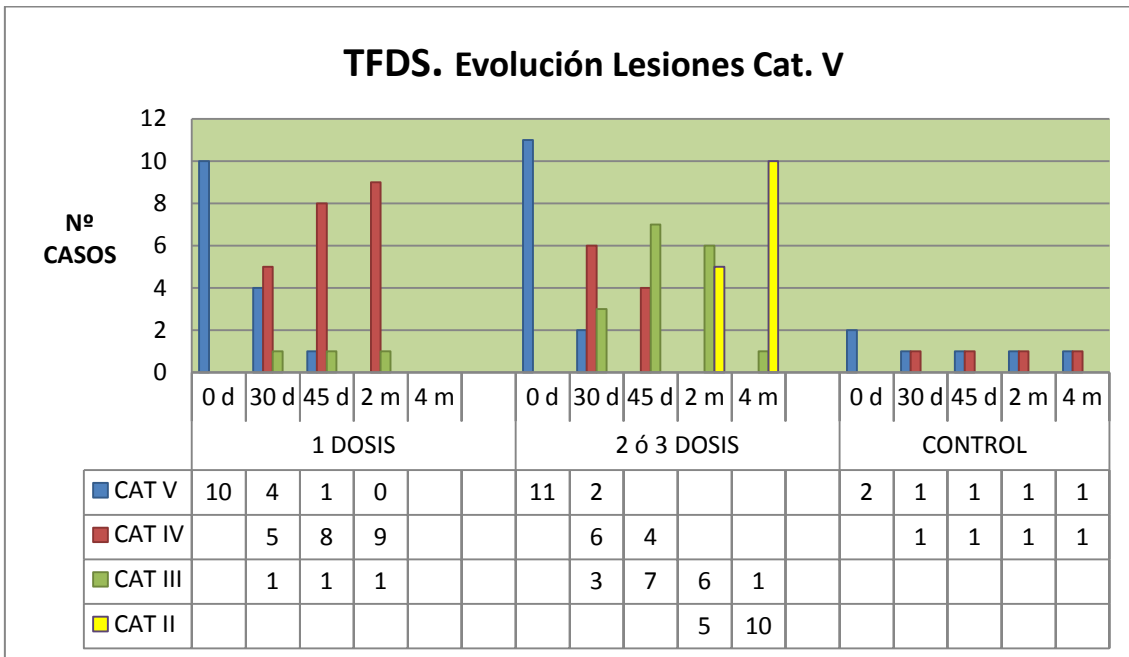


Fig. 19

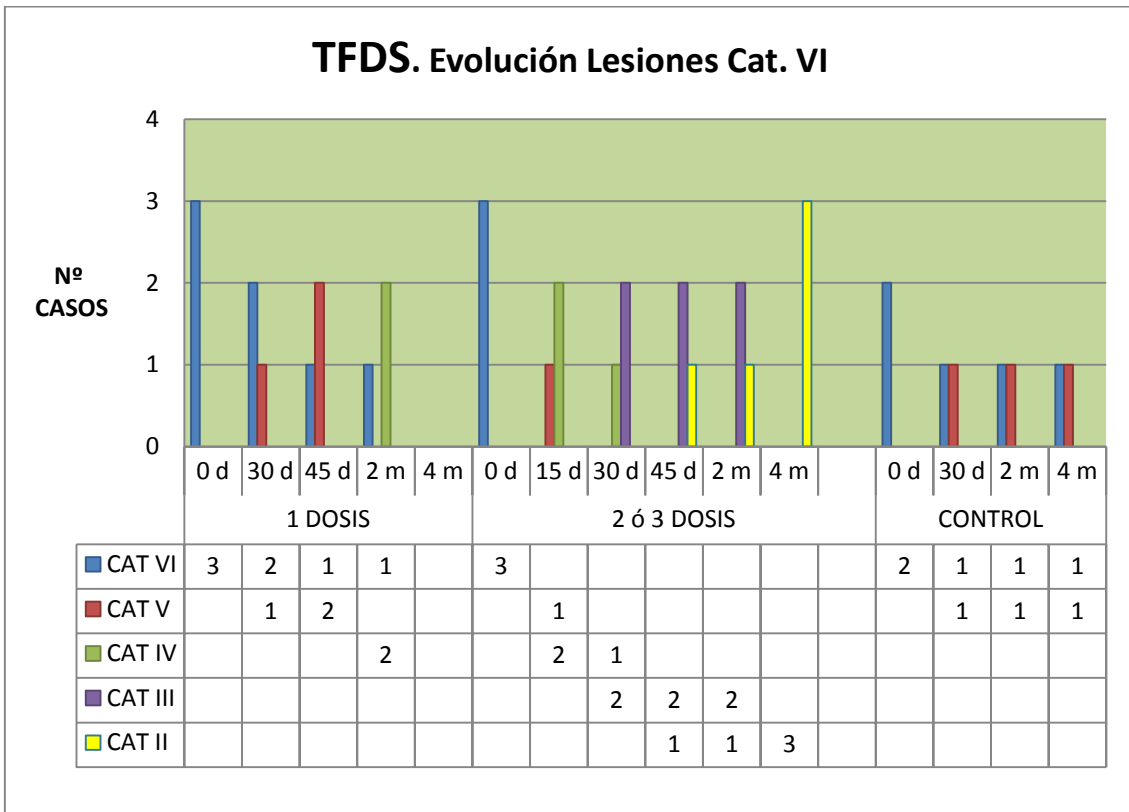


Fig. 20

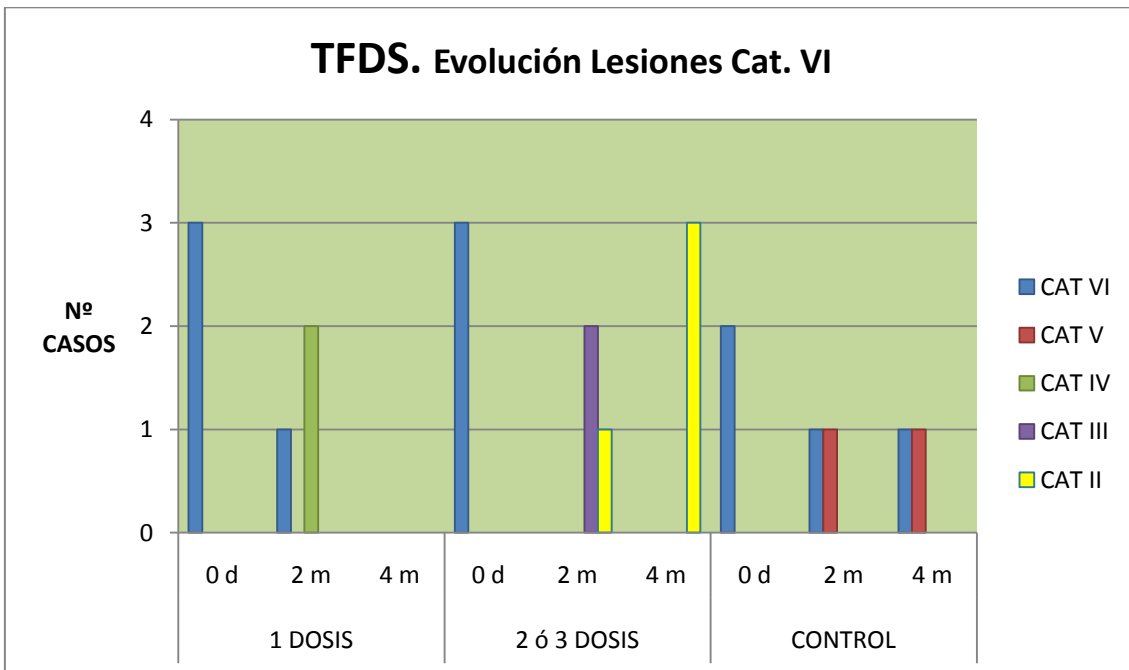


Fig. 21

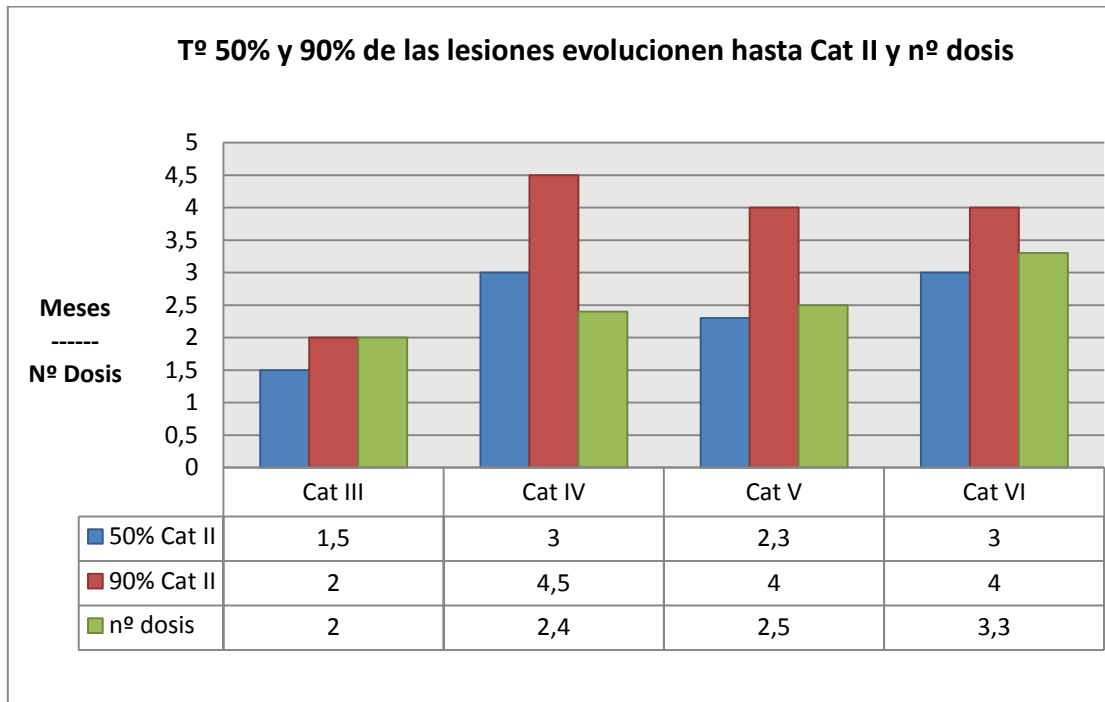
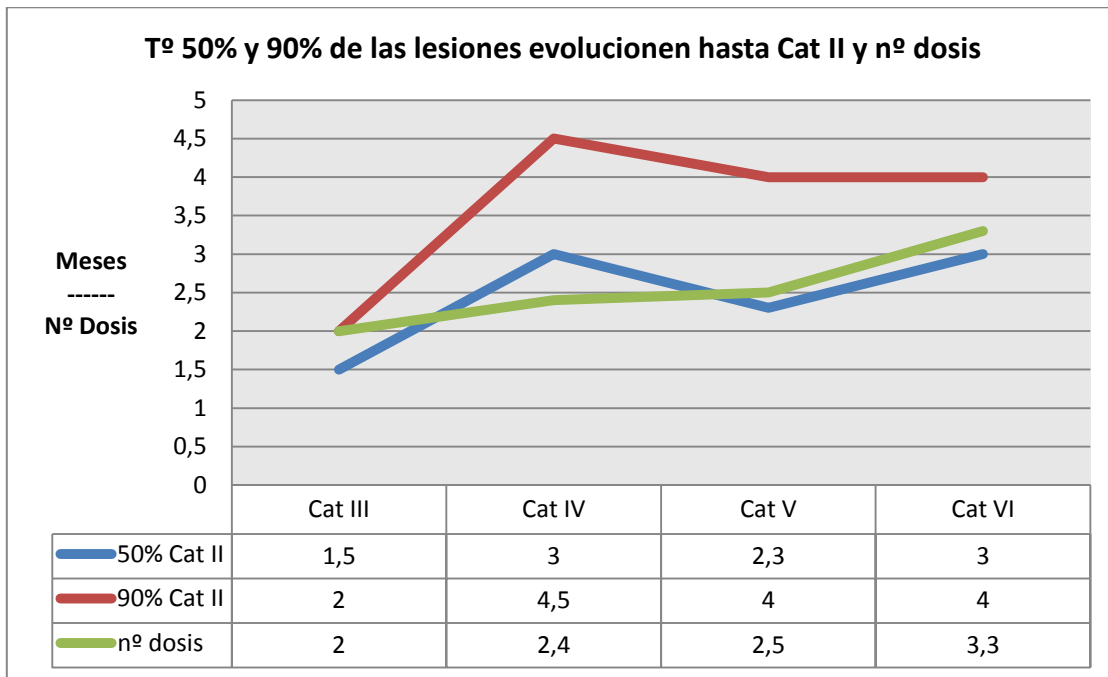


Fig. 22



e) Los exámenes ecográficos de los pacientes tratados con 2 ó más dosis pusieron de manifiesto una evolución positiva de todas las categorías lesionales hasta confluir en la Cat. II a los 4 meses de haberse iniciado el tratamiento. Comparativamente, las lesiones correspondientes a las categorías más graves (VI, V, IV) evolucionaron más

rápidamente que las de Cat. III, ya que confluyeron en la Cat. II en el mismo periodo de tiempo. (Fig. 23 y 24).

Fig. 23

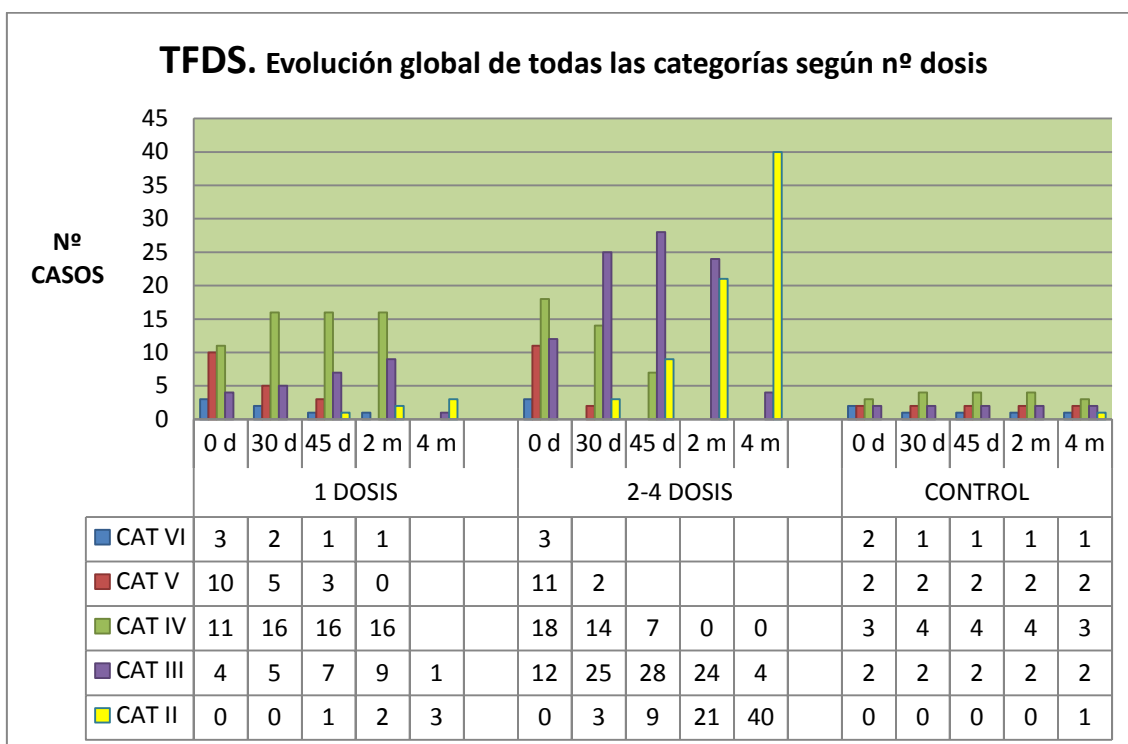
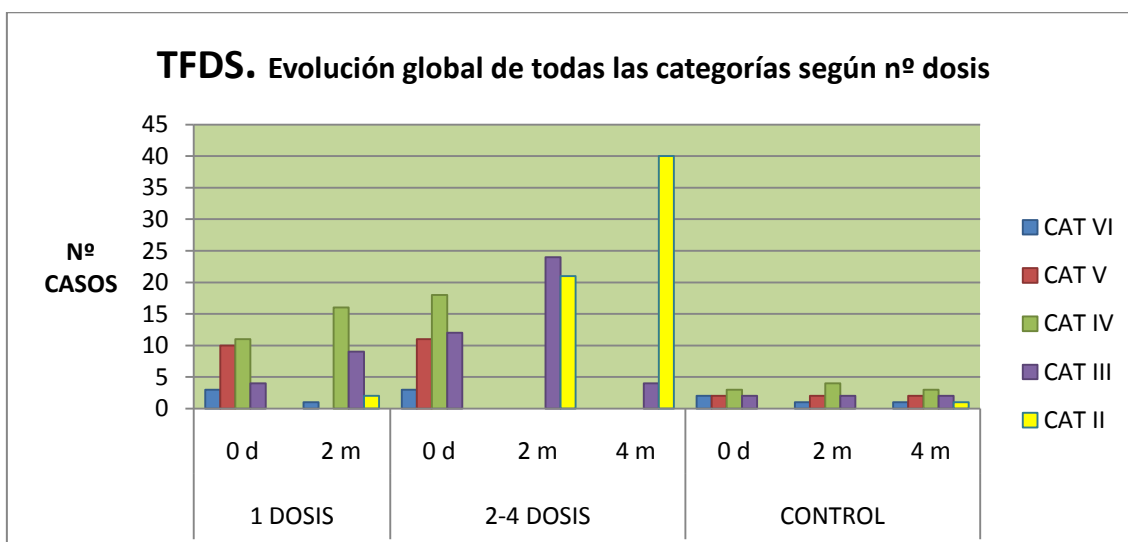


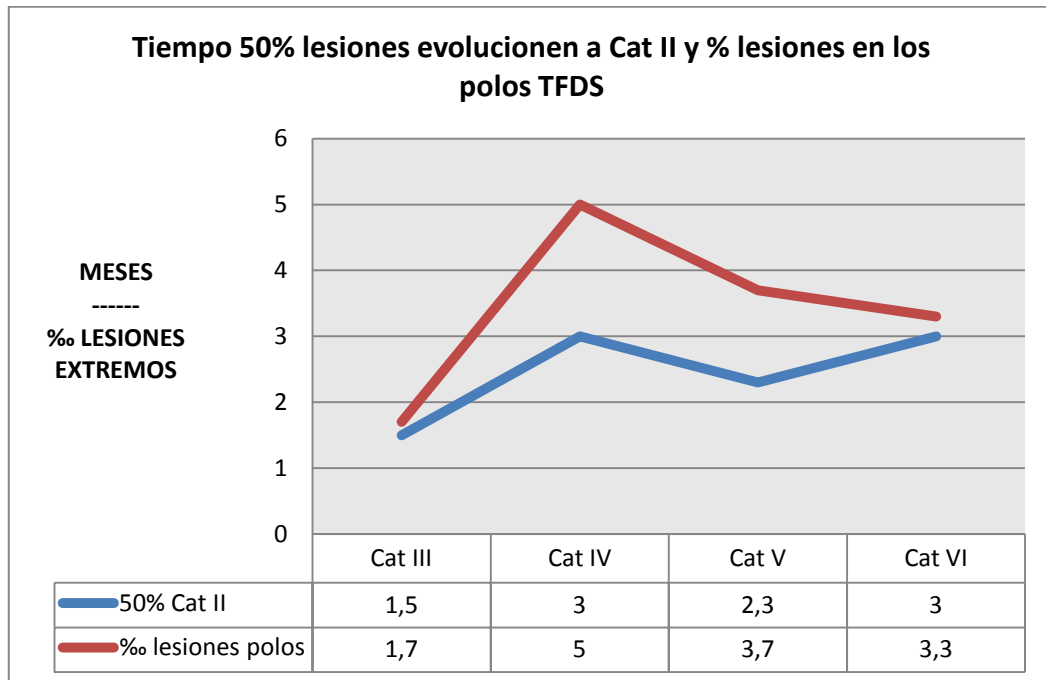
Fig. 24



4. El análisis estadístico aplicado sobre las muestras de casos tratados 2 ó más dosis revela que la influencia del factor "lesión aguda vs crónica" no es significativo en la **evolución de las categorías** ecográficas lesionales (III-VI) comparadas en el momento del inicio y a los 2 y 4 meses de haber iniciado el tratamiento (ANOVA factor "lesión aguda vs crónica" $p= 0,785$ a los 2 meses y $p=0,612$ a los 4 meses). El factor "lesión en los polos" resulta significativo al evaluar la lesión a los 4 meses (ANOVA factor "lesión en los polos"

p= 0,698 a los 2 meses y p= 0,096 a los 4 meses) (Fig. 25). El factor "recuento plaquetario" no es significativo (ANOVA p= 0,75 a los 2 meses y p= 0,68 a los 4 meses).

Fig. 25



5. El análisis estadístico aplicado sobre las muestras de casos tratados con 2 ó más dosis, revela que la influencia del factor "lesión aguda vs crónica" no es significativa en relación a las **recaídas** que se producen antes y después de llegar a la competición (ANOVA factor "lesión aguda vs crónica" p=0,150 para recaídas antes de la competición y p=0,219 para recaídas después de la competición). Por otra parte, el factor "lesión en los polos" se muestra claramente significativo en relación a las **recaídas** antes de la competición (ANOVA factor "polos" antes de la competición p= 0,003) y no significativo en relación a las recaídas que se producen después de haber llegado a la competición (ANOVA factor "polos" después competición p= 0,649). El factor "recuento plaquetario" no tiene significación en relación a las recaídas (ANOVA, p= 0,615).

La mayoría de los caballos volvieron a los entrenamientos a los 3 ½ - 5 ½ meses del inicio del tratamiento. No siempre se pudieron controlar las pautas de entrenamiento e incrementos de carga de trabajo. Los caballos de carreras trotadores suelen competir un promedio de dos veces por mes.

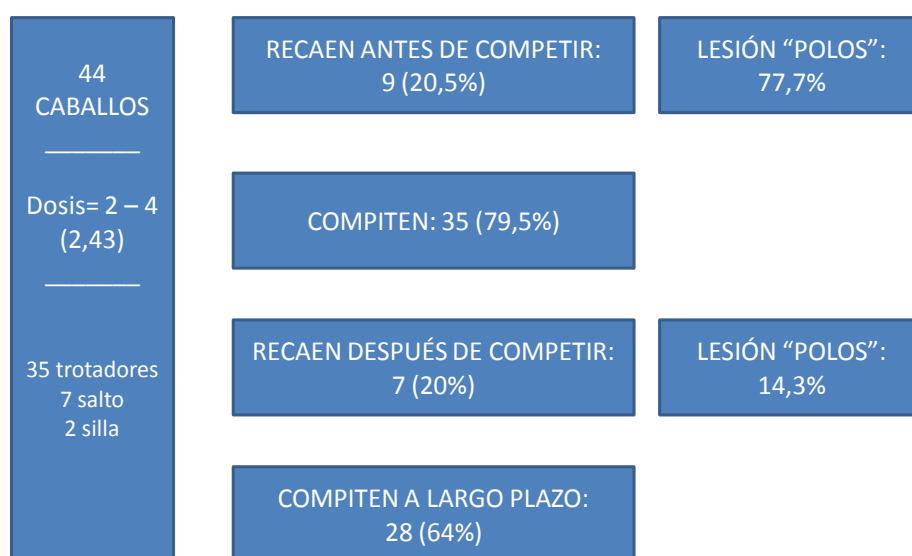
Concluido un periodo de seguimiento (1-3½ años) sobre la muestra de 44 caballos que recibieron 2 ó más dosis de PRP, se obtuvieron los siguientes resultados considerando:

- a) Todas las especialidades deportivas en conjunto (44 casos): 9 casos (20,5%) recayeron antes de volver a la competición, 35 casos (79,5%) volvieron a la competición y de estos, 7 casos (20%) recayeron poco después de volver a competir y los restantes 28 caballos

(64%) han competido durante un periodo de tiempo largo. Casi todas las recaídas (14/16), el 87,5%, se observaron en el grupo de caballos trotadores. (Fig. 26)

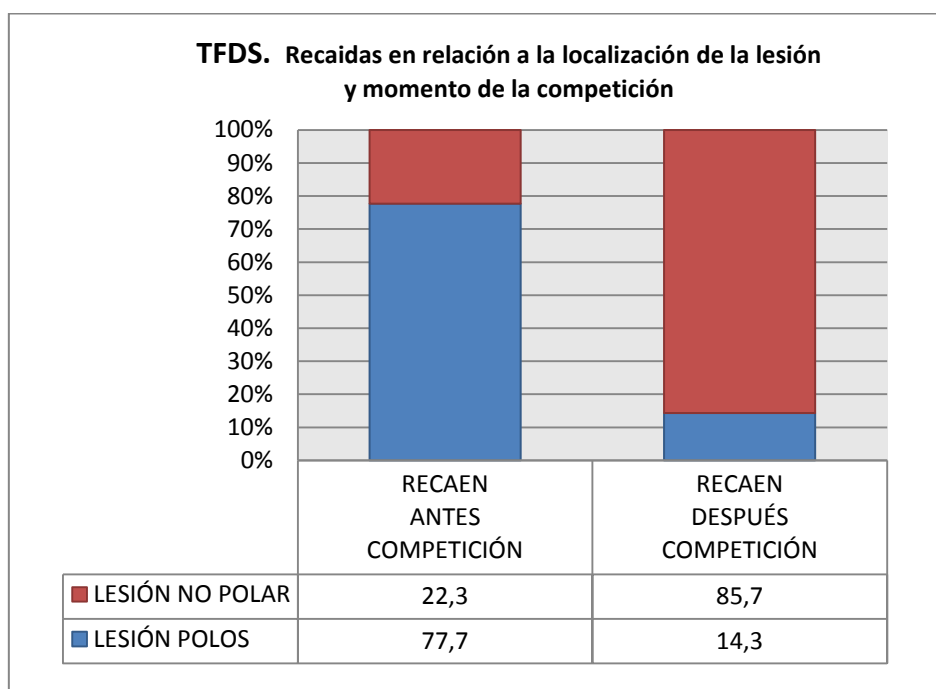
b) Exclusivamente la especialidad de caballos trotadores (33 casos), los resultados sobre la muestra que recibió 2 ó más dosis de PRP fueron: 8 casos (24,2%) recayeron antes de volver a la competición, 25 casos (75,7%) volvieron a la competición y de estos, 6 casos (24%) recayeron poco después de volver a competir y los restantes 19 caballos (57,5%) han competido durante un periodo de tiempo largo.

Fig. 26 TFDS .RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE 44 CABALLOS (2004-2008)



Se apreció la siguiente relación entre la localización de las lesiones en el TFDS consideradas en una sección transversal (central, borde dorsal, borde palmar, extremos) y las recaídas: el 77,7% de los caballos que recayeron antes de llegar a la competición presentaban lesiones localizadas en los extremos del tendón al iniciarse el tratamiento, mientras que esta localización se presentaba en el 14,3% de los caballos que recayeron después de volver a competir. (Fig. 26 y 27).

Fig. 27

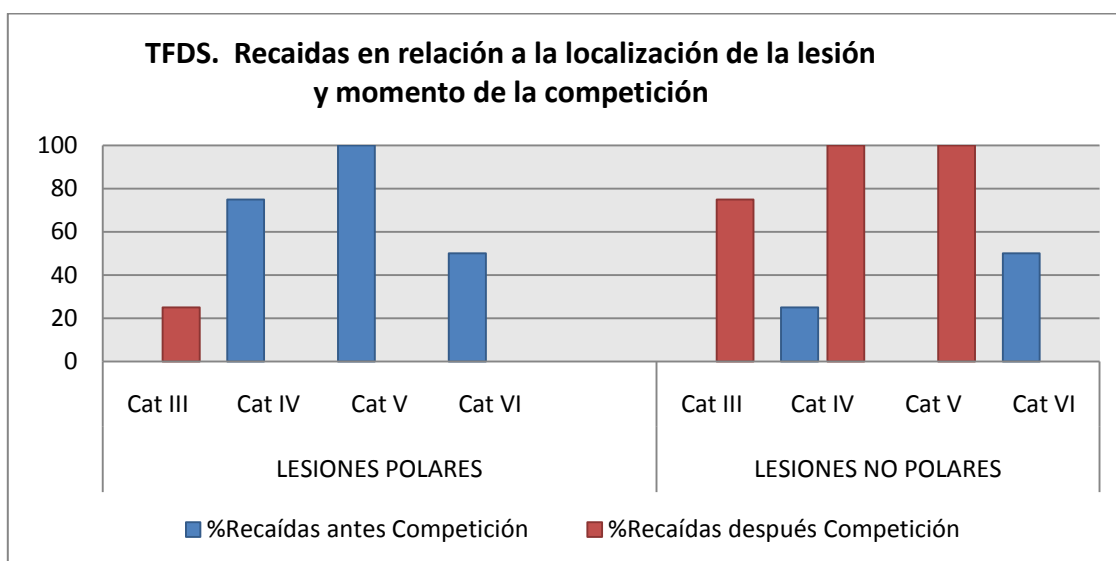


La relación entre las recaídas y las lesiones en los polos puede clasificarse por categorías . (Tabla 3. Fig. 28). Se observa que en las categorías más benignas (Cat. III), las recaídas se producen después de haber competido durante un tiempo. A medida que la gravedad de las lesiones aumenta, las recaídas tienden a producirse antes de alcanzar el nivel de la competición y además aumenta el porcentaje de lesiones en los polos.

Tabla 3. Relación entre las categorías ecográficas lesionales, las recaídas y las lesiones en los polos.

Categoría	Nº Casos	Recaídas	
		Antes Competición. (lesión en polos)	Después Competición. (lesión en polos)
III	12	0 (0)	4 (1) 25%
IV	18	4 (3) 75%	2 (0)
V	11	3 (3) 100%	1 (0)
VI	3	2 (1) 50%	0 (0)
TOTAL	44	9 (7) 77,7%	7 (1) 14,3%

Fig. 28



No se ha observado ninguna relación entre el resultado deportivo y el intervalo de número de dosis 2 a 3.

La disminución del calor y la sensibilidad al tacto fue especialmente significativa después de la primera dosis.

Se administraron 135 dosis de PRP distribuidas entre 73 TFDS (28 TFDS recibieron 1 dosis y 44 recibieron 107 dosis, con una media de 2,43 dosis/tendón), no observándose reacción adversa alguna.

DISCUSIÓN

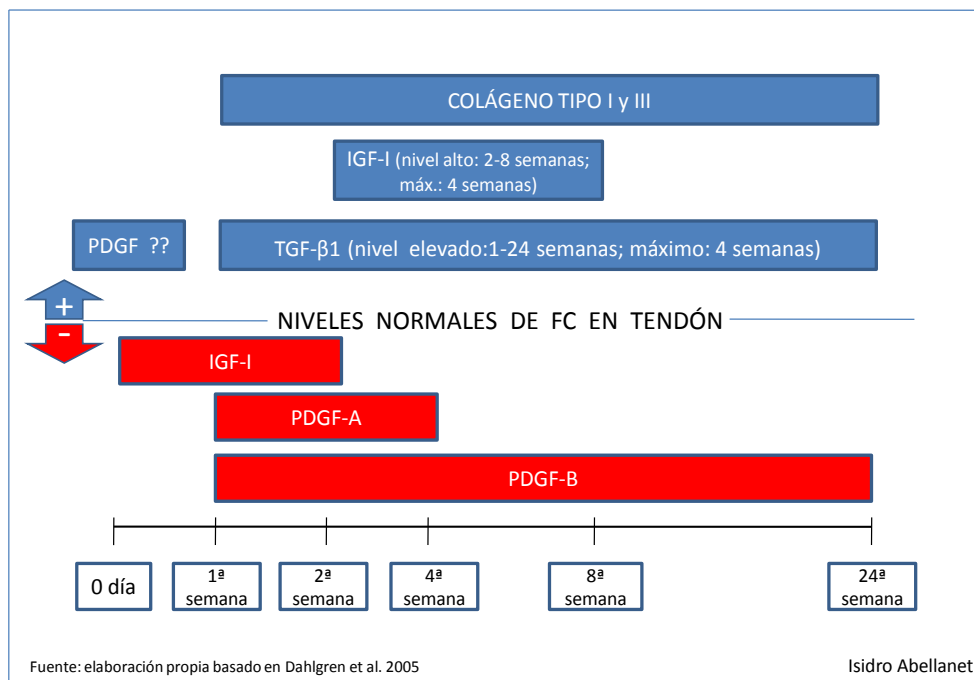
Los casos control no confluyeron hacia categorías más favorables a lo largo del periodo de control de 2 a 4 meses. Se sabe que el periodo de curación natural del tendón puede durar 14-18 meses^{1,9-13}. Algunos autores se refieren al síndrome compartimental para explicar la lenta resolución de las lesiones anecoicas¹⁴.

Los pacientes que recibieron 1 dosis de PRP evolucionaron hacia categorías lesionales más benignas al cabo de los 2 meses. Sin embargo la progresión fue mucho más lenta y de menor alcance que la del grupo que recibió 2 ó más dosis.

Los exámenes ecográficos de los pacientes tratados con 2 ó más dosis pusieron de manifiesto una evolución positiva de todas las categorías lesionales hasta confluir en la Cat. II a los 4 meses de haber iniciado el tratamiento. Creemos que estos resultados encuentran una explicación cuando se analiza el número de dosis administradas. Se ha mencionado la relación dosis-dependiente entre algunos FC y la síntesis de algunos componentes del tendón (ver introducción general). Por lo que sabemos a través de los estudios in vitro sobre explantes de tendones, durante algunas semanas o meses, algunos FC se expresan

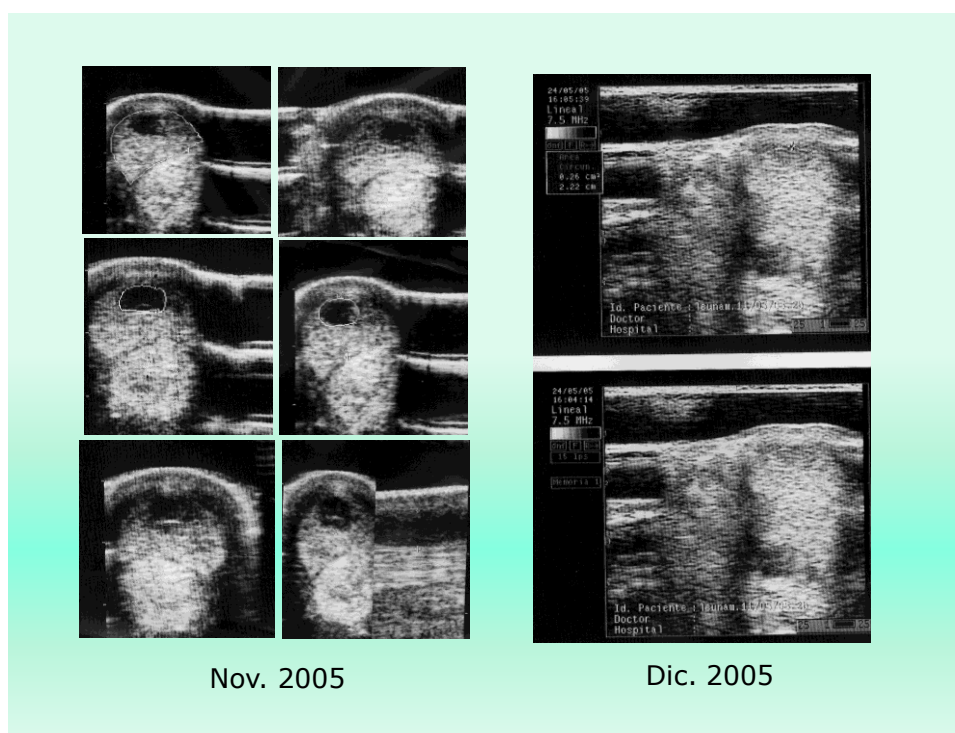
cuantitativamente más que en el tendón sano (IGF-I, TGF- β). Se opina que la expresión de algunos de estos factores (IGF-I, TGF- β) depende, en cierta medida, del PDGF. Algunos estudios in vitro indican que la expresión de PDGF-A y PDGF-B, durante las primeras semanas o meses, está cuantitativamente por debajo de los niveles del tendón sano. Por todo ello, parece lógico que el tratamiento de las lesiones de tendones y ligamentos requiera de múltiples dosis. (Fig. 29)

Fig. 29. SECUENCIA DE INTERVENCIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE CRECIMIENTO



Comparativamente, las lesiones correspondientes a las categorías más graves (VI, V, IV) evolucionaron más rápidamente que las de Cat. III, ya que confluyeron en la Cat. II en el mismo periodo de tiempo. Nuestra hipótesis es que en estas últimas lesiones más graves es más fácil infiltrar cualquier líquido y que, por tanto, recibieron dosis más altas y efectivamente intralesionales de PRP. Inversamente, las dificultades que entraña la inyección intralesional en el caso de lesiones Cat. III y el menor volumen o dosis depositado en el interior del tendón, podrían explicar el mayor tiempo, comparativamente, que se necesita para que confluyan en la Cat II. (Fig. 30)

Fig. 30



Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en la evolución de las lesiones dependiendo de la situación "aguda" o "crónica" en la que se encontrase el tendón en el momento del inicio del tratamiento. Nuestra hipótesis explicativa se basa en que el límite entre estas dos situaciones no está claro y, tal vez, deba replantearse. Es bien sabido que la fases clásicas descritas en la fisiopatología de la curación del tendón (aguda, subaguda y crónica), se solapan. Tras la lesión, la expresión génica para la síntesis de colágeno tipo I y III se mantiene elevada durante 24 semanas²⁴, es decir, es común a las fases aguda, subaguda y crónica. Además, a nivel bioquímico, la actividad anabólica y catabólica coexisten como parte del mecanismo de homeostasis (MMPs y TIMPs). En todo caso, parece que los factores de crecimiento tienen capacidad para activar las secuencias de cascadas bioquímicas que ponen en marcha los procesos de curación con independencia de la fase en la que se encuentre la lesión. Tal vez el término "tendinosis" recoja mejor esta situación. (Fig. 29).

Tampoco se ha observado relación alguna entre el status "agudo" y "crónico" y los porcentajes de recaídas.

Los resultados obtenidos muestran una relación con una significación límite o dudosa ($p=0,92$) entre la lesión localizada en los extremos (polos) de la sección transversal del tendón y la necesidad de un mayor tiempo para evolucionar hasta la Cat. II; en este punto pueden intuirse las limitaciones de la técnica ultrasonográfica.

Sí aparece una relación estadística entre la lesión en los polos y los porcentajes de recaídas.

Al comentar la relación entre las recaídas y las lesiones localizadas en los polos, resulta sorprendentemente que el 77,7% de los caballos que recayeron antes de llegar a competir, presentaban lesiones localizadas en los extremos de la sección transversal de los tendones, mientras que esta localización sólo se observó en el 14,3% de los que recayeron después de competir. Nuestra hipótesis explicativa se basaría en el hecho de que las áreas anecoicas localizadas en los extremos tienen menos posibilidades de recibir elementos reconstructores por estar aisladas. En base a la anatomía microvascular puesta en evidencia por la microradiología, se sabe que la red vascular intratendinosa es más abundante en la periferia del tendón^{12,21}. La lesión anecoica localizada en el extremo de la sección del tendón sólo recibiría aportes desde "línea divisoria" con la parte sana central del tendón, que posee una red vascular más pobre. La red vascular que discurre por el endotenon no podría suministrar elementos reparadores **alrededor de toda** la lesión, sino que los suministraría desde la zona con menos recursos vasculares. De otra parte, muy próximos a los extremos de la sección transversal del tendón, discurren a lo largo del tendón dos vasos sanguíneos, medial y lateral, que se anastomosan con la red vascular del paratenon^{1,12}. La posible afectación de esta red vascular podría aislar aún más la zona anecoica del extremo transversal del tendón, incrementándose la necrosis isquémica. (Fig. 31)



Se ha citado en muchas ocasiones la relación entre la gravedad de las categorías ecográficas lesionales y el pronóstico. En el presente estudio, el 83,3% de las recaídas acontecidas entre los casos clasificados en las Cat. VI y V se produjeron en el periodo anterior a la competición. Con este dato parece clara la relación entre la gravedad de la lesión y el pronóstico más desfavorable, pero también se puede argumentar que la ecografía, aún siendo el método de referencia para diagnosticar y realizar seguimientos de las lesiones tendinosas, es un método poco sensible^{12,14} a determinados niveles y que algunos de estos caballos se reincorporaron a las rutinas de trabajo demasiado pronto, cuando aún necesitaban más tiempo de recuperación o tratamientos complementarios. Por otra parte, el 100% de las recaídas acontecidas entre los casos clasificados en la Cat III se produjeron después de volver a la competición y en el grupo de caballos trotones de carreras, lo que concuerda con la mayor benignidad de las lesiones de la Cat. III.

Casi todas las recaídas se observaron en el grupo de caballos de carreras al trote. En este grupo se acumulan más factores de riesgo^{1,5}, como la velocidad, las superficies duras, la repetición del estrés y, con frecuencia, el balance del casco forzado.

Los resultados obtenidos con el tratamiento con PRP son más favorables que los obtenidos mediante tratamientos reparadores convencionales: el 75,7-79,5% vs 40-50% de casos que vuelven a competir, respectivamente; y el 20-24% vs 43-93% de recaídas después de competir, respectivamente^{9-11,15-20}.

En los hipódromos locales los caballos trotadores compiten un promedio de dos veces al mes durante casi todo el año. A lo largo de estos años, en que se ha realizado este estudio, no siempre ha sido posible controlar los protocolos de reincorporación progresiva al trabajo. Aún así, el porcentaje de recaídas, como se ha citado antes, es más favorable. Tal vez cabe comentar que los entrenadores contemplan los nuevos tratamientos más como un recurso para abreviar los periodos de descanso que como un método para reducir las recaídas.

Entendemos que el factor "recuento plaquetario" no resulta significativo porque con el procedimiento seguido para la obtención de PRP se asegura un suministro mínimo para un intervalo de tiempo.

Tras haber suministrado un total de 135 dosis de PRP en TFDS, se confirma la significativa disminución del dolor tras la primera dosis de PRP y la buena tolerancia al PRP autólogo y ausencia de complicaciones, observados en otros estudios piloto^{22,23}.

CONCLUSIONES

Según se deduce del análisis estadístico, parece aconsejable administrar, al menos, dos dosis de PRP, en función de la información aportada por la evaluación ecográfica.

Es importante que la administración sea intralesional.

No parece relevante que el TFDS se encuentre en una fase aguda o crónica, con la única precaución de no administrar el PRP dentro de los 10-15 días siguientes a la lesión.

Se debe ser prudente al valorar las imágenes ecográficas y conviene recordar las limitaciones de la ecografía en el momento de dar de alta el paciente.

Si la lesión se localiza en los polos de la sección transversal del TFDS es recomendable que se administren varias dosis y que se prescriba un periodo de recuperación más largo.

Igualmente, si atendemos a los porcentajes de recaídas, parecen requerir más dosis y más tiempo de recuperación las lesiones más graves (Cat. V y VI).

Parece que el recuento plaquetario inicial no tiene influencia si el PRP se prepara a partir de un volumen de sangre de 100 ml, mediante el método de tubo y doble centrifugación

El PRP se puede utilizar de forma segura en caballos y representa una alternativa novedosa y valiosa para el tratamiento de lesiones TFDS, ya que puede proporcionar factores de crecimiento que aceleran la curación, mejoran los porcentajes de curación y disminuyen las recaídas en comparación con los tratamientos convencionales de la medicina reparativa.

El coste económico del tratamiento con PRP obtenido por el método de tubo y doble centrifugación es comparable al de los tratamientos habituales convencionales.

Las estrictas condiciones de asepsia que requiere el método de tubo utilizado para la obtención de PRP no lo hacen recomendable para uso domiciliario.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Smith RKW, Goodship AE. Tendon and ligament physiology. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, (eds): *Equine Sports Medicine and Surgery*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2004.
2. Williams RB, Hammond CJ, Wood JLN. Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998. *Equine Vet J* 2001;33:478-486.
3. Perkins NR, Reis SWJ, Morris RS. Profiling the New Zealand Thoroughbred racing industry. 2. Conditions interfering with training and racing. *N Z Vet J* 2005. 53:69-76.
4. Lam Kh, Parkin TDH, Riggs CM et al. Descriptive analysis of retirement of Thoroughbred racehorses due to tendón injuries at the Hong Kong Jockey Club (1992-2004). *Equine Vet J* 2007;39:143-148.
5. Riemersma DJ, van der Bogert AJ, Jansen MO, et al. : Influence of shoeing on ground reaction forces and tendón strains in the forelimb of ponies. *Equine Vet J* 1996; 28:126-132 .
6. American Association of Equine Practitioners (AAEP). *Guide for Veterinary Service and Judging of equestrian Events: Definition and Classification of Lameness*. Lexington: AAEP. 1991, p19.
7. Rantanen NW, Jorgensen JS, Genovese RL. Ultrasonographic Evaluation of the Equine Limb: Technique. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003.
8. Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M. Evaluation of Single and Double Tube Methods for Concentrating Equine Platelets. *Res Vet Science* 81 (2006)237-245.
9. Wilson JH, Robinson LA, Jensen RC, McArdel CJ. Equine Soft Tissue Injuries Associated with Racing: Descriptive Statistics from American Racetracks. *Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996*.
10. Genovese R, Reef VB, Longo KL, Byrd JW, Davis WM. Superficial Digital Flexor Tendonitis: Long Term sonographic and Clinical Study of racehorses. *Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996*.
11. Jorgensen JS, Genovese RL. Superficial Digital Flexor tendonitis. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 628-635.
12. Davis CS, Smith RKW, *Diagnosis and Management of Tendon and Ligament Disorders*. In: Auer JA, Stick JA, *Equine Surgery. 3rd* Saunders Elsevier, 2006.

13. Smith JJ, Ross MW, Smith RK. Anabolic Effects of Acellular Bone Marrow, Platelet Rich Plasma, and Serum on Equine Suspensory Ligament Fibroblasts in Vitro. *Vet. Comp Orthop Traumatol.* 2006;19(1):43-7.
14. Kold SE. Correlation Between Physical Examination Findings, Ultrasound and Pathology. In *Proceedings BEVA 2005.*
15. Smith RKW. Pathophysiology of Tendon Injury. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse.* Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 616-628.
16. Clegg P. Tendon Injury and Repair at a Cellular Level. *Proceedings BEVA Congress 2005*
17. Goodship A. The Pathophysiology of the tendon and ligament injuries and the role of the stem cells in their treatment. *Proceedings EspoM Aachen 2006.*
18. Nixon A. Injectable Treatment Options for Tendinitis: Choosing Between Growth Factors, Bone Marrow Aspirate, Platelet Enriched Plasma or Cultured Stem Cell. In *Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten.* Essen. Deutschland. 2007.
19. Dyson SJ, Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J.* 2004;36:415-9.
20. Marr CM, Love S, McKellar Q. Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses. *Vet. Rec.* 1993;132:476-479.
21. Strömberg B, Tufvesson G. Lesions of the superficial flexor tendons in racehorses: a microangiographic and histopathologic study. *Clin Orthop* 1969;62:113.
22. Carmona JU, Argüelles D, Climent F. Report of the intraarticular treatment with platelet rich plasma in 7 horses with joint disease. In *Proceedings 14th ECVS Annual Meeting.* Lyon. France. 2005.
23. Argüelles D, Carmona JU, Climent F. Platelet Rich Plasma as a Treatment of Tendon and Ligament Injuries in the Horse. In *Proceedings 14th ECVS Annual Meeting.* Lyon. France. 2005.
24. Dahlgren LA, Mohamed HO, Nixon AJ. Temporal expression of Growth Factors and Matrix Molecules in Healing Tendon Lesions. *J Orthop Res* 2005 Jan;23(1):84-92.
25. Butcher MT, Hermanson JW, Ducharme NG, et al: Superficial flexor tendon lesions in racehorses as a sequela to muscle fatigue: A preliminary study. *Equine Vet J.* 2007;39(6):540-5.
26. Birch HL, Wilson AM, Goodship AE. The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *J Exp Biol* 1997;200:1703.

1.2.2 TENDÓN FLEXOR DIGITAL PROFUNDO (TFDP)

INTRODUCCIÓN

La incidencia de las lesiones de los tendones y ligamentos se ha estimado entre el 8% y el 46%¹⁻³. En el PSI, las lesiones de los tendones constituyen la causa más importante de retirada de las carreras⁴. Las lesiones del TFDS son las más frecuentes entre los tejidos blandos distales al carpo, pero en ciertas disciplinas deportivas tales como las carreras de trotadores (*Standardbreds*) y las competiciones de salto, doma, resistencia, polo, doma vaquera y enganches, se observa un incremento de lesiones del LS, TFDP y LATFDP.

A nivel metacarpiano y metatarsiano las lesiones del TFDP suelen estar asociadas, en mayor o menor grado, a desmitis del LATFDP; a un nivel inferior, en el transcurso por la cara palmar de la articulación metacarpotarsofalangiana, pueden verse lesiones exclusivas del TFDP, normalmente en forma de roturas longitudinales y, en menor grado, en forma de lesiones centrales, acompañadas habitualmente de efusión de la vaina sinovial^{5,6}. Se pueden ver lesiones que afectan exclusivamente al LATFDP ya que éste tiene una resistencia a la ruptura bastante menor y se ha visto que con la edad pueden aparecer cambios estructurales que aún lo debilitan más⁷.

El TFDP tiene una alta elasticidad (1585 MPa) y una considerable resistencia a la ruptura (1700 daN). El LATFDP tiene una capacidad elástica baja (490 MPa) y una menor resistencia a la ruptura (490 daN). El TFDP limita la extensión del carpo y del menudillo cuando están sometidos a cargas altas. A nivel de la cara palmar del menudillo, además de las fuerzas de tensión, el cambio de dirección implica también una fuerza de compresión⁵. El LATFDP contribuye con el TFDP a limitar la extensión del carpo.

Se supone que el TFDS y LS son más propensos a las lesiones que el TFDP porque los primeros reciben la carga en el momento de apoyo, mientras que el TFDP y LATFDP intervienen algo más tarde, es decir, al principio de la fase de propulsión¹. En posición estática, se sabe que la elevación de los talones relaja la tensión del TFDP y LATFDP; contrariamente, la disminución de la altura de los talones o la elevación de la lumbre, suponen un incremento de la tensión del TFDP y LATFDP. Por ello, tal vez los factores de riesgo que se han descrito tradicionalmente para las lesiones del TFDS, afecten de distinta forma a estas otras estructuras anatómicas.

FACTORES DE RIESGO

Las lesiones de los TFDP acontecen principalmente en aquellas situaciones en las que se prolonga la fase inicial de la propulsión, ya sea debida a una conformación del casco con las lumbres largas y/o con los talones muy bajos, o porque la superficie de trabajo es muy mullida y facilita el hundimiento del casco y, por consiguiente, dificulta la fase de propulsión aumentando el efecto palanca y la extensión de las articulaciones interfalangiánas. Estas condiciones se reproducen con más frecuencia en caballos de salto, doma clásica y vaquera.

Las superficies irregulares pueden provocar un hundimiento excesivo de los talones y sobrecarga del TFDP y LATFDP⁸.

La fatiga es otro factor de riesgo ya que a medida que ésta aumenta, se modifican las características del tranco y, por tanto, las cargas sobre los tendones. La fatiga muscular conduce a una pérdida de coordinación y a un aumento del riesgo de lesión.

El peso del jinete y el sobrepeso del propio caballo también influyen como carga añadida.

Por lo que respecta a la edad, parece existir una clara relación con las lesiones de LATFDP, ya que esta lesión se observa más a medida que aumenta la edad de los caballos destinados a las disciplinas de salto o a la doma.

Los caballos presentados en estos dos estudios (TFDP y LATFDP) están distribuidos en disciplinas deportivas que reflejan lo que se ha comentado anteriormente.

Existen pocos datos concernientes a los porcentajes de éxito y de recaídas de los distintos tratamientos tradicionales aplicados a estos dos tejidos. Un estudio clínico⁹ señala que, sobre una muestra inicial de 27 caballos con lesiones del LATFDP, 12 caballos, el 44%, volvieron a trabajar; dos caballos recayeron al poco tiempo y 10 caballos (37%) se mantuvieron compitiendo durante un periodo de tiempo largo (9 meses a 4 años).

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

En este estudio se incluyeron 10 caballos de diferentes sexos, edades, razas y aptitudes (5 trotadores, 2 doma, 3 silla). Se trataron un total de 10 extremidades. Del total de la muestra, 9 casos presentaban lesiones agudas y 1 crónica. Se realizó un completo examen de las cojeras incluyendo una determinación del grado de las mismas, bloqueos anestésicos perineurales e intraarticulares para localizar las lesiones, radiografías y ecografías.

Después de realizar los respectivos exámenes ultrasonográficos, la muestra de 10 caballos pacientes con lesiones TFDP presentaba la siguiente distribución: 6 pacientes Categoría III, de los cuales 2 recibieron 1 dosis de PRP y 4 recibieron 2 dosis; 3 pacientes Cat. IV, de los cuales 2 recibieron 1 dosis de PRP y 1 recibió 4 dosis; 1 paciente Cat. V, que recibió 2 dosis de PRP; ningún paciente Cat. VI.

Por tanto, 4 caballos recibieron 1 dosis de PRP y 6 caballos recibieron 2 ó más dosis. (Tabla 1).

Los pacientes se volvieron a evaluar antes de cada tratamiento y a los 45 días, 2 meses y 4 meses del inicio del tratamiento. El seguimiento continuó durante un periodo mínimo de un año y hasta tres años y medio.

Tabla 1 CATEGORÍA	Nº caballos 1 dosis	Nº caballos 2- 4 dosis
III Aguda	1	4 (d=2)
III Crónica	1	0 (d=0)
IV Aguda	2	1 (d=4)
IV Crónica	0	0 (d=0)
V Aguda	0	1 (d=2)
V Crónica	0	0 (d=0)
VI Aguda	0	0 (d=0)
VI Crónica	0	0 (d=0)
TOTAL	4	6 (d=2,2)

GRUPO CONTROL

Se aplicó la misma metodología de examen de cojera sobre un grupo de 4 caballos de diferentes sexos, edades, razas y aptitudes (2 doma y 2 silla) que por diversos motivos no se sometieron a ningún tratamiento, lo que representa un total de 4 extremidades. Del total de la muestra, 2 caballos presentaban lesiones agudas y otros 2, crónicas. Después de practicar los correspondientes exámenes ecográficos, la muestra del grupo control de 4 caballos con lesiones TFDP presentaba la siguiente distribución: 1 pacientes Cat. III crónica, 1 pacientes Cat. IV crónica, 1 pacientes Cat. V aguda, 1 pacientes Cat. VI aguda.

EVALUACIÓN DE LA COJERA

Las cojeras se clasificaron de 0 a 5, siguiendo los criterios AAEP¹⁰. Donde 0= normal y 5= el caballo no es capaz de soportar peso sobre la extremidad.

Los resultados de los test de flexión durante un minuto se clasificaron en una escala de 0 a 3, donde 0= resultado negativo, 1= ligero incremento de la cojera, 2= moderado incremento de la cojera y 3= severo incremento de la cojera.

Se evaluó el calor local, sensibilidad la palpación y aspecto del tendón.

EVALUACIÓN ECOGRÁFICA

Las lesiones ecográficas se clasificaron según las seis categorías (I-VI) descritas en una modificación de la clasificación original de Rantanen et al¹¹ para las lesiones de tendones y ligamentos. Los parámetros ultrasónicos utilizados incluyen: el área de la sección transversal, el área de la máxima lesión, porcentaje de la zona de máxima lesión respecto a la porción sana en la sección transversal, patrón ecogénico de la lesión y orientación de las fibras en corte longitudinal (tabla 2).

Tabla 2

EVALUACIÓN ECOGRÁFICA DE LAS LESIONES (ESCALA RANTANEN et al. I – VI)								
	Isoecoico	Incremento Grosor	Hipoecoico	Anecoico	3 Zonas	5 Zonas	6-7 Zonas	11 Zonas
Cat. I	SI	<25-39%						
Cat. II	SI	>39%						
Cat. III			SI	NO				
Cat. IV				SI	1-25%	1-20%	1-15%	1-10%
Cat. V				SI	26-35%	21-30%	16-25%	11-20%
Cat. VI				SI	>35%	>30%	>25%	>20%

SEGUIMIENTO CLÍNICO

El estudio se inició en diciembre de 2004 y se finalizó en octubre de 2008.

De la muestra de 4 caballos que sólo recibieron 1 dosis de PRP, se registraron los datos correspondientes a la evaluación clínica y ecográfica de la cojera durante los dos primeros meses; a partir de este periodo, no se pudieron obtener datos suficientes sobre su evaluación ecográfica, carrera deportiva y las recaídas de un número significativo de caballos, por lo que esta muestra sólo se analiza estadísticamente con los datos obtenidos durante los 2 primeros meses.

De la muestra de 6 caballos que recibieron 2 ó más dosis de PRP, se registraron los datos correspondientes a la evaluación clínica y ecográfica y a sus carreras deportivas, prestando especial atención al rendimiento atlético y a las recaídas acontecidas antes y después de volver a la competición. El seguimiento oscila entre un mínimo de un año y hasta tres años y medio desde la fecha de inicio del tratamiento.

PREPARACIÓN DEL PRP

El PRP se preparó según el método de tubo y doble centrifugación¹², obteniendo 100 ml de sangre de forma aséptica de la vena yugular mediante una palomilla 16G (Braun) y depositándola en tubos al vacío, estériles, de 5 ml., conteniendo citrato sódico al 3,2 %. A continuación los tubos se centrifugan a 120g durante 5 minutos. En condiciones asépticas, se aspira el 50% de la columna de plasma que está adyacente a la capa leucocitaria. El plasma obtenido se vuelve a centrifugar a 240g durante 5 minutos y se recupera el 25% de la columna de plasma adyacente al sedimento y éste mismo. Esta última fracción, contenida en jeringas estériles, se activa con cloruro cálcico (4.5mEq/5ml) adicionando 50µl / 1 ml PRP. Se realizó un recuento plaquetario de cada muestra de sangre.

ESQUEMA DE TRATAMIENTO CON PRP

La zona afectada de la extremidad se preparó de forma aséptica para las inyecciones. Los caballos se sedaron con detomidina (Domosedan[®], Pfizer) – butorphanol (Torbugesic[®], Fort Dodge Laboratories Inc.). El PRP se inyectó intralesionalmente entre 1 y 4 veces en intervalos de 10-15 días, según la evolución de la escala ecográfica. Durante las semanas que duró el tratamiento los caballos se mantuvieron en reposo o dando paseos a la mano. No se administró ningún otro tratamiento sistémico o tópico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1. En primer lugar, sobre la muestra total, se aplicó el test T para muestras cuantitativas independientes para averiguar si la distribución de la muestra de los casos control era representativa o comparable con las muestras de los casos tratados.

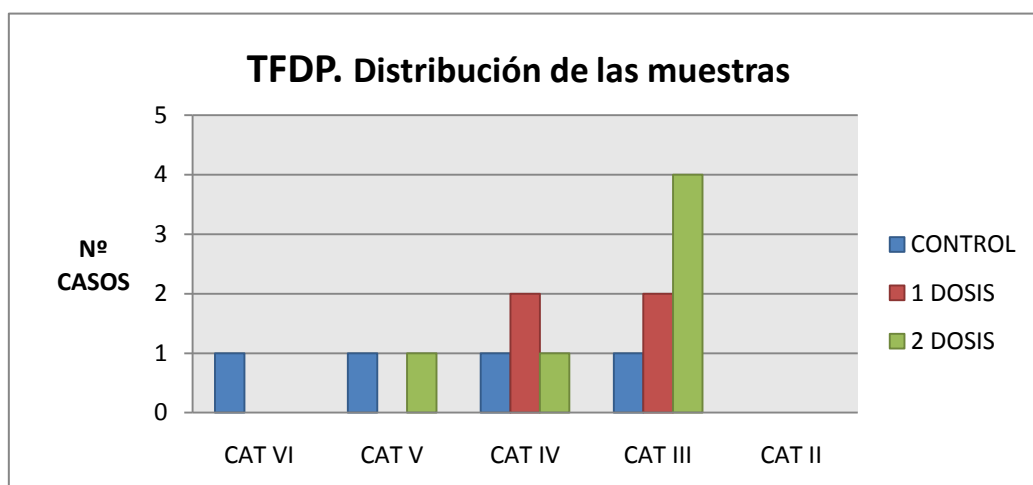
2. En segundo lugar, sobre la muestra de casos control, que no recibieron dosis de PRP, se aplicó el test Paired-T (2-tailed) y el test Wilcoxon para muestras cuantitativas dependientes a efectos de comparar la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-VI) en el momento del inicio del control y a los 2 meses. También se aplicó el test ANOVA para determinar la influencia del factor "lesión aguda vs crónica" en el resultado a los 2 meses de haberse iniciado el control.
3. En tercer lugar, sobre las muestras de casos tratados con 1 dosis y 2 ó más dosis, se aplicó el test Paired-T (2-tailed) y test Wilcoxon para muestras cuantitativas dependientes para comparar la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-VI) en el momento del inicio y a los 2 y 4 meses del tratamiento.
4. En cuarto lugar, sobre las muestras de casos tratados con 2 ó más dosis, se aplicó el test ANOVA para valorar la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica" y "recuento plaquetario" en la evolución de las lesiones a los 2 y 4 meses de haber iniciado el tratamiento.
5. En quinto lugar, sobre las muestras de casos tratados con 2 ó más dosis, se aplicó el test ANOVA para valorar la influencia del factor "lesión aguda vs crónica" en las recaídas.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante software SPSS ver.14. Se estableció un intervalo de confianza de 95% y se consideraron valores de $P < 0,05$ como significativos.

RESULTADOS

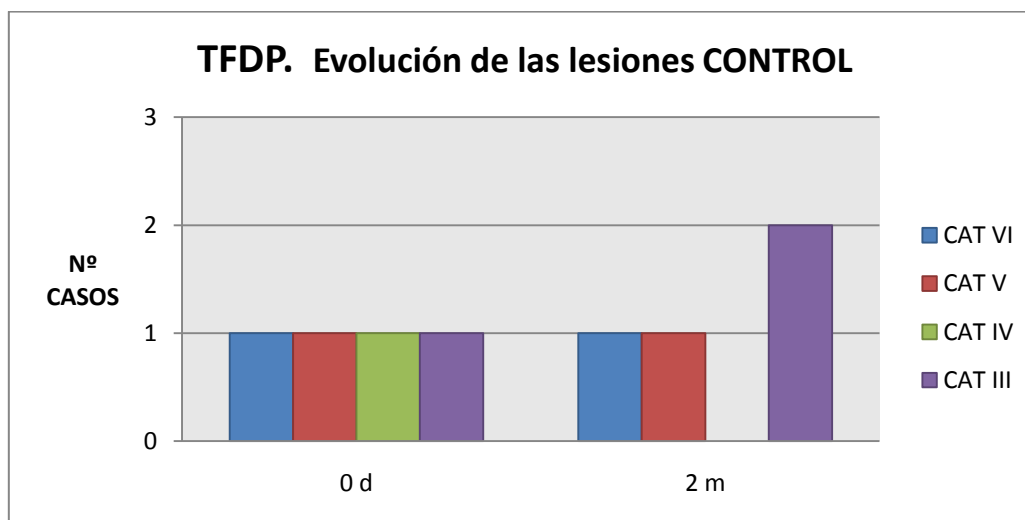
1. El análisis estadístico para comparar las muestras independientes, pacientes y grupo control, mediante el test T mostró una diferencia no significativa entre las muestras "control" y "1 dosis" ($p=0,353$; 2-tailed); y entre las muestras "control" y "2 ó más dosis" ($p=0,058$; 2 tailed), por lo que se consideró que la muestra de casos control era representativa de la muestra de casos tratados con 1 dosis y 2 ó más dosis. (Fig. 1).

Fig. 1



2. El análisis estadístico de la muestra control revela que no se observan diferencias significativas en la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-VI) comparadas en el momento del inicio del control y a los 2 meses de haber iniciado el control (Paired T test $p= 0,391$; 2-tailed y test Wilcoxon $p= 0,317$; 2-tailed). (Fig. 1). El test ANOVA para determinar la influencia del factor "lesión aguda vs crónica" en el resultado a los 2 meses de haber iniciado el control, revela que este factor influye significativamente en dicha evolución (ANOVA factor "lesión aguda vs crónica", $p=0,038$). (Fig. 2).

Fig. 2



3. El análisis estadístico aplicado sobre las muestras de casos tratados con 1 dosis revela diferencias no significativas, o en el límite de la significación en la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-VI) comparadas en el momento del inicio del tratamiento y a los 2 meses de haber iniciado el tratamiento (Paired-T test $p<0,058$; 2-tailed y test Wilcoxon $p<0,083$; 2-tailed) (Fig. 3). Sin embargo, la muestra que fue tratada con 2 ó más dosis, experimentó una evolución significativa a los 2 meses (Paired T test $p=0,001$; 2 -tailed) y a las 4 meses (Paired T test $p=0,007$; 2 -tailed). (Fig. 4).

Los exámenes ecográficos de los pacientes tratados con 1 dosis pusieron de manifiesto que sólo el 25% de los casos habían progresado hasta la Cat II a los 2 meses, mientras que el 83,3% de aquellos que recibieron 2 ó más dosis confluyeron en la Cat. II a los 2 meses y el 100% a los 4 meses de haberse iniciado el tratamiento. (Fig.5 y 6) Comparativamente, las lesiones correspondientes a las categorías más graves (V, IV) evolucionaron más rápidamente que las de Cat. III, ya que confluyeron en la Cat. II en el mismo periodo de tiempo. (Fig. 7,8 y 9).

Fig. 3

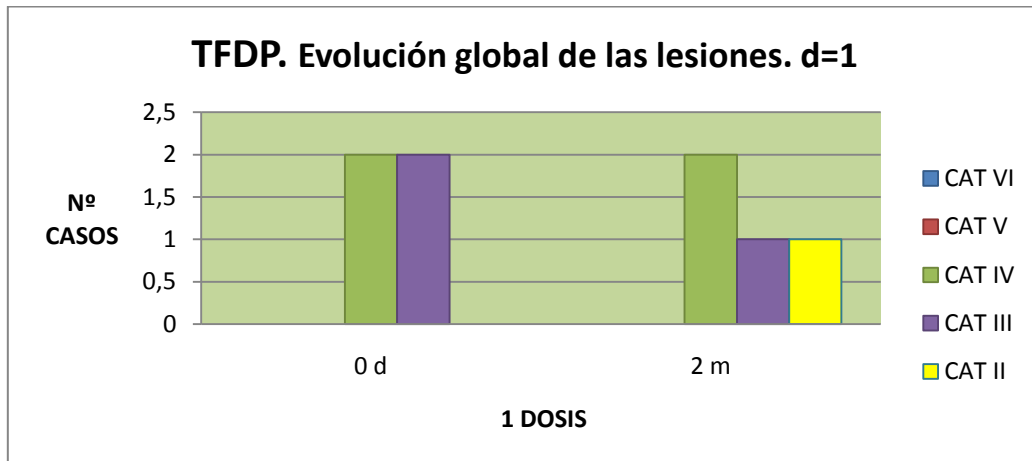


Fig. 4

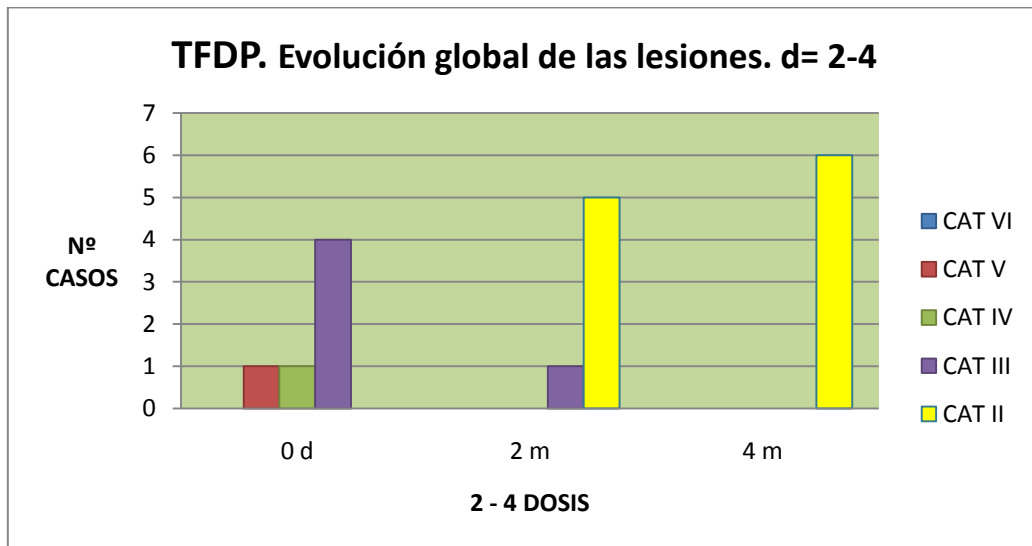


Fig. 5

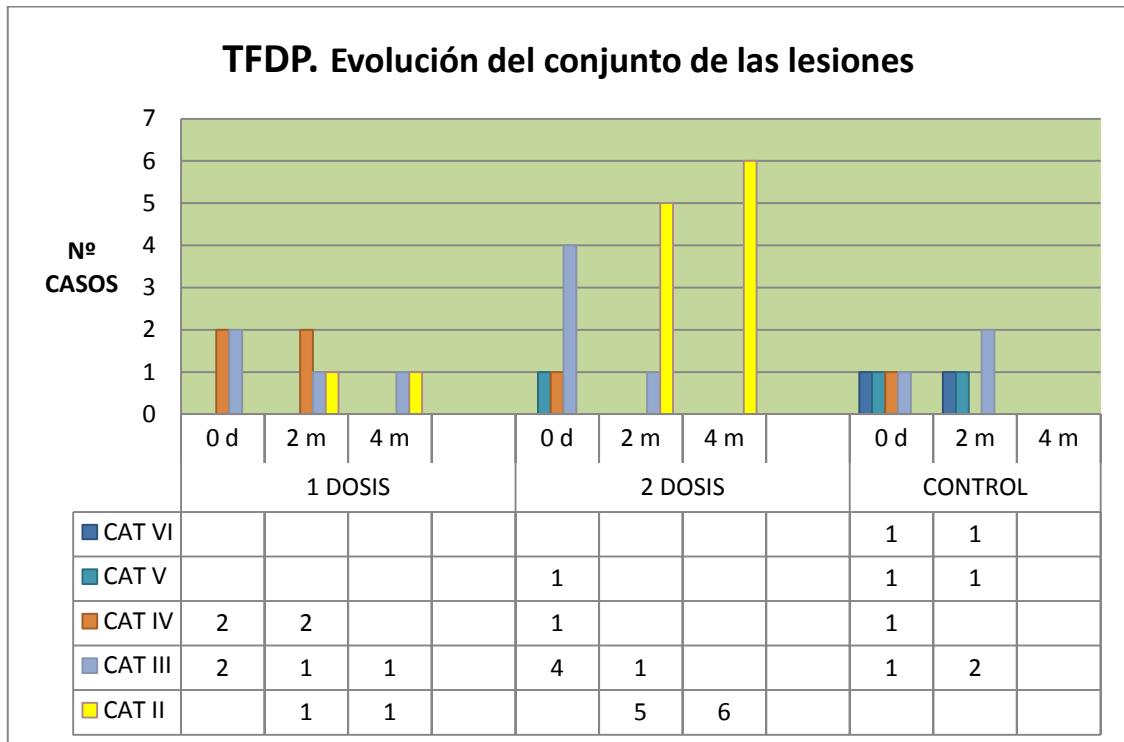


Fig. 6

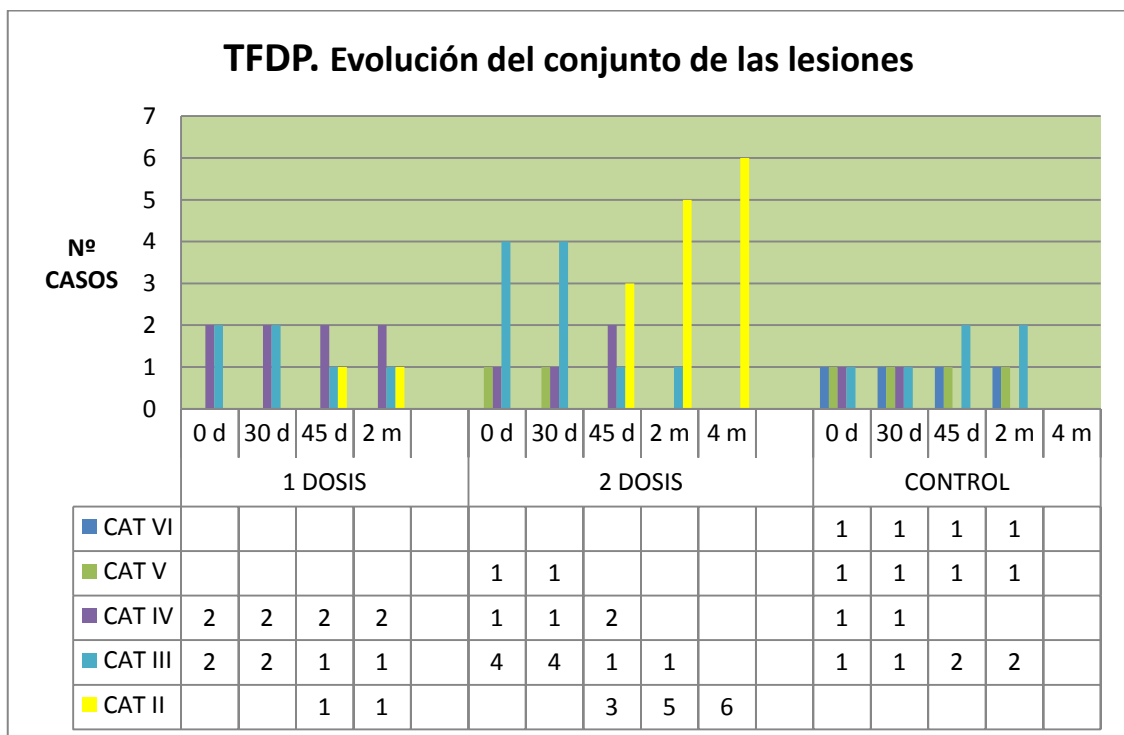
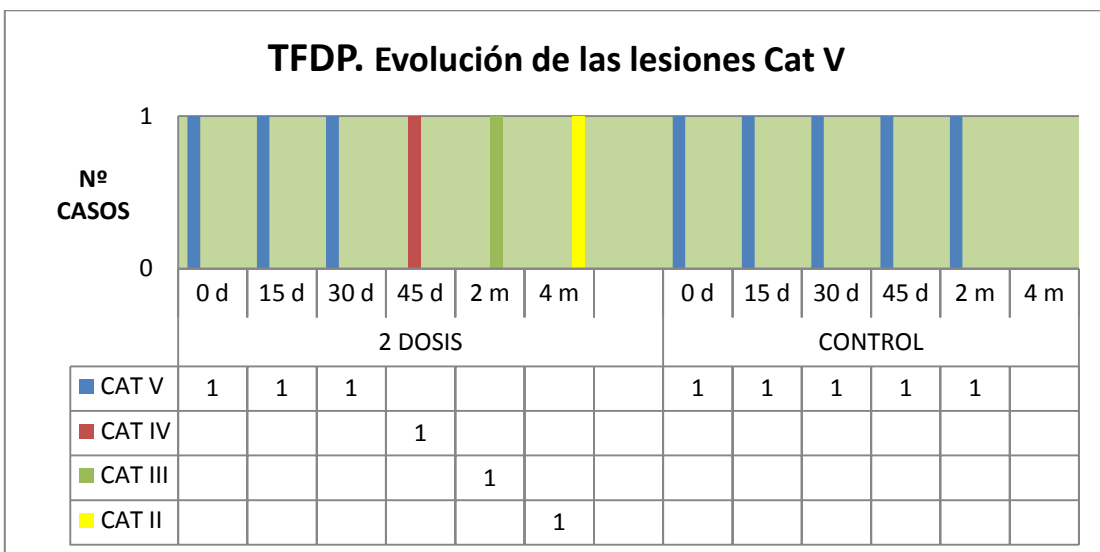
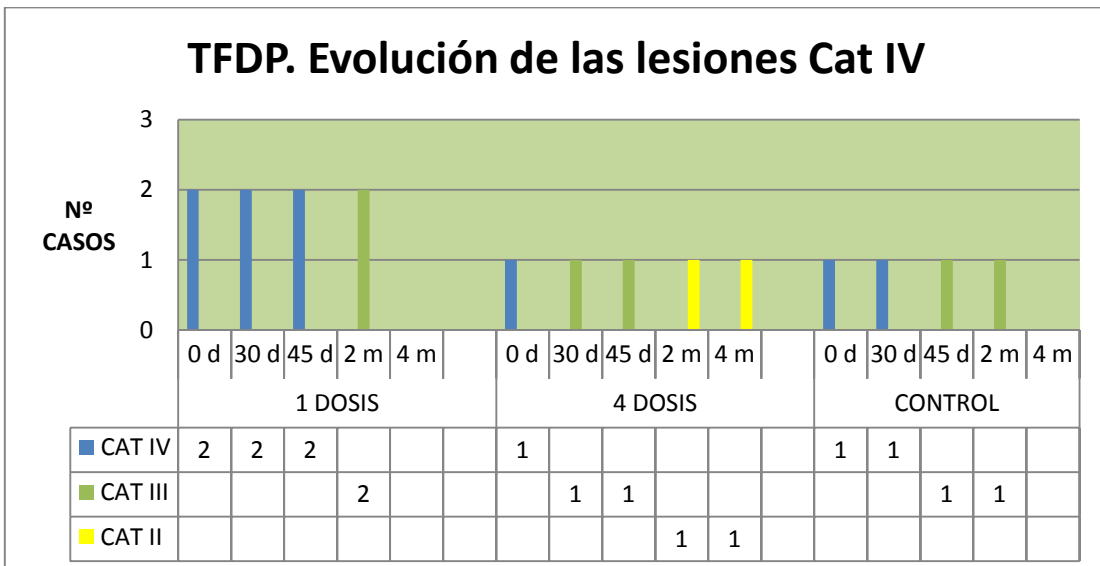
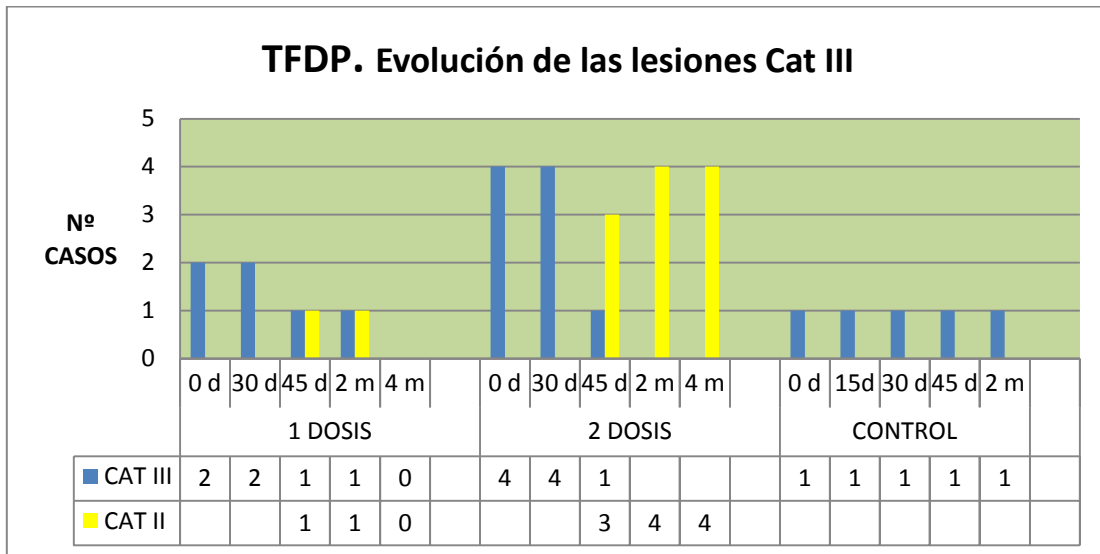


Fig. 7,8 y 9

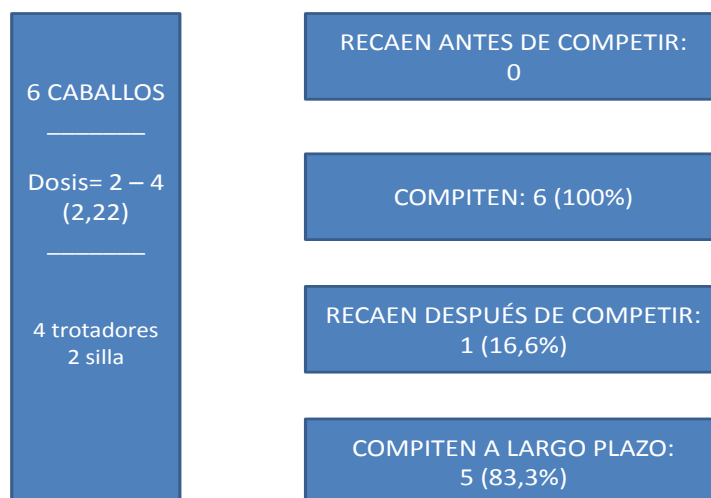


4. No pudo realizarse el análisis estadístico aplicado sobre las muestras de casos tratados 2 ó más dosis para revelar la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica" en la evolución de las lesiones y en las recaídas porque todos los casos pertenecían a la categoría "aguda". El factor "recuento plaquetario" no resultó significativo (ANOVA, p= 0,418) en la evolución de las lesiones.

La mayoría de los caballos volvieron a los entrenamientos a los 3 ½ - 5 ½ meses del inicio del tratamiento. No siempre se pudieron controlar las pautas de entrenamiento e incrementos de carga de trabajo. Los caballos de carreras trotadores suelen competir un promedio de dos veces por mes.

Concluido un periodo de seguimiento (1- 3 ½ años) sobre la muestra de 6 caballos que recibieron 2 ó más dosis de PRP, se obtuvieron los siguientes resultados considerando todas las especialidades deportivas en conjunto: ningún caballo recayó antes de volver a la competición, 6 casos (100%) volvieron a la competición y de estos, 1 caballo trotador (16,6%) recayó poco después de volver a competir y los restantes 5 caballos (83,3%) han competido durante un periodo de tiempo largo. (Fig. 10).

Fig. 10 TFDP .RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE 6 CABALLOS (2004-2008)



No se ha observado ninguna relación entre el resultado deportivo y el intervalo de número de dosis 2 a 3.

La disminución del calor y la sensibilidad al tacto fue especialmente significativa después de la primera dosis.

Se administraron 18 dosis de PRP distribuidas entre 10 TFDP (4 TFDP recibieron 1 dosis y 6 recibieron 14 dosis, con una media de 2,2 dosis/tendón), no observándose reacción adversa alguna.

DISCUSIÓN

Los casos control no confluyeron hacia categorías más favorables a lo largo del periodo de control de 2 meses. Se sabe que el periodo de curación natural del tendón puede durar 14-18 meses^{1,13-17} Algunos autores se refieren al síndrome compartimental para explicar la lenta resolución de las lesiones anecoicas¹⁸.

Los pacientes que recibieron 1 dosis de PRP evolucionaron hacia categorías lesionales más benignas al cabo de los 2 meses. Sin embargo la progresión fue mucho más lenta que la del grupo que recibió 2 ó más dosis.

Los exámenes ecográficos de los pacientes tratados con 2 ó más dosis pusieron de manifiesto un evolución positiva de todas las categorías lesionales hasta confluir en la Cat. II el 83,3% a los 2 meses y el 100% a los 4 meses de haber iniciado el tratamiento. Creemos que estos resultados encuentran una explicación cuando se analiza el número de dosis administradas. Se ha mencionado la relación dosis-dependiente entre algunos FC y la síntesis de algunos componentes del tendón (ver introducción general). Por lo que sabemos a través de los estudios in vitro sobre explantes de tendones, durante algunas semanas o meses, algunos FC se expresan cuantitativamente más que en el tendón sano (IGF-I, TGF- β). Se opina que la expresión de algunos de estos factores (IGF-I, TGF- β) depende, en cierta medida, del PDGF. Algunos estudios in vitro indican que la expresión de PDGF-A y PDGF-B, durante las primeras semanas o meses, está cuantitativamente por debajo de los niveles del tendón sano. Por todo ello, parece lógico que el tratamiento de las lesiones de tendones y ligamentos requiera de múltiples dosis.

Comparativamente, las lesiones correspondientes a las categorías más graves (V, IV) evolucionaron más rápidamente que las de Cat. III, ya que confluyeron en la Cat. II en el mismo periodo de tiempo. Nuestra hipótesis es que en estas últimas lesiones más graves es más fácil infiltrar cualquier líquido y que, por tanto, recibieron dosis más altas y efectivamente intralesionales de PRP. Inversamente, las dificultades que entraña la inyección intralesional en el caso de lesiones Cat. III y el menor volumen o dosis depositado en el interior del tendón, podrían explicar el mayor tiempo, comparativamente, que se necesita para que confluyan en la Cat. II.

No se ha podido hacer una valoración de la repercusión del estado lesión "aguda vs crónica" sobre la evolución de las lesiones ni sobre las recaídas debido a las características de la distribución de la muestra de casos tratados.

El factor "recuento plaquetario" no ha tenido influencia en la evolución de las lesiones ni en las recaídas, por lo que suponemos que con la técnica utilizada para la obtención del PRP se asegura un suministro "mínimo" de FC.

Los resultados obtenidos con el tratamiento con PRP son más favorables que los tratamientos reparadores convencionales: 100% vs 40-50% de casos que vuelven a competir,

respectivamente; y el 16,6% vs el 43-93% de recaídas después de competir, respectivamente¹⁹⁻²².

Se ha citado en muchas ocasiones la relación entre las categorías ecográficas lesionales y el pronóstico. En el presente estudio, los caballos de carreras trotadores presentaban lesiones más benignas (Cat. III, IV) y únicamente un caballo de recreo presentaba una lesión más grave (Cat. V). Con esta distribución de la muestra la única recaída se observó en el grupo de caballos de carreras al trote y después de haber competido un breve periodo de tiempo. La lesión estaba clasificada en la Cat. III. En este grupo se acumulan más factores de riesgo^{1,8}, como la velocidad, la repetición del stress y el balance forzado del casco para conseguir la marcha del trote.

En los hipódromos locales los caballos trotadores compiten un promedio de dos veces al mes durante casi todo el año. A lo largo de estos años, en que se ha realizado este estudio, no siempre ha sido posible controlar los protocolos de reincorporación progresiva al trabajo. Aún así, el porcentaje de recaídas, como se ha citado antes, es más favorable. Tal vez cabe comentar que los entrenadores contemplan los nuevos tratamientos más como un recurso para abreviar los periodos de descanso que como un método para reducir las recaídas.

Tras haber suministrado un total de 18 dosis de PRP en TFDP, se confirma la significativa disminución del dolor tras la primera dosis de PRP y la buena tolerancia al PRP autólogo y ausencia de complicaciones, observados en otros estudios piloto²⁴.

CONCLUSIONES

Según se deduce del análisis estadístico, parece aconsejable administrar, al menos, 2 dosis de PRP, en función de la información aportada por la evaluación ecográfica.

Se debe ser prudente al valorar las imágenes ecográficas y conviene recordar las limitaciones de la ecografía en el momento de dar de alta el paciente.

Es importante que la administración sea intralesional.

No se ha podido averiguar la influencia de status "agudo vs crónico" en el resultado final. Creemos prudente, tal como se ha explicado en la introducción, no administrar el PRP dentro de los 10-15 días siguientes a la lesión.

El PRP se puede utilizar de forma segura en caballos y representa una alternativa novedosa y valiosa para el tratamiento de lesiones TFDP, ya que puede proporcionar factores de crecimiento que aceleran la curación, mejoran los porcentajes de curación y disminuyen las recaídas en comparación con los tratamientos convencionales de la medicina reparativa.

El coste económico del tratamiento con PRP obtenido por el método de tubo y doble centrifugación es comparable al de los tratamientos habituales convencionales.

Las estrictas condiciones de asepsia que requiere el método de tubo utilizado para la obtención de PRP no lo hacen recomendable para uso domiciliario.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Smith RKW, Goodship AE. Tendon and ligament physiology. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, (eds): *Equine Sports Medicine and Surgery*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2004.
2. Williams RB, Hammond CJ, Wood JLN. Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996,1997 and 1998. *Equine Vet J* 2001;33:478-486.
3. Perkins NR, Reis SWJ, Morris RS. Profiling the New Zealand Thoroughbred racing industry.2. Conditions interfering with training and racing. *N Z Vet J* 2005. 53:69-76.
4. Lam Kh, Parkin TDH, Riggs CM et al. Descriptive analysis of retirement of Thoroughbred racehorses due to tendón injuries at the Hong Kong Jockey Club (1992-2004). *Equine Vet J* 2007;39:143-148.).
5. Dyson SJ. The deep digital flexor tendón. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 644-650.
6. Wilderjans H, Boussauw B. Deep digital flexor tendon lesions in the fetlock region: a retrospective study of 108 tenoscopies of digital flexor tendon sheaths suspected of deep digital flexor tendon laceration. In: *Management of lameness causes in sport horses*. Conference on Equine Sports Medicine and Science 2006. Cambridge. England.
7. Becker CK, Sabelberg HH, Barneveld A. In vitro mechanical properties of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon in horses in relation with age. *Equine Vet J* 1994;26:454-459.
8. Riemersma DJ, van der Bogert AJ, Jansen MO, et al. : Influence of shoeing on ground reaction forces and tendón strains in the forelimb of ponies. *Equine Vet J* 1996; 28:126-132 .
9. Dyson SJ. Desmitis of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon: 27 cases (1986-1990). *Equine Vet J* 1991;23:438-444.
10. American Association of Equine Practitioners (AAEP). *Guide for Veterinary Service and Judging of equestrian Events: Definition and Classification of Lameness*. Lexington: AAEP.1991, p19.
11. Rantanen NW, Jorgensen JS, Genovese RL. Ultrasonographic Evaluation of the Equine Limb: Technique. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003.

12. Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M. Evaluation of Single and Double Tube Methods for Concentrating Equine Platelets. *Res Vet Science* 81 (2006)237-245.
13. Smith RKW, Goodship AE. Tendon and ligament physiology. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, (eds): *Equine Sports Medicine and Surgery*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2004.
14. Wilson JH, Robinson LA, Jensen RC, McArdeel CJ. Equine Soft Tissue Injuries Associated with Racing: Descriptive Statistics from American Racetracks. *Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996.*
15. Genovese R, Reef VB, Longo KL, Byrd JW, Davis WM. Superficial Digital Flexor Tendonitis: Long Term sonographic and Clinical Study of racehorses. *Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996.*
16. Jorgensen JS, Genovese RL. Superficial Digital Flexor tendonitis. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 628-635.
17. Davis CS, Smith RKW, *Diagnosis and Management of Tendon and Ligament Disorders*. In: Auer JA, Stick JA, *Equine Surgery.3rd* Saunders Elsevier, 2006.
18. Smith JJ, Ross MW, Smith RK. Anabolic Effects of Acellular Bone Marrow, Platelet Rich Plasma, and Serum on Equine Suspensory Ligament Fibroblasts in Vitro. *Vet. Comp Orthop Traumatol.* 2006;19(1):43-7.
19. Kold SE. Correlation Between Physical Examination Findings, Ultrasound and Pathology. In *Proceedings BEVA 2005.*
20. Smith RKW. Pathophysiology of Tendon Injury. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 616-628.
21. Clegg P. Tendon Injury and Repair at a Cellular Level. *Proceedings BEVA Congress 2005.*
22. Goodship A. The Pathophysiology of the tendon and ligament injuries and the role of the stem cells in their treatment. *Proceedings EspoM Aachen 2006.*
23. Nixon A. Injectable Treatment Options for Tendinitis: Choosing Between Growth Factors, Bone Marrow Aspirate, Platelet Enriched Plasma or Cultured Stem Cell. In *Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten. Essen. Deutschland. 2007.*
24. Argüelles D, Carmona JU, Climent F. Platelet Rich Plasma as a Treatment of Tendon and Ligament Injuries in the Horse. In *Proceedings 14th ECVS Annual Meeting. Lyon. France. 2005.*

1.2.3 LIGAMENTO ACCESORIO DEL TFDP (LATFDP)

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

En este estudio se incluyeron 7 caballos de diferentes sexos, edades, razas y aptitudes (1 salto, 4 doma, 2 silla). Se trataron un total de 7 extremidades. Del total de la muestra, 6 casos presentaban lesiones agudas y 1 crónica. Se realizó un completo examen de la cojera incluyendo una determinación del grado de la misma, bloqueos anestésicos perineurales e intraarticulares para localizar las lesiones, radiografías y ecografías.

Después de realizar los respectivos exámenes ultrasonográficos, la muestra de 7 caballos

pacientes con lesiones LATFDP presentaba la siguiente distribución: ningún paciente de la Categoría III; 2 pacientes Cat. IV, de los cuales 1 recibió 1 dosis de PRP y 1 recibió 2 dosis; 4 pacientes Cat. V, de los cuales 3 recibieron 1 dosis de PRP y 1 recibió 2 dosis; 1 paciente Cat. VI, que recibió 2 dosis. (Tabla 1)

Por tanto, 5 caballos recibieron 1 dosis de PRP y 2 caballos recibieron 2 dosis.

Los pacientes se volvieron a evaluar antes de cada tratamiento y a los 45 días, 2 meses y 4 meses del inicio del tratamiento.

Tabla 1 CATEGORÍA	Nº caballos 1 dosis	Nº caballos 2 - 4 dosis
III Aguda	0	0 (d=0)
III Crónica	0	0 (d=0)
IV Aguda	1	1 (d=2)
IV Crónica	0	0 (d=0)
V Aguda	2	1 (d=2)
V Crónica	1	0 (d=0)
VI Aguda	1	0 (d=0)
VI Crónica	0	0 (d=0)
TOTAL	5	2 (d=2)

El seguimiento continuó durante un periodo mínimo de un año y hasta tres años y medio.

GRUPO CONTROL

Se aplicó la misma metodología de examen de cojera sobre un grupo de 3 caballos de diferentes sexos, edades, razas y aptitudes (2 doma, 1 silla) que por diversos motivos no se sometieron a ningún tratamiento, lo que representa un total de 3 extremidades. Del total de la muestra, 1 caballo presentaba una lesión aguda y otros 2, crónicas. Después de practicar los correspondientes exámenes ecográficos, la muestra del grupo control de 3 caballos con lesiones LATFDP presentaba la siguiente distribución: ningún paciente Cat. III, 1 paciente Cat. IV, 2 pacientes Cat. V, ningún paciente Cat. VI.

EVALUACIÓN DE LA COJERA

Las cojeras se clasificaron de 0 a 5, siguiendo los criterios AAEP¹. Donde 0= normal y 5= el caballo no es capaz de soportar peso sobre la extremidad.

Los resultados de los test de flexión durante un minuto se clasificaron en una escala de 0 a 3, donde 0= resultado negativo, 1= ligero incremento de la cojera, 2= moderado incremento de la cojera y 3= severo incremento de la cojera.

Se evaluó el calor local, sensibilidad la palpación y aspecto del tendón.

EVALUACIÓN ECOGRÁFICA

Las lesiones ecográficas se clasificaron según las seis categorías (I-VI) descritas en una modificación de la clasificación original de Rantanen et al² para las lesiones de tendones y ligamentos. Los parámetros ultrasónicos utilizados incluyen: el área de la sección transversal, el área de la máxima lesión, porcentaje de la zona de máxima lesión respecto a la porción sana en la sección transversal, patrón ecogénico de la lesión y orientación de las fibras en corte longitudinal (Tabla 2).

Tabla 2

EVALUACIÓN ECOGRÁFICA DE LAS LESIONES (ESCALA RANTANEN et al. I – VI)

	Isoecoico	Incremento Grosor	Hipoecoico	Anecoico	3 Zonas	5 Zonas	6-7 Zonas	11 Zonas
Cat. I	SI	<25-39%						
Cat. II	SI	>39%						
Cat. III			SI	NO				
Cat. IV				SI	1-25%	1-20%	1-15%	1-10%
Cat. V				SI	26-35%	21-30%	16-25%	11-20%
Cat. VI				SI	>35%	>30%	>25%	>20%

SEGUIMIENTO CLÍNICO

El estudio se inició en diciembre de 2004 y se finalizó en octubre de 2008.

De la muestra de 5 caballos que sólo recibieron 1 dosis de PRP, se registraron los datos correspondientes a la evaluación clínica y ecográfica de la cojera durante los dos primeros meses; a partir de este periodo, no se pudieron obtener datos suficientes sobre su evaluación ecográfica, carrera deportiva y las recaídas de un número significativo de caballos, por lo que esta muestra sólo se analiza estadísticamente con los datos obtenidos durante los 2 primeros meses.

De la muestra de 2 caballos que recibieron 2 dosis de PRP, se registraron los datos correspondientes a la evaluación clínica y ecográfica y a sus carreras deportivas, prestando especial atención al rendimiento atlético y a las recaídas acontecidas antes y después de volver a la competición. El seguimiento oscila entre un mínimo de un año y hasta tres años y medio desde la fecha de inicio del tratamiento.

PREPARACIÓN DEL PRP

El PRP se preparó según el método de tubo y doble centrifugación³, obteniendo 100 ml de sangre de forma aséptica de la vena yugular mediante una palomilla 16G (Braun) y depositándola en tubos al vacío, estériles, de 5 ml., conteniendo citrato sódico al 3,2 %. A continuación los tubos se centrifugan a 120g durante 5 minutos. En condiciones asépticas, se aspira el 50% de la columna de plasma que está adyacente a la capa leucocitaria. El plasma obtenido se vuelve a centrifugar a 240g durante 5 minutos y se recupera el 25% de la columna de plasma adyacente al sedimento y éste mismo. Esta última fracción, contenida en jeringas estériles, se activa con cloruro cálcico (4.5mEq/5ml) adicionando 50µl / 1 ml PRP.

ESQUEMA DE TRATAMIENTO CON PRP

La zona afectada de la extremidad se preparó de forma aséptica para las inyecciones. Los caballos se sedaron con detomidina (Domosedan[®], Pfizer) – butorphanol (Torbugesic[®], Fort Dodge Laboratories Inc.). El PRP se inyectó intralesionalmente entre 1 y 4 veces en intervalos de 10-15 días, según la evolución de la escala ecográfica. Durante las semanas que duró el tratamiento los caballos se mantuvieron en reposo o dando paseos a la mano. No se administró ningún otro tratamiento sistémico o tópico. Se realizó un recuento plaquetario de todas las muestras de sangre.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1. En primer lugar, sobre la muestra total, se aplicó el test T para muestras cuantitativas independientes para averiguar si la distribución de la muestra de los casos control era representativa o comparable con las muestras de los casos tratados con 1 dosis de PRP y 2 dosis.

2. En segundo lugar, sobre la muestra de casos control, que no recibieron dosis de PRP, se aplicó el test Wilcoxon para muestras cuantitativas dependientes a efectos de comparar la evolución de las categorías ecográficas lesionales (IV-V) en el momento del inicio del control y a los 2 meses. También se aplicó el test ANOVA para determinar la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica" en el resultado a los 2 meses de haberse iniciado el control.
3. En tercer lugar, sobre las muestras de casos tratados con 1 dosis y 2 dosis, se aplicó el test Paired-T (2-tailed) y test Wilcoxon para muestras cuantitativas dependientes a efectos de comparar la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-VI) en el momento del inicio, a los 2 meses y a los 4 meses del tratamiento.
4. En cuarto lugar, sobre las muestras de casos tratados con 2 dosis, se aplicó el test ANOVA a efectos de valorar la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica" y "recuento plaquetario" en la evolución de las lesiones a los 2 y 4 meses de haber iniciado el tratamiento.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante software SPSS ver.14. Se estableció un intervalo de confianza de 95% y se consideraron valores de $P < 0,05$ como significativos.

RESULTADOS

1. El análisis estadístico resultante de la comparación de las muestras independientes, pacientes y grupo control, mediante el test T mostró unas diferencias no significativas al comparar la muestra control con la muestra que recibió 1 dosis ($p < 0,742$; 2-tailed) y la muestra control con la muestra que recibió 2 dosis ($p < 0,667$; 2-tailed), por lo que se consideró que la muestra de casos control era representativa de la muestra de casos tratados con 1 dosis y 2 ó más dosis (Fig. 1).
2. El análisis estadístico de la muestra control revela que no se observan diferencias significativas en la evolución de las categorías ecográficas lesionales (IV-V) comparadas en el momento del inicio del control y a los 2 meses de haber iniciado el control (test Wilcoxon $p = 1,000$; 2-tailed). El test ANOVA para determinar la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica" en el resultado a los 2 meses de haber iniciado el control, revela que estos factores no influyen significativamente en dicha evolución (ANOVA factor "lesión aguda vs crónica", $p = 0,423$) (Fig. 2).

Fig. 1

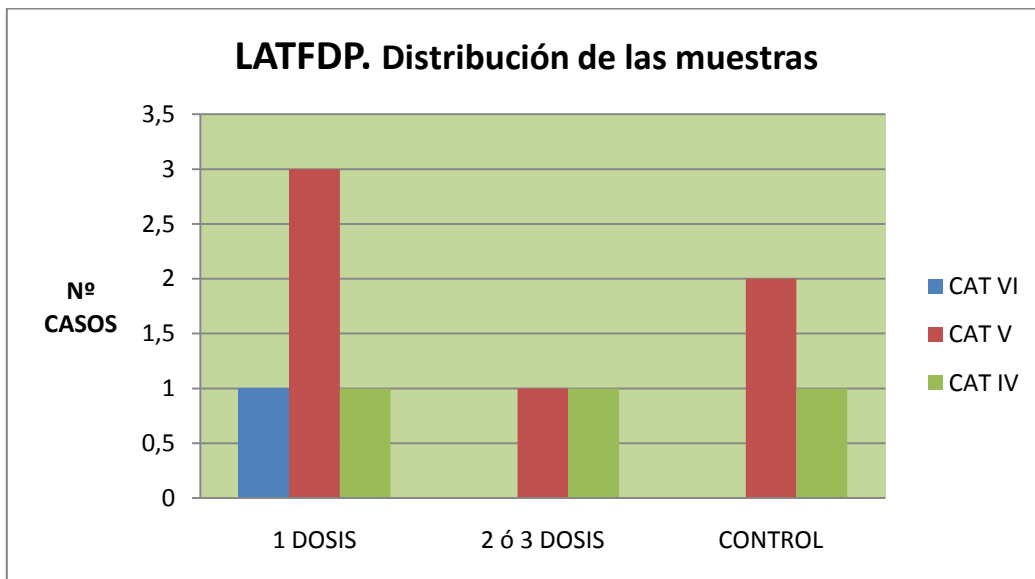
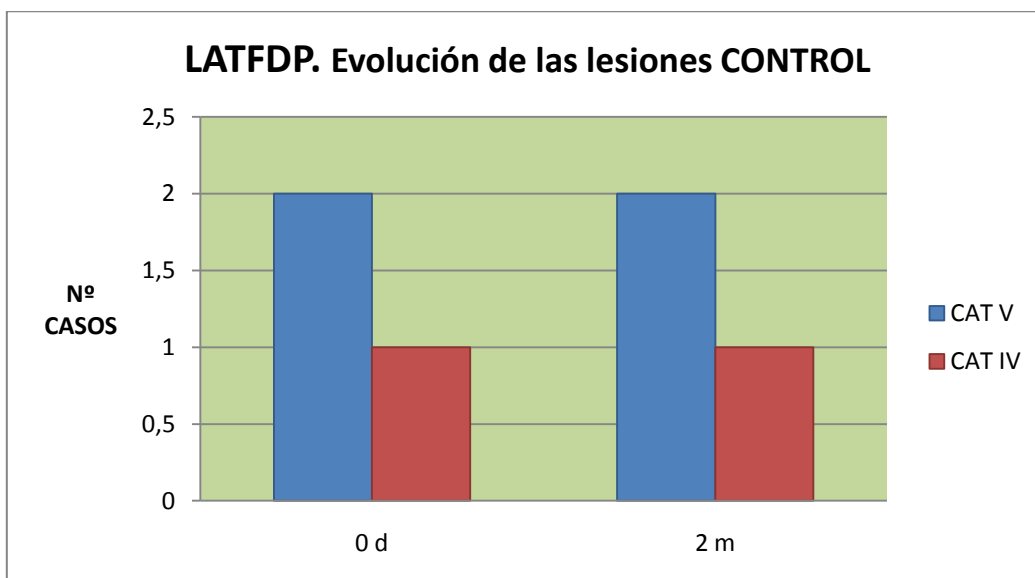


Fig. 2



3. El análisis estadístico aplicado sobre las muestras de casos tratados con 1 dosis revela diferencias no significativas en la evolución de las categorías ecográficas lesionales (IV-VI) comparadas en el momento del inicio del tratamiento y a los 2 meses de haber iniciado el tratamiento (Paired-T test $p < 0,178$; 2-tailed y test Wilcoxon $p < 0,157$; 2-tailed). Sin embargo, la muestra que fue tratada con 2 dosis, experimentó una evolución significativa a los 2 meses (Paired T test $p = 0,038$; 2 -tailed) y a los 4 meses (Paired T test $p = 0,015$; 2 -tailed) (Figs. 3 y 4).

Los exámenes ecográficos de los pacientes tratados con 1 dosis pusieron de manifiesto que el 50% de los casos había progresado hasta la Cat. III a los 2 meses, mientras que el 100% de aquellos que recibieron 2 dosis confluyeron en la Cat. III a los 2 meses y en la Cat. II a los 4 meses de haberse iniciado el tratamiento (Figs. 3 y 4).

Fig. 3

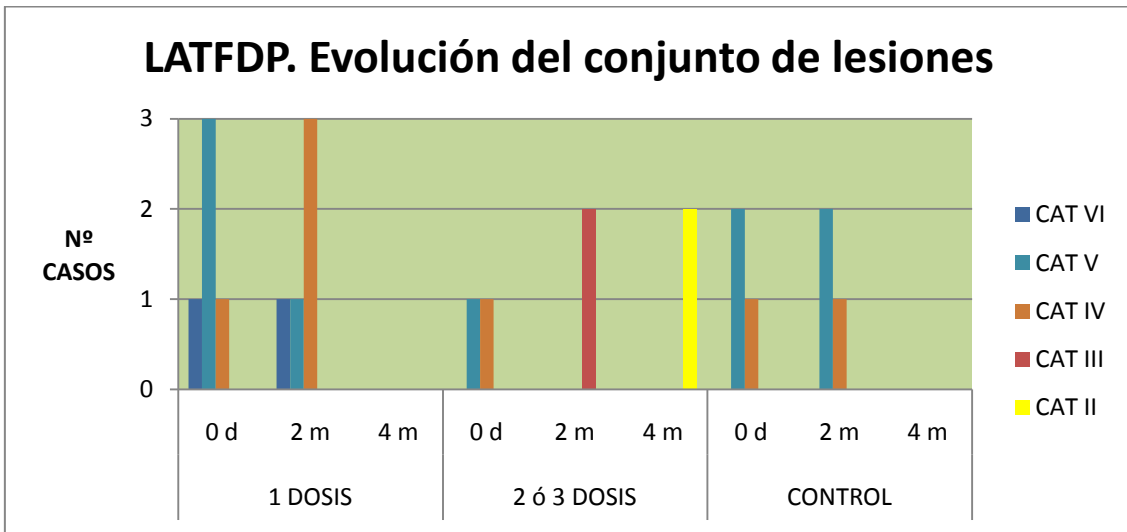
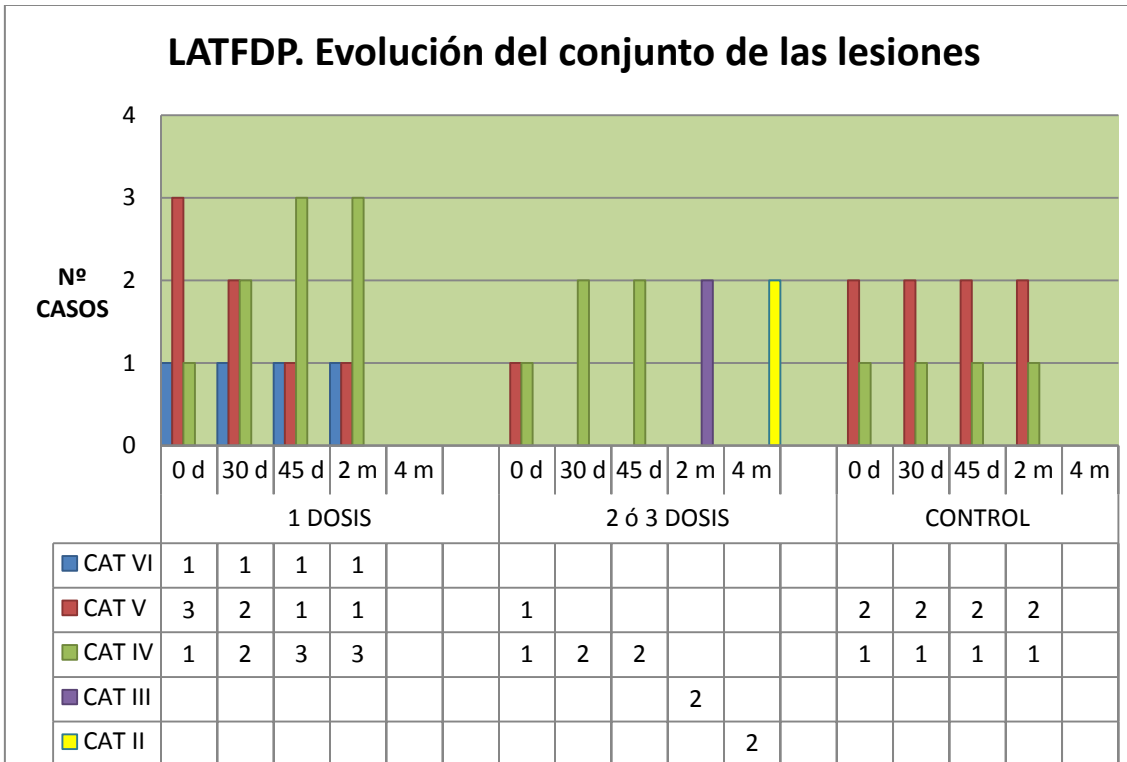


Fig. 4



4. El análisis estadístico no revela ninguna diferencia significativa al analizar la influencia del factor "aguda vs crónica" en la evolución de las lesiones tratadas con 1 dosis (ANOVA factor "agudas vs crónicas" $p = 0,564$). No pudo realizarse el análisis estadístico aplicado sobre las muestras de casos tratados con 2 dosis para revelar la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica" en la evolución de las lesiones y en las recaídas porque todos los casos pertenecían a la categoría "aguda". El factor "recuento plaquetario" no tiene influencia en la evolución de las lesiones a los 2 y 4 meses (ANOVA, $p = 0,765$ a los 2 meses y $p = 0,688$ a los 4 meses).

Los caballos se mantuvieron en reposo durante 4 ½ a 5 meses. No siempre se pudieron controlar las pautas de trabajo. Concluido un periodo de seguimiento (2 ½ a 3 años) sobre la muestra de 2 caballos (1 doma, 1 silla) que recibieron 2 dosis de PRP, no se han observado recaídas.

La disminución del calor y la sensibilidad al tacto fue especialmente significativa después de la primera dosis.

Se administraron 9 dosis de PRP distribuidas entre 7 LATFDP, no observándose reacción adversa alguna.

DISCUSIÓN

Los casos control no confluyeron hacia categorías más favorables a lo largo del periodo de control de 2 meses. Se sabe que el periodo de curación natural del tendón puede durar 14-18 meses⁴⁻⁹. Algunos autores se refieren al síndrome compartimental para explicar la lenta resolución de las lesiones anecoicas¹⁰.

Los pacientes que recibieron 1 dosis de PRP evolucionaron hacia categorías lesionales más benignas al cabo de los 2 meses. Sin embargo la progresión fue mucho más lenta que la del grupo que recibió 2 dosis.

Los exámenes ecográficos de los pacientes tratados con 2 dosis pusieron de manifiesto una evolución positiva de todas las categorías lesionales hasta confluir en la Cat. II a los 4 meses de haber iniciado el tratamiento. Creemos que estos resultados encuentran una explicación cuando se analiza el número de dosis administradas.

Los resultados estadísticos obtenidos no muestran diferencias significativas en la evolución de las lesiones dependiendo de la situación "aguda" o "crónica" tanto en la muestra de casos control como en la muestra de casos que recibieron 1 dosis. Nuestra hipótesis explicativa se basa en que el límite entre estas dos situaciones no está claro y, tal vez, deba replantearse. Es bien sabido que las fases clásicas descritas en la fisiopatología de la curación del tendón (aguda, subaguda y crónica), se solapan. Tras la lesión, la expresión génica para la síntesis de colágeno tipo I y III se mantiene elevada durante 24 semanas²³. Además, a nivel bioquímico, la actividad anabólica y catabólica coexisten (MMPs y TIMMPs). En todo caso, parece que los factores de crecimiento tienen capacidad para activar las secuencias de cascadas bioquímicas que ponen en marcha los procesos de curación con independencia de la fase en la que se encuentre la lesión. Tal vez el término "tendinosis" recoja mejor esta situación.

Resulta muy pequeño el número de caballos que se han controlado a largo plazo, pero los dos caballos regresaron a su nivel de trabajo previo y no se observaron recaídas durante un periodo de tiempo largo. Por tanto, los resultados obtenidos con el tratamiento con PRP podrían ser más favorables que los tratamientos reparadores convencionales (44% de casos

que vuelven a competir, 16,6 % recaen después de competir y el 37% compiten durante un periodo largo)²⁴.

El factor "recuento plaquetario" no ha tenido influencia en la evolución de las lesiones ni en las recaídas, por lo que suponemos que con la técnica utilizada para la obtención del PRP se asegura un suministro "mínimo" de FC.

Tras haber suministrado un total de 9 dosis de PRP en LATFDP, se confirma la significativa disminución del dolor tras la primera dosis de PRP y la buena tolerancia al PRP autólogo y ausencia de complicaciones, observados en otros estudios piloto^{21,22}.

CONCLUSIONES

Parece aconsejable administrar, al menos, 2 dosis de PRP, en función de la información aportada por la evaluación ecográfica.

Es importante que la administración sea intralesional.

No parece relevante que el LATFDP se encuentre en una fase aguda o crónica, con la única precaución de no administrar el PRP dentro de los 10-15 días siguientes a la lesión.

El PRP se puede utilizar de forma segura en caballos y representa una alternativa novedosa y valiosa para el tratamiento de lesiones LATFDP, ya que puede proporcionar factores de crecimiento que aceleran la curación, mejoran los porcentajes de curación y disminuyen las recaídas en comparación con los tratamientos convencionales de la medicina reparativa.

El coste económico del tratamiento con PRP obtenido por el método de tubo y doble centrifugación es comparable al de los tratamientos habituales convencionales.

Las estrictas condiciones de asepsia que requiere el método de tubo utilizado para la obtención de PRP no lo hacen recomendable para uso domiciliario.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. American Association of Equine Practitioners (AAEP). Guide for Veterinary Service and Judging of equestrian Events: Definition and Classification of Lameness. Lexington: AAEP. 1991, p19.
2. Rantanen NW, Jorgensen JS, Genovese RL. Ultrasonographic Evaluation of the Equine Limb: Technique. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003.
3. Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M. Evaluation of Single and Double Tube Methods for Concentrating Equine Platelets. *Res Vet Science* 81 (2006)237-245.
4. Smith RKW, Goodship AE. Tendon and ligament physiology. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, (eds): *Equine Sports Medicine and Surgery*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2004.
5. Wilson JH, Robinson LA, Jensen RC, McArdelel CJ. Equine Soft Tissue Injuries Associated with Racing: Descriptive Statistics from American Racetracks. Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996.
6. Genovese R, Reef VB, Longo KL, Byrd JW, Davis WM. Superficial Digital Flexor Tendonitis: Long Term sonographic and Clinical Study of racehorses. Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996.
7. Jorgensen JS, Genovese RL. Superficial Digital Flexor tendonitis. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 628-635.
8. Davis CS, Smith RKW, *Diagnosis and Management of Tendon and Ligament Disorders*. In: Auer JA, Stick JA, *Equine Surgery*. 3rd Saunders Elsevier, 2006.
9. Smith JJ, Ross MW, Smith RK. Anabolic Effects of Acellular Bone Marrow, Platelet Rich Plasma, and Serum on Equine Suspensory Ligament Fibroblasts in Vitro. *Vet. Comp Orthop Traumatol*. 2006;19(1):43-7.
10. Kold SE. Correlation Between Physical Examination Findings, Ultrasound and Pathology. In Proceedings BEVA 2005.
11. Smith RKW. Pathophysiology of Tendon Injury. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 616-628.
12. Clegg P. Tendon Injury and Repair at a Cellular Level. Proceedings BEVA Congress 2005.

13. Goodship A. The Pathophysiology of the tendon and ligament injuries and the role of the stem cells in their treatment. Proceedings EspoM Aachen 2006.
14. Nixon A. Injectable Treatment Options for Tendinitis: Choosing Between Growth Factors, Bone Marrow Aspirate, Platelet Enriched Plasma or Cultured Stem Cell. In Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten. Essen. Deutschland. 2007.
15. Wilson JH, Robinson LA, Jensen RC, McArdel CJ. Equine Soft Tissue Injuries Associated with Racing: Descriptive Statistics from American Racetracks. Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996.
16. Genovese R, Reef VB, Longo KL, Byrd JW, Davis WM. Superficial Digital Flexor Tendonitis: Long Term sonographic and Clinical Study of racehorses. Proceedings of the First International Dubai International Equine Symposium, Dubai, Arab Emirates, 1996.
17. Jorgensen JS, Genovese RL. Superficial Digital Flexor tendonitis. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 628-635.
18. Dyson SJ, Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J*. 2004;36;415-9.
19. Marr CM, Love S, McKellar Q. Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses. *Vet. Rec.*1993;132;476-479.
20. Strömberg B, Tufvesson G. Lesions of the supercial flexor tendons in racehorses: a microangiographic and histopathologic study. *Clin Orthop* 1969;62:113.
21. Carmona JU, Argüelles D, Climent F. Report of the intraarticular treatment with platelet rich plasma in 7 horses with joint disease. In Proceedings 14th ECVS Annual Meeting. Lyon. France, 2005.
22. Argüelles D, Carmona JU, Climent F. Platelet Rich Plasma as a Treatment of Tendon and Ligament Injuries in the Horse. In Proceedings 14th ECVS Annual Meeting. Lyon. France, 2005.
23. Dahlgren LA, Mohamed HO, Nixon AJ. Temporal expression of Growth Factors and Matrix Molecules in Healing Tendon Lesions. *J Orthop Res* 2005 Jan;23(1):84-92.
24. Dyson SJ. Desmitis of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon: 27 cases (1986-1990). *Equine Vet J* 1991;23:438-444.

1.2.4 LIGAMENTO SUSPENSOR (LS):

PARTE PROXIMAL (PPLS)

CUERPO (CLS)

RAMAS (RLS)

INTRODUCCIÓN

El ligamento suspensor es el principal sustentador de las articulaciones metacarpofalangiana (MCP) y metatarsofalangiana (MTP) e interviene limitando la extensión de dichas articulaciones. Tiene origen en la cara palmar/plantar del extremo proximal del metacarpo/metatarso, discurre distalmente como un único cuerpo hasta que se divide en dos ramas, medial y lateral, que se insertan en las superficies abaxiales de los respectivos huesos sesamoideos proximales. Este "aparato suspensor" continúa distalmente con los ligamentos sesamoideos distales. El LS se deriva del músculo interóseo y conserva algo de tejido muscular primitivo; la proporción de este tejido muscular es distinta según las características biomecánicas que impone la especialidad deportiva o según condicionantes genéticos. Los caballos *standardbreds* tienen un 40% más de tejido muscular que los *thoroughbreds* ¹.

Al realizar el diagnóstico ecográfico se deben tener presente que, debido al vestigio muscular, algunas imágenes no ponen de manifiesto lesiones patológicas sino la estructura normal del ligamento. La proporción de tejido muscular suele ser igual en la extremidad opuesta.

El LS se divide en tres partes en razón de sus particularidades anatómicas y de la naturaleza de las lesiones: proximal, cuerpo y ramas.

Las lesiones de la parte proximal se diagnostican ahora mucho más que en tiempos pasados debido al interés científico que se le ha prestado estos últimos años. Esta lesión se presenta en todo tipo de caballos de deporte. Es frecuente realizar diagnósticos de lesiones crónicas, de carácter recidivante. Aunque no siempre, esta lesión suele estar asociada a una conformación de las articulaciones MCP y MTP hiperextendida y a una conformación demasiado recta de los corvejones.

El pronóstico de las desmitis de la parte proximal del LS difieren enormemente según se trate de la extremidad anterior o posterior. En las extremidades anteriores, las lesiones agudas tienen un buen pronóstico ya que el 90% de los casos vuelve a la competición siguiendo un tratamiento conservador ²; las lesiones crónicas, con más de tres meses de duración, tienen un pronóstico más sombrío. En las extremidades posteriores, las lesiones agudas tienen un pronóstico mucho peor, ya que sólo el 13% de los casos mantiene el nivel de competición durante 6 meses ³; las lesiones crónicas tienen un pronóstico aún peor, cercano al 0% con los tratamientos tradicionales.

Las lesiones del cuerpo del LS son menos frecuentes y a veces van acompañadas de lesiones de las partes proximales de las ramas. Suelen observarse en forma aguda en caballos de carreras al galope o trote. EL pronóstico para este tipo de lesiones es reservado ^{4,5}.

Las lesiones de las ramas también son frecuentes en todo tipo de caballos. El balance del casco es un factor importante. El pronóstico es reservado⁷.

A diferencia de las lesiones tendinosas, en las que la curación conlleva una fibrosis intratendinosa, las lesiones de LS tienden a curar con el concurso de una fibrosis intra y periligamentosa. Este hecho tiene importancia al realizar el examen ultrasonográfico porque esta fibrosis periligamentosa tiende a interponerse entre el ligamento y la piel adyacente y constituye un signo indicativo de desmitis previa.

Las lesiones ecográficas del LS curan muy lentamente y pueden persistir durante muchos meses (más de 18 meses)⁷, especialmente las lesiones localizadas en la ramas.

Las lesiones del LS figuran entre las más frecuentes en todos los tipos de especialidades deportivas⁶, pero ocupa un lugar eminente entre los caballos de salto, doma y trotadores (*standardbreds*).

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

En este estudio se incluyeron 36 caballos de diferentes sexos, edades, razas y aptitudes (15 trotadores, 5 salto, 4 doma, 12 silla). Se trataron un total de 36 extremidades. Del total de la muestra, 11 casos presentaban lesiones en la parte proximal del LS (7 agudas y 4 crónicas), 6 presentaban lesiones en el cuerpo del LS (4 agudas y 2 crónicas) y 19 casos presentaban lesiones en las ramas (7 agudas y 12 crónicas). (Figs. 1-5) Se realizó un completo examen de la cojera incluyendo una determinación del grado de la misma, bloqueos anestésicos perineurales e intraarticulares para localizar las lesiones, radiografías y ecografías.

Después de realizar los respectivos exámenes ultrasonográficos, la muestra de 36 caballos pacientes con lesiones LS presentaba la siguiente distribución por categorías ecográficas lesionales y dosis administradas (Tabla 1).

Tabla 1

ZONA	MUESTRA	Nº DOSIS	CAT III	CAT IV	CAT V	TOTAL
PROXIMAL	TRATADOS	1		2	3	5
		2		2		2
		3	2	2		4
		4				
	CONTROL	0	2	3	4	9
CUERPO	TRATADOS	1		3	1	4
		2	1			1
		3			1	1
		4				
	CONTROL	0		1	1	2
RAMAS	TRATADOS	1		6	2	8
		2	2	1		3
		3		5	2	7
		4			1	1
	CONTROL	0		4	1	5
			7	29	16	52

Por tanto, 17 caballos recibieron 1 dosis de PRP y 19 caballos recibieron 2 ó más dosis. Los pacientes se volvieron a evaluar antes de cada tratamiento (cada 10-15 días, si recibieron varias dosis) y a los 45 días, 2 meses y 4 meses del inicio del tratamiento. El seguimiento continuó durante un periodo mínimo de un año y hasta tres años y medio.

GRUPO CONTROL

Se aplicó la misma metodología de examen de cojera sobre un grupo de 16 caballos de diferentes sexos, edades, razas y aptitudes (4 trotadores, 2 salto, 1 doma, 2 silla) que por diversos motivos no se sometieron a ningún tratamiento, lo que representa un total de 16 extremidades. El total de la muestra estaba constituido por 9 pacientes con lesiones en la parte proximal del LS (5 agudos y 4 crónicos), 2 pacientes con lesiones en el cuerpo del LS (1 aguda y 1 crónica) y 5 pacientes con lesiones crónicas en las ramas del LS. (Figs. 1-5)

Después de practicar los correspondientes exámenes ecográficos, la muestra del grupo control de 16 caballos con lesiones LS presentaba la siguiente distribución por categorías ecográficas lesionales (Tabla 1).

EVALUACIÓN DE LA COJERA

Las cojeras se clasificaron de 0 a 5, siguiendo los criterios AAEP.⁸ Donde 0= normal y 5= el caballo no es capaz de soportar peso sobre la extremidad.

Los resultados de los test de flexión durante un minuto se clasificaron en una escala de 0 a 3, donde 0= resultado negativo, 1= ligero incremento de la cojera, 2= moderado incremento de la cojera y 3= severo incremento de la cojera.

Se evaluó el calor local, la sensibilidad a la palpación y el aspecto del tendón.

EVALUACIÓN ECOGRÁFICA

Las lesiones ecográficas se clasificaron según las seis categorías (I-VI) descritas en una modificación de la clasificación original de Rantanen et al⁹ para las lesiones de tendones y ligamentos. Los parámetros ultrasónicos utilizados incluyen: el área de la sección transversal, el área de la máxima lesión, porcentaje de la zona de máxima lesión respecto a la porción sana en la sección transversal, patrón ecogénico de la lesión y orientación de las fibras en corte longitudinal (Tabla 2).

Después de realizar los tratamientos no se catalogó ningún resultado en la Cat. I debido al sutil límite entre las Cat. I y II. Ambas categorías se clasificaron como Cat. II, clínicamente equivalente a "tendones y ligamentos curados".

Tabla 2

EVALUACIÓN ECOGRÁFICA DE LAS LESIONES (ESCALA RANTANEN et al. I - VI)								
	Isoecoico	Incremento Grosor	Hipoecoico	Anecoico	3 Zonas	5 Zonas	6-7 Zonas	11 Zonas
Cat. I	SI	<25-39%						
Cat. II	SI	>39%						
Cat. III			SI	NO				
Cat. IV				SI	1-25%	1-20%	1-15%	1-10%
Cat. V				SI	26-35%	21-30%	16-25%	11-20%
Cat. VI				SI	>35%	>30%	>25%	>20%

SEGUIMIENTO CLÍNICO

El estudio se inició en diciembre de 2004 y se finalizó en octubre de 2008.

De la muestra de 28 caballos que sólo recibieron 1 dosis de PRP, se registraron los datos correspondientes a la evaluación clínica y ecográfica de la cojera durante los dos primeros meses; a partir de este periodo, no se pudieron obtener datos suficientes sobre su evaluación ecográfica, carrera deportiva y las recaídas de un número significativo de caballos, por lo que esta muestra sólo se analiza estadísticamente con los datos obtenidos durante los 2 primeros meses.

De la muestra de 44 caballos que recibieron 2 ó más dosis de PRP, se registraron los datos correspondientes a la evaluación clínica y ecográfica y a sus carreras deportivas, prestando especial atención al rendimiento atlético y a las recaídas acontecidas antes y después de volver a la competición. El seguimiento oscila entre un mínimo de un año y hasta tres años y medio desde la fecha de inicio del tratamiento.

PREPARACIÓN DEL PRP

El PRP se preparó según el método de tubo y doble centrifugación¹⁰, obteniendo 100 ml de sangre de forma aséptica de la vena yugular mediante una palomilla 16G (Braun) y depositándola en tubos al vacío, estériles, de 5 ml., conteniendo citrato sódico al 3,2 %. A continuación los tubos se centrifugan a 120g durante 5 minutos. En condiciones asépticas, se aspira el 50% de la columna de plasma que está adyacente a la capa leucocitaria. El plasma obtenido se vuelve a centrifugar a 240g durante 5 minutos y se recupera el 25% de la

columna de plasma adyacente al sedimento y éste mismo. Esta última fracción, contenida en jeringas estériles, se activa con cloruro cálcico (4.5mEq/5ml) adicionando 50µl / 1 ml PRP. Se realizó un recuento plaquetario de cada muestra de sangre obtenida.

ESQUEMA DE TRATAMIENTO CON PRP

La zona afectada de la extremidad se preparó de forma aséptica para las inyecciones. Los caballos se sedaron con detomidina (Domosedan[®], Pfizer) – butorphanol (Torbugesic[®], Fort Dodge Laboratories Inc.). El PRP se inyectó intralesionalmente entre 1 y 4 veces en intervalos de 10-15 días, según la evolución de la escala ecográfica. Durante las semanas que duró el tratamiento los caballos se mantuvieron en reposo o dando paseos a la mano. No se administró ningún otro tratamiento sistémico o tópico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, cada muestra total de PPLS, CLS y RLS, se analizó con el test T para muestras cuantitativas independientes para averiguar si la distribución de los casos “control” era representativa de los casos “tratados” con PRP.

En segundo lugar, sobre la muestra de casos control, que no recibieron dosis de PRP, se aplicó el test Paired-T (bidireccional) y el test Wilcoxon para muestras cuantitativas dependientes a efectos de comparar la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-V) en el momento del inicio del control y a los 2 meses. También se aplicó el test ANOVA para determinar la influencia del factor “lesión aguda vs crónica” en el resultado a los 2 meses de haberse iniciado el control.

En tercer lugar, sobre las muestras de casos tratados con 1 dosis y con 2 ó más dosis, se aplicó el test Paired-T (2-tailed) y test Wilcoxon para muestras cuantitativas dependientes a efectos de comparar la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-V) en el momento del inicio, a los 2 meses y a los 4 meses del tratamiento.

En cuarto lugar, sobre las muestras de casos tratados con 2 ó más dosis, se aplicó el test ANOVA a efectos de valorar la influencia de los factores “lesión aguda vs crónica” y “recuento plaquetario” en la evolución de las lesiones a los 2 y 4 meses de haber iniciado el tratamiento.

En quinto lugar, sobre las muestras de casos tratados con 2 ó más dosis, se aplicó el test ANOVA a efectos de valorar la influencia de los factores “lesión aguda vs crónica” en las recaídas.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante software SPSS ver.14. Se estableció un intervalo de confianza del 95% y se consideraron valores de $P < 0,05$ como significativos.

RESULTADOS

1. El análisis estadístico resultante de la comparación de las muestras independientes, grupo "controles" y "tratados", mediante el test T mostró unas diferencias no significativas (PPLS: $p=0,589$; CLS: $p=0,234$; RLS: $p=0,116$) por lo que se consideró que las muestras "control" eran representativas de las muestras de casos "tratados" con lesiones en PPLS, CLS y RLS. (Fig. 1-3)

Fig. 1

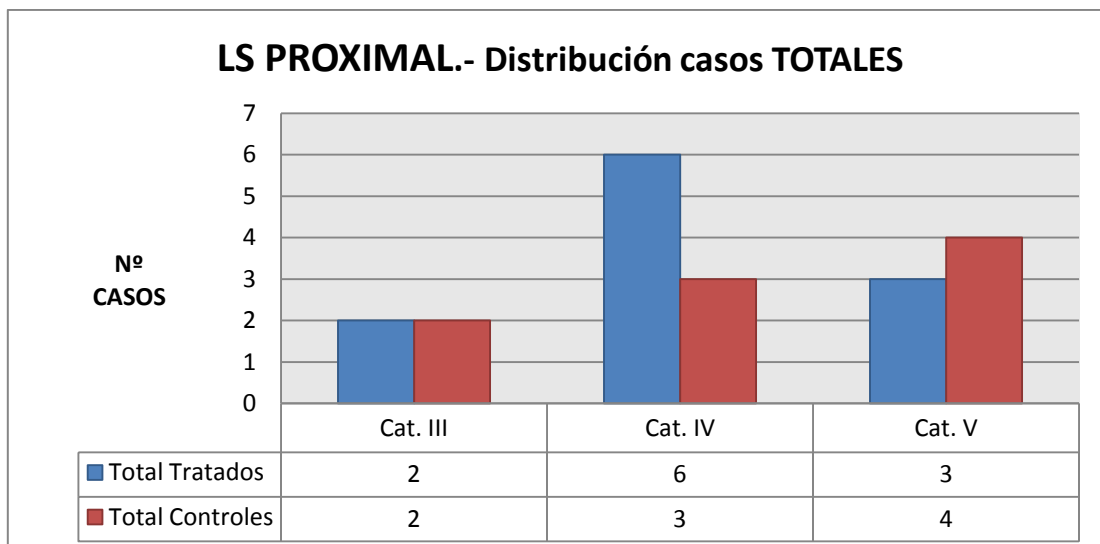


Fig. 2

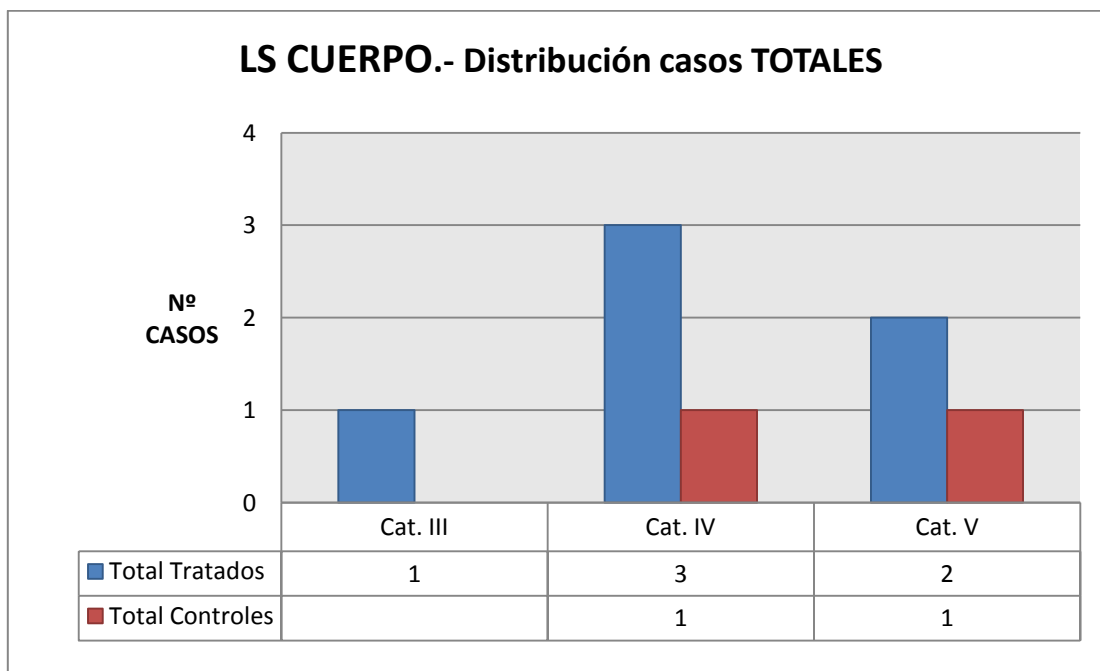
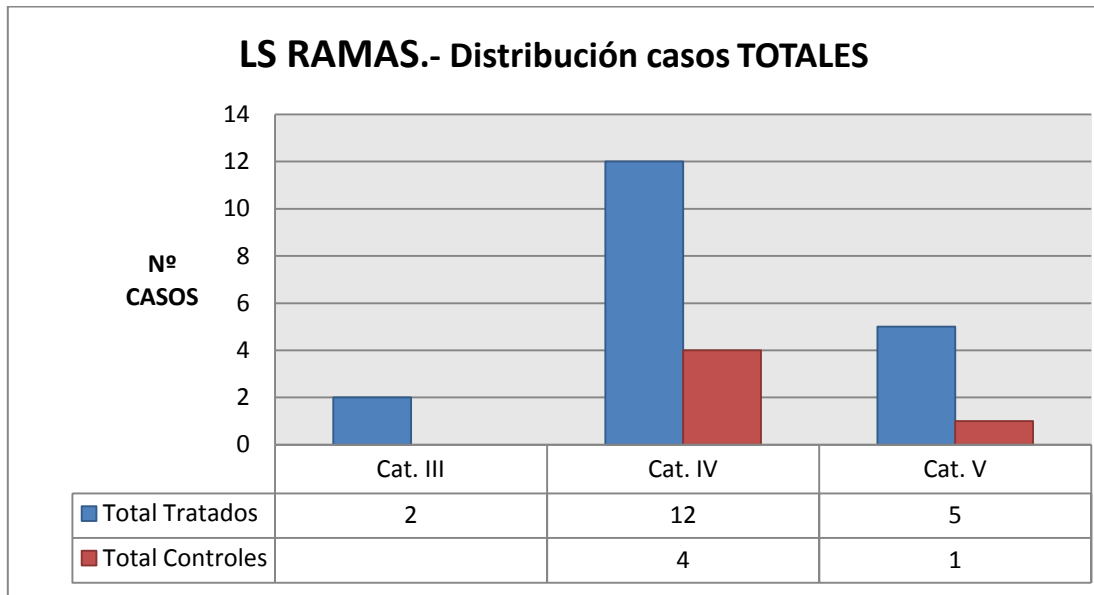
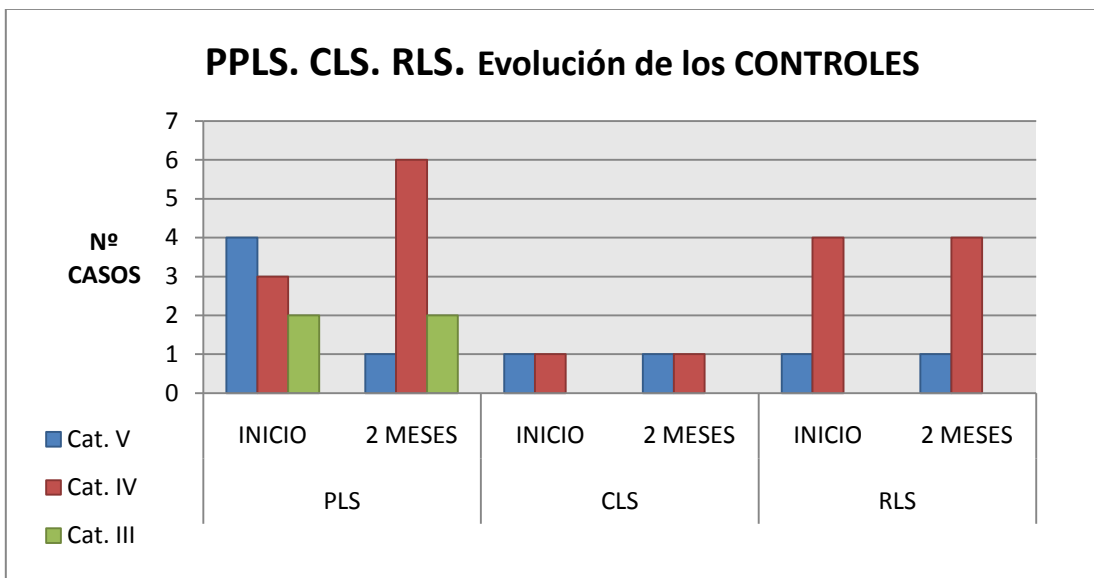


Fig. 3



2. El análisis estadístico de las muestras "control" con lesiones en PLS, CLS y RLS revela que no se observan diferencias significativas en la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-V) comparadas en el momento del inicio del control y a los 2 meses de haber iniciado el control (PLS: Paired T test $p= 0,083$ bidireccional; CLS: $p=1,000$ bidireccional; RLS: $p=1,000$ bidireccional) (Fig. 7). El test ANOVA para determinar la influencia del factor "lesión aguda vs crónica" en el resultado a los 2 meses de haber iniciado el control, revela que este factor no influye significativamente en la evolución de las lesiones en PLS y CLS (ANOVA factor "lesión aguda vs crónica", PLS: $p=0,571$; CLS: $p=0,500$). No se pudo valorar la influencia en las lesiones de RLS porque todos los controles pertenecían a la categoría "crónico" (Fig.4).

Fig. 4



3. El análisis estadístico aplicado sobre las muestras de casos tratados con 1 dosis y con 2 ó más dosis revela los siguientes resultados:

En la muestra tratada con 1 dosis, hay diferencias significativas en la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-V) en PPLS y RLS comparadas en el momento del inicio del tratamiento y a los 2 meses de haber iniciado el tratamiento, aunque ningún caso evoluciona hasta la Cat. II (PPLS: paired-T test $p= 0,025$ bidireccional; RLS: paired-T test $p= 0,035$). La evolución no se considera significativa en CLS (paired-T test $p=0,083$ bidireccional).

En la muestra tratada con 2 ó más dosis, las diferencias en la evolución de las lesiones es muy significativa considerada a los 2 meses y a los 4 meses (PPLS: paired-T test $p= 0,001$ bidireccional; CLS $p= 0,001$; RLS $p<0,000$), ya que todas confluyeron en la Cat. II a los 4 meses de haber iniciado el tratamiento, salvo el 33,3% de las lesiones RLS (Figs.5-9).

Fig. 5

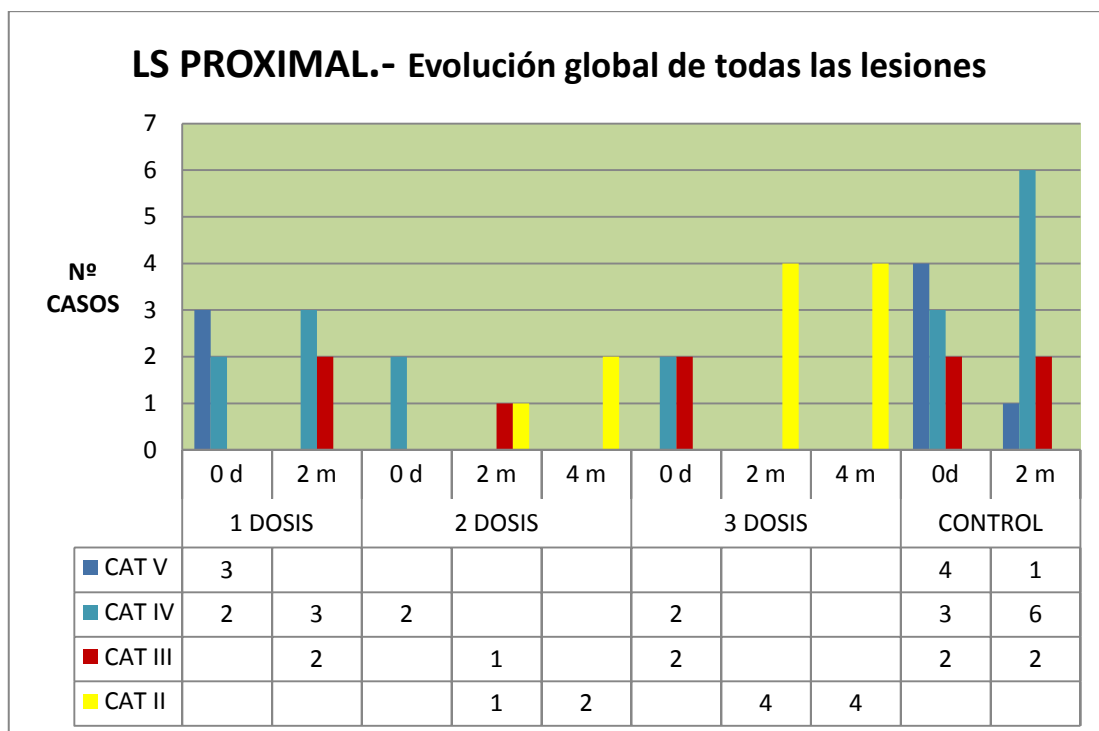


Fig. 10

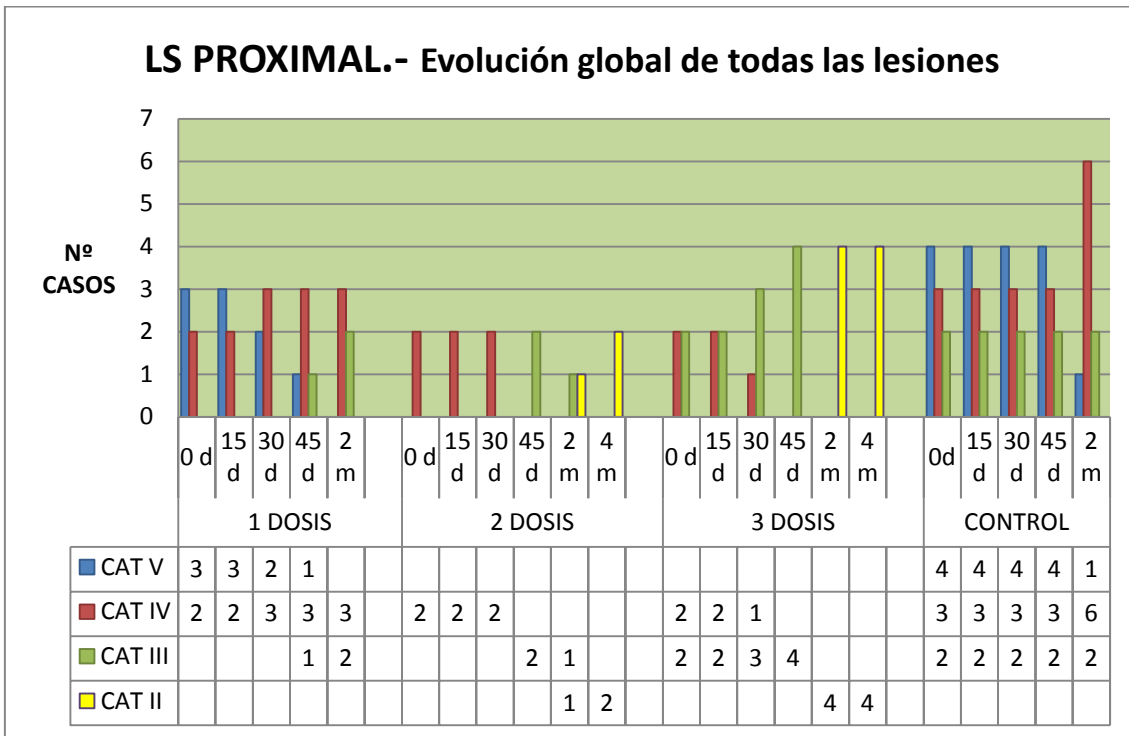


Fig. 7

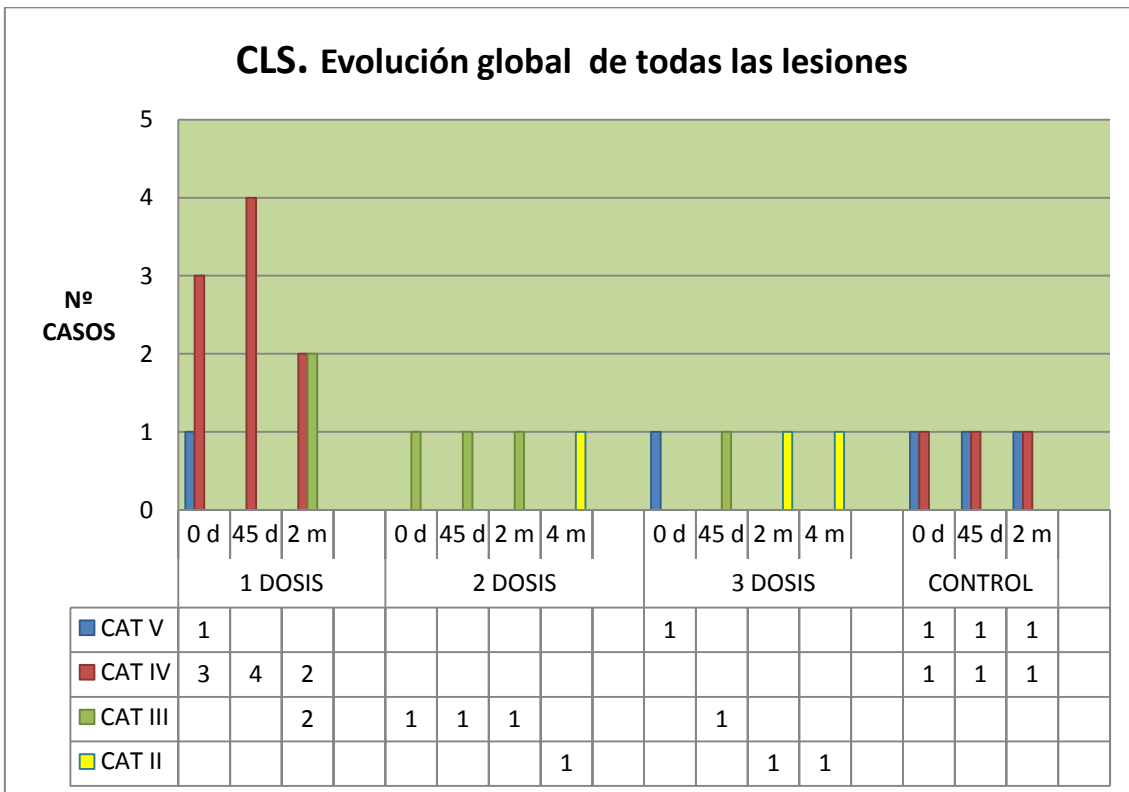


Fig. 8

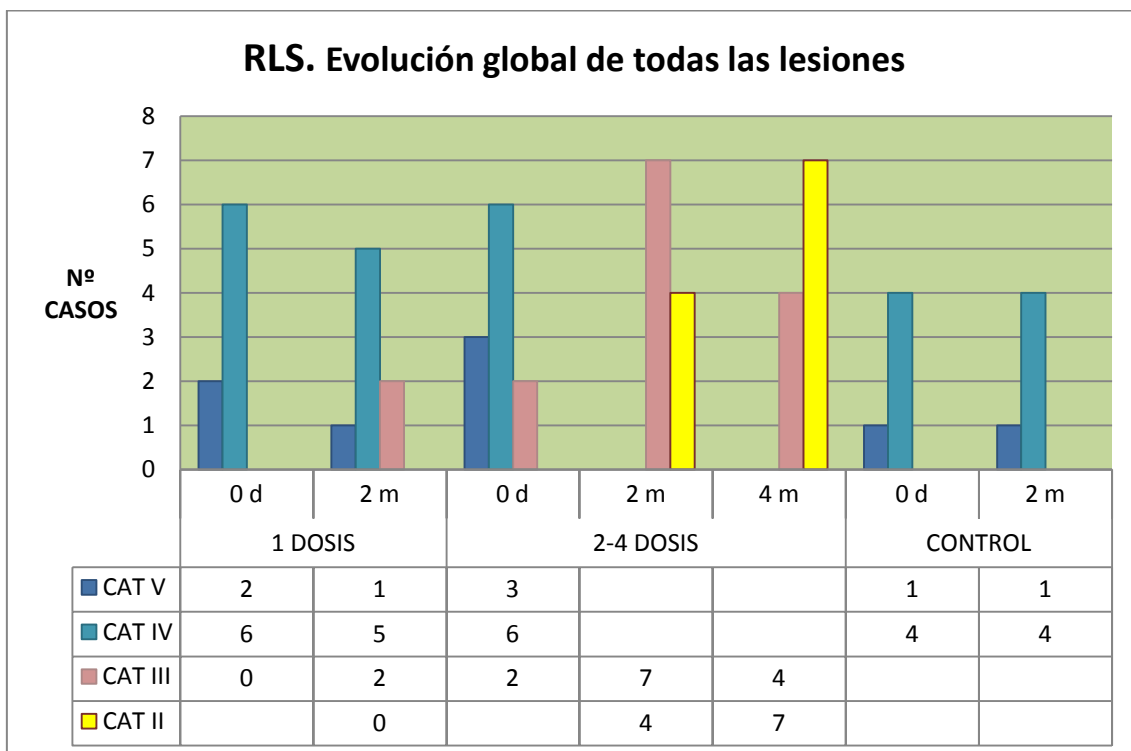
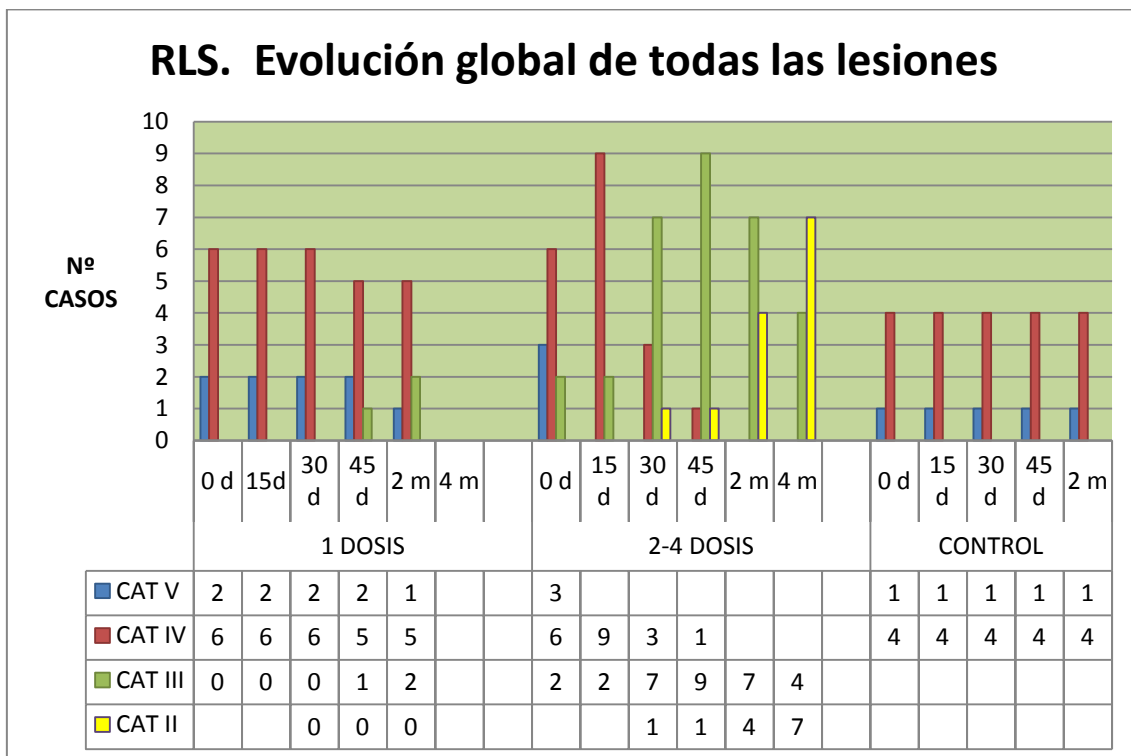


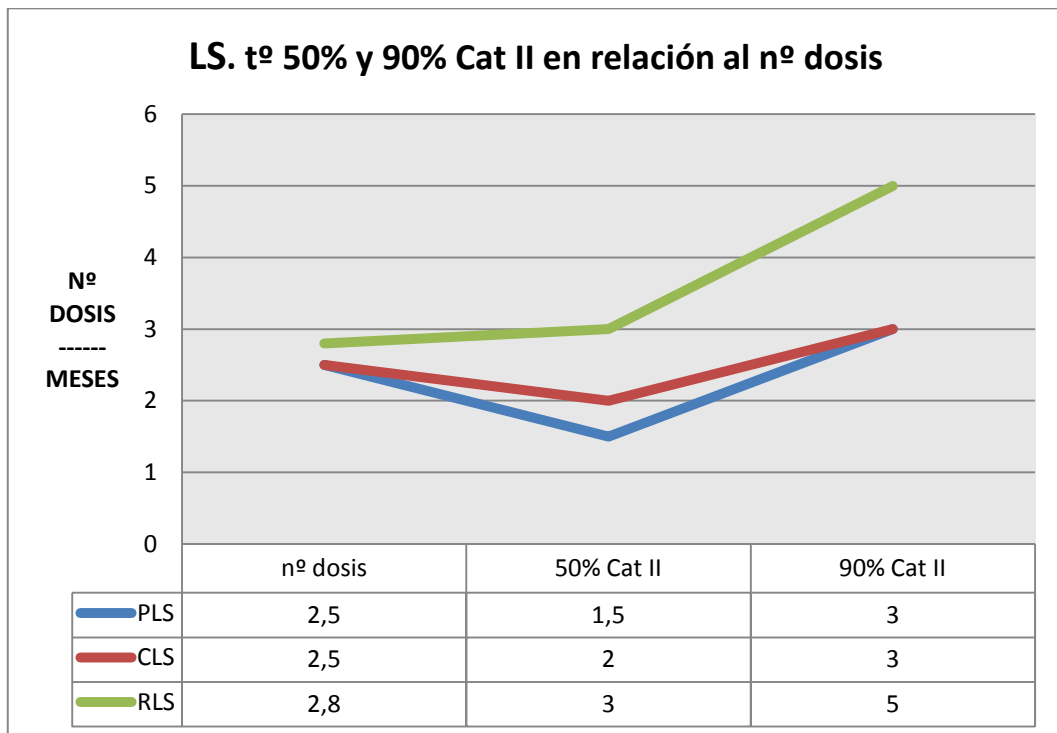
Fig. 9



En otras palabras, si definimos las variables t50%CatII y t90%Cat.II como el tiempo necesario para que el 50% y 90% de la muestra evolucione hasta la categoría II más benigna (equivalente a curación), observamos los siguientes resultados considerando todas las categorías lesionales en conjunto:

- a) Para los pacientes que recibieron 1 dosis: t50%Cat.II= desconocido (>2 meses) y t90%Cat.II= desconocido (>2meses) para PPLS, CLS y RLS.
- b) Para los pacientes que recibieron 2 ó más dosis: PPLS (t50%Cat.II= 45-60 días, y t90%Cat.II= 2-4 meses según número de dosis y gravedad de la lesión), CLS (t50%Cat.II= 45-60 días y t90%Cat.II= 2-4 meses, según número de dosis y gravedad de la lesión), RLS (t50%Cat.II= 30-90 días y t90%Cat.II= 2 a más de 4 meses, según número de dosis y gravedad de la lesión) (Fig.10).

Fig. 10



- 4. El análisis estadístico aplicado sobre las muestras de casos tratados 2 ó más dosis revela que la influencia de los factores "lesión aguda vs crónica" y "recuento plaquetario" no es significativa en la evolución de las categorías ecográficas lesionales (III-V) comparadas en el momento del inicio y a los 2 y 4 meses de haber iniciado el tratamiento (ANOVA factor "lesión aguda vs crónica": PLS p= 0,374 a los 2 meses y p= 0,501 a los 4 meses; RLS: p= 0,133 a los 2 meses y p= 0,111 a los 4 meses).
- 5. El análisis estadístico aplicado sobre las muestras de casos tratados con 2 ó más dosis, revela que la influencia del factor "lesión aguda vs crónica" no es significativa en relación

a las **recaídas** que se producen después de llegar a la competición (ANOVA factor "lesión aguda vs crónica" $p=0,108$ para recaídas después de la competición).

6. La mayoría de los caballos volvieron a los entrenamientos a los 4½ - 6½ meses del inicio del tratamiento. No siempre se pudieron controlar las pautas de entrenamiento e incrementos de carga de trabajo. Los caballos de carreras trotadores suelen competir un promedio de dos veces por mes.

Concluido un periodo de seguimiento (1- 3½ años) sobre la muestra de 19 caballos que recibieron 2 ó más dosis de PRP, se obtuvieron los siguientes resultados considerando:

- a) Todas las especialidades deportivas en conjunto (19 casos): todos los caballos recuperaron las prestaciones atléticas previas a la lesión. 2 caballos trotadores (10,5%) recayeron poco después de volver a competir y los restantes 17 caballos (89,5%) han competido o mantenido su nivel de trabajo habitual durante un periodo de tiempo largo. Todas las recaídas (2/19) se observaron en el grupo de caballos trotadores (Fig. 11).
- b) Exclusivamente la especialidad de caballos trotadores (9 casos): todos los caballos volvieron a la competición y de estos, 2 casos (22,2%) recayeron poco después de volver a competir y los restantes 7 caballos (77,8%) han competido durante un periodo de tiempo largo.

Fig. 11. LS. RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE 44 CABALLOS (2004-2008)



No se ha observado ninguna relación entre el resultado deportivo y el intervalo de número de dosis 2 a 3.

La disminución del calor y la sensibilidad al tacto fue especialmente significativa después de la primera dosis.

Se administraron 68 dosis de PRP distribuidas entre 36 LS (17 LS recibieron 1 dosis y 19 recibieron 51 dosis, con una media de 2,68 dosis/ligamento), no observándose reacción adversa alguna.

DISCUSIÓN

Los casos control no confluyeron hacia categorías más favorables a lo largo del periodo de control de 2 a 4 meses. Se sabe que el periodo de curación natural del ligamento puede durar 14-18 meses y que las lesiones ecográficas del LS pueden ser observadas durante más de 18 meses^{7,11-14}. Algunos autores se refieren al síndrome compartimental para explicar la lenta resolución de las lesiones anecoicas¹⁵.

Los pacientes que recibieron 1 dosis de PRP evolucionaron hacia categorías lesionales más benignas al cabo de los 2 meses, aunque ningún caso alcanzó la Cat. II dentro del periodo de observación de 2 meses. La progresión fue mucho más lenta que la del grupo que recibió 2 ó más dosis, ya que en éstos todas las categorías lesionales confluyeron en la Cat. II a los 4 meses de haber iniciado el tratamiento en el caso de PPLS y CLS; sólo el 66,6% de los casos con lesiones en RLS confluyeron en la Cat. II a los 4 meses. Creemos que estos resultados encuentran una explicación cuando se analiza el número de dosis administradas y en la capacidad intrínseca de curación del LS. Se ha mencionado la relación dosis-dependiente entre algunos FC y la síntesis de algunos componentes del tendón¹⁶⁻²⁶. Por lo que sabemos a través de los estudios in vitro sobre explantes de tendones y ligamentos, durante algunas semanas o meses algunos FC se expresan cuantitativamente más en el tendón lesionado (IGF-I, TGF- β) que en el sano¹⁹. Se opina que la expresión de algunos de estos factores (IGF-I, TGF- β) depende, en cierta medida, del PDGF. Algunos estudios in vitro indican que la expresión de PDGF-A y PDGF-B, durante las primeras semanas o meses, está cuantitativamente por debajo de los niveles del tendón sano¹⁹. Por ello, parece lógico que el tratamiento de las lesiones de tendones y ligamentos requiera de múltiples dosis.

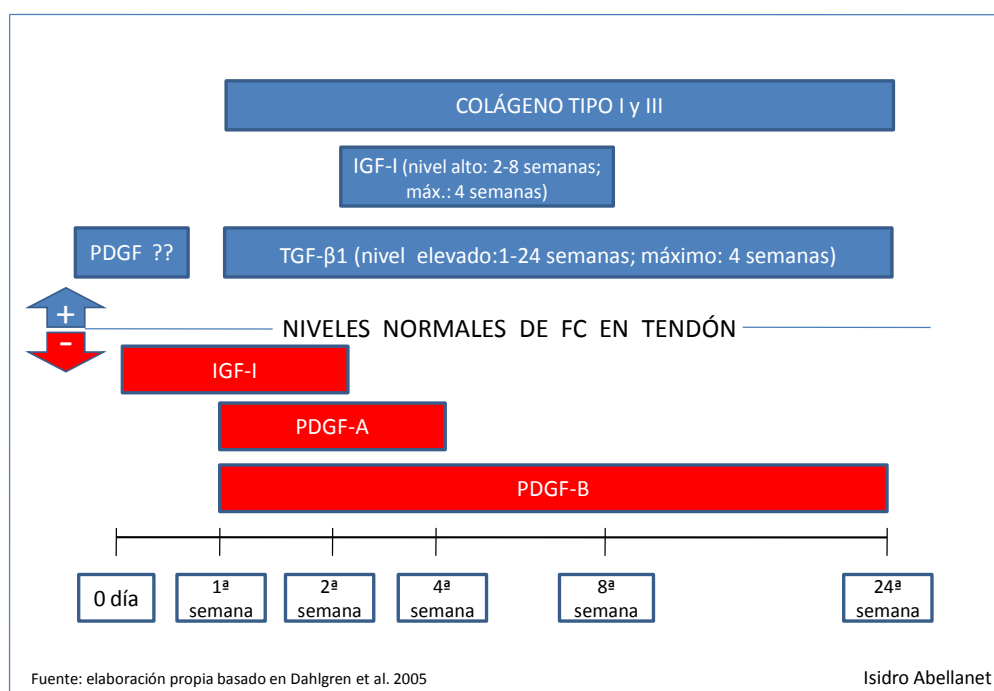
Comparativamente, las lesiones correspondientes a las categorías más graves (V, IV) evolucionaron más rápidamente que las de Cat. III, ya que confluyeron en la Cat. II en el mismo periodo de tiempo. Nuestra hipótesis es que en estas últimas lesiones más graves es más fácil infiltrar cualquier líquido y que, por tanto, recibieron dosis más altas y efectivamente intralesionales de PRP. Inversamente, las dificultades que entraña la inyección intralesional en el caso de lesiones Cat. III y el menor volumen o dosis depositado en el interior del ligamento, podrían explicar el mayor tiempo, comparativamente, que se necesita para que confluyan en la Cat II. En definitiva, se trataría de otra relación dosis-efecto.

Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en la evolución de las lesiones dependiendo de la situación "aguda" o "crónica" en la que se encontrase el

ligamento en el momento del inicio del tratamiento. Nuestra hipótesis explicativa se basa en que el límite entre estas dos situaciones no está claro y, tal vez, deba replantearse. Es bien sabido que las fases clásicas descritas en la fisiopatología de la curación del tendón y ligamento (aguda, subaguda y crónica), se solapan. Tras la lesión, la expresión génica para la síntesis de colágeno tipo I y III se mantiene elevada durante 24 semanas¹⁹, es decir, es común a las fases aguda, subaguda y crónica. Además, a nivel bioquímico, la actividad anabólica y catabólica coexisten y están siempre presentes como parte del mecanismo de homeostasis (MMPs y TIMMPs)²⁶. En todo caso, parece que los factores de crecimiento tienen capacidad para activar las secuencias de cascadas bioquímicas que ponen en marcha los procesos de curación con independencia de la fase en la que se encuentre la lesión (Fig.12).

Tampoco se ha observado relación alguna entre el status “agudo” y “crónico” y los porcentajes de recaídas.

SECUENCIA DE INTERVENCIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE CRECIMIENTO



Los resultados obtenidos con el tratamiento con PRP son más favorables que los obtenidos mediante tratamientos reparadores convencionales.

Todas las recaídas se observaron en el grupo de caballos de carreras al trote. En este grupo se acumulan más factores de riesgo^{11,12}, como la velocidad, las superficies duras y la repetición del estrés.

En los hipódromos locales los caballos trotadores compiten un promedio de dos veces al mes durante casi todo el año. A lo largo de estos años, en que se ha realizado este estudio, no

siempre ha sido posible controlar los protocolos de reincorporación progresiva al trabajo. Aún así, el porcentaje de recaídas, como se ha citado antes, es más favorable. Tal vez cabe comentar que los entrenadores contemplan los nuevos tratamientos más como un recurso para abreviar los periodos de descanso que como un método para reducir las recaídas.

Se ha citado en muchas ocasiones la relación entre la gravedad de las categorías ecográficas lesionales y el pronóstico. En el presente estudio, los dos casos que recayeron presentaban lesiones de Cat. IV y V y se produjeron en el periodo posterior a la competición.

El factor "recuento plaquetario" no ha tenido influencia en la evolución de las lesiones ni en las recaídas, por lo que suponemos que con la técnica utilizada para la obtención del PRP se asegura un suministro "mínimo" de FC.

Tras haber suministrado un total de 68 dosis de PRP en LS, se confirma la significativa disminución del dolor tras la primera dosis de PRP y la buena tolerancia al PRP autólogo y ausencia de complicaciones, observados en otros estudios^{27,28}.

CONCLUSIONES

Se debe ser prudente al valorar las imágenes ecográficas, teniendo presente que hay una proporción variable de vestigios de tejido muscular, normalmente igual en la extremidad ipsilateral, y conviene recordar las limitaciones de la ecografía en el momento de dar de alta el paciente.

Según se deduce del análisis estadístico, parece aconsejable administrar, al menos, dos o tres dosis de PRP, en función de la información aportada por la evaluación ecográfica.

Es importante que la administración sea intralesional.

No parece relevante que el LS se encuentre en una fase aguda o crónica, con la única precaución de no administrar el PRP dentro de los 10-15 días siguientes a la lesión.

Las lesiones más graves, especialmente si están localizadas en RLS, parecen requerir más dosis y más tiempo de recuperación.

El PRP se puede utilizar de forma segura en caballos y representa una alternativa novedosa y valiosa para el tratamiento de lesiones LS, ya que puede proporcionar factores de crecimiento que aceleran la curación, mejoran los porcentajes de curación y disminuyen las recaídas en comparación con los tratamientos convencionales de la medicina reparativa.

El coste económico del tratamiento con PRP obtenido por el método de tubo y doble centrifugación es comparable al de los tratamientos habituales convencionales.

Las estrictas condiciones de asepsia que requiere el método de tubo utilizado para la obtención de PRP no lo hacen recomendable para uso domiciliario.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wilson DA, Baker GJ, Pijanowski DJ, et al. Composition and morphologic features of the intraosseous muscle in Standardbreds and Thoroughbreds. *Am J Vet Res* 1991;52:133-139.
2. Dyson SJ. Proximal suspensory desmitis in the forelimb and the hindlimb. In: *Proceedings 48th AAEP Annu Met* 2002;137-142.
3. Dyson SJ. Proximal suspensory desmitis in the hindlimb: 42 cases. *Br Vet J* 1994;150:279-291.
4. Davis CS, Smith RKW, *Diagnosis and Management of Tendon and Ligament Disorders*. In: Auer JA, Stick JA, *Equine Surgery. 3rd* Saunders Elsevier, 2006; 1086-1111.
5. Ross MW. Surgical management of tendon and ligament injuries. In: *Proceedings 16th Annu Am Coll Vet Surg Forum*, 2006;160-163.
6. Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 868-950.
7. Dyson SJ, Genovese RL. The Suspensory Apparatus. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 654-672.
8. American Association of Equine Practitioners (AAEP). Guide for Veterinary Service and Judging of equestrian Events: Definition and Classification of Lameness. Lexington: AAEP.1991, p19.
9. Rantanen NW, Jorgensen JS, Genovese RL. Ultrasonographic Evaluation of the Equine Limb: Technique. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003.
10. Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M. Evaluation of Single and Double Tube Methods for Concentrating Equine Platelets. *Res Vet Science* 81 (2006)237-245.
11. Smith RKW, Goodship AE. Tendon and ligament physiology. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, (eds): *Equine Sports Medicine and Surgery*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2004.
12. Smith RKW. Pathophysiology of Tendon Injury. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003; pp 616-628.

13. Goodship A. The Pathophysiology of the tendon and ligament injuries and the role of the stem cells in their treatment. Proceedings EspoM Aachen 2006.
14. Davis CS, Smith RKW, Diagnosis and Management of Tendon and Ligament Disorders. In: Auer JA, Stick JA, *Equine Surgery.3rd* Saunders Elsevier, 2006.
15. Kold SE. Correlation Between Physical Examination Findings, Ultrasound and Pathology. In Proceedings BEVA 2005.
16. Murphy DJ, Nixon AJ. Biochemical and Site-Specific Effects of Insulin-Like Growth Factor I on Intrinsic Tenocyte Activity in Equine Flexor Tendons. *Am J Vet Res.* 1997 Jan;58(1):103-9.
17. Dahlgren LA, Marjorlein CH, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ. Insulin-like Growth Factor-I Improves Cellular and Molecular Aspects of Healing in a Collagenase-Induced Model of Flexor Tendinitis. *J Orthop Res* 2002;20:910-919.
18. Dahlgren LA, Mohamed HO, Nixon AJ. Expression of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Healing Tendon Lesions. *J Orthop Res* 2006 Feb;24(2):183-92.
19. Dahlgren LA, Mohamed HO, Nixon AJ. Temporal expression of Growth Factors and Matrix Molecules in Healing Tendon Lesions. *J Orthop Res* 2005 Jan;23(1):84-92.
20. Goodman SA, May SA, Heinegard D, Smith RK. Tenocyte Response to Cyclical Strain and Transforming Growth Factor Beta is dependent upon Age and Site of Origin. *Biorheology.* 2004;41(5):613-28.
21. Donnelly BP, Nixon AJ, Haupt JL, Dahlgren LA. Nucleotide Structure of Equine Platelet-derived Growth Factor-A and -B and Expression in Horses with Induced Acute Tendinitis. *Am J Vet Res.* 2006 Jul;67(7):1218-25.
22. Haupt JL, Donnelly BP, Nixon AJ. Effects of Platelet-derived Growth Factor-BB on the Metabolic Function and Morphologic Features of Equine Tendon in Explant Culture. *Am J Vet Res.* 2006 Sep;67(9):1595-600.
23. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 2003;33(5):381-94.
24. Smith JJ, Ross MW, Smith RK. Anabolic Effects of Acellular Bone Marrow, Platelet Rich Plasma, and Serum on Equine Suspensory Ligament Fibroblasts in Vitro. *Vet. Comp Orthop Traumatol.* 2006;19(1):43-7.
25. Nixon A. Injectable Treatment Options for Tendinitis: Choosing Between Growth Factors, Bone Marrow Aspirate, Platelet Enriched Plasma or Cultured Stem Cell. In Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten. Essen. Deutschland. 2007.
26. Dahlgren LA. Pathobiology of tendon and ligament injuries. In: *Clinical Techniques in Equine Practice.* 2007;6 (3):168-173.

27. Argüelles D, Carmona JU, Climent F. Platelet Rich Plasma as a Treatment of Tendon and Ligament Injuries in the Horse. In Proceedings 14th ECVS Annual Meeting. Lyon. France. 2005.
28. Waselau M, Sutter WW, Genovese RL, Bertone AL. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. JAVMA 2008; 232,10, 1515-20.

CAPÍTULO 2

ARTICULACIONES

2.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El correcto funcionamiento de las articulaciones sinoviales depende de la integridad anatómica y de la función celular de cada uno de sus componentes: el hueso, el cartílago articular, el líquido sinovial, la membrana sinovial, la cápsula articular fibrosa y las estructuras ligamentosas. El hueso subcondral de los extremos óseos que conforman la articulación está recubierto por cartílago articular que proporciona una superficie de contacto de baja fricción. La membrana sinovial y la cápsula fibrosa articular rodean el perímetro cartilaginoso y se insertan en el hueso proporcionando cierta estabilidad articular y un receptáculo para el líquido sinovial. Los ligamentos y estructuras musculares periarticulares contribuyen a la estabilidad articular.

La patología articular se basa en la disfunción de uno o varios de estos componentes.

LA MEMBRANA SINOVIAL. LIQUIDO SINOVIAL

La membrana sinovial está formada por dos capas, la íntima y la subíntima. La íntima, a su vez, tiene un espesor equivalente al de 1 a 5 estratos de células y carece de membrana basal. Estas células se clasifican en sinoviocitos A, responsables de la fagocitosis, y sinoviocitos B, que segregan proteínas. Es posible que un tercer tipo, los sinoviocitos C, sean un tipo celular que represente una fase de transición entre A y B¹. La función de fagocitosis permite la eliminación de partículas no deseadas. La secreción de proteínas se enmarca dentro del equilibrio anabólico-catabólico de la articulación sana. Cualquier desequilibrio puede conducir al desarrollo de la enfermedad articular. El abanico de proteínas que se secretan incluye hialuronano, colágeno, lubricina, prometaloproteinasas de la matriz (pro-MMPs), interleukinas y eicosanoides (PGE2)^{2,3}. Estas proteínas cumplen funciones de mantenimiento de la propia membrana sinovial y confieren características especiales al líquido sinovial. Otra parte de la composición del líquido sinovial procede del plasma, que es microfiltrado a nivel del endotelio de la capa subíntima permitiendo el paso de moléculas de un tamaño no superior a 10 KDa (glucosa, oxígeno, CO₂, proteínas, etc). La capa subíntima está constituida por tejidos fibroso y graso y está muy vascularizada e innervada^{4,5}.

En condiciones normales, el líquido sinovial presenta una celularidad baja (se admiten hasta 500 células por microdecilitro). Uno de los constituyentes más estudiados es el hialuronano producido por los sinoviocitos B. Sus características físico-químicas le confieren capacidades estéricas que contribuyen a regular la composición química del líquido sinovial excluyendo de sus composición a los leucocitos y otras proteínas; este efecto excluyente tendría lugar a nivel de la membrana sinovial. Por otra parte, el hialuronano (HA) y la lubricina son fundamentales en la lubricación de las superficies articulares. El HA se une a los condrocitos mediante los receptores CD44. La concentración de HA y el peso molecular del mismo son muy importantes y repercuten en las funciones citadas anteriormente⁶. Según los métodos analíticos empleados, en condiciones normales se obtienen valores en la concentración de HA que varían entre 29 y 760 ng/ml en el plasma y entre 0,25 y 0,48 mg/ml en el líquido sinovial⁷. El peso molecular del HA endógeno en los caballos varía entre 1-10 x 10⁶.^{2,3} La

vida media plasmática del HA endógeno se ha estimado en 15-90 minutos y la producción media diaria de HA es de unos 65mg (33-164 mg) por caballo⁷. Tras la administración vía intravenosa de 37,8 mg de hialuronato sódico (Hyonate®), la concentración plasmática recuperó su nivel basal a las 3 horas. La vida media del hialuronato sódico (Hyonate®) administrado intraarticularmente es de unas 5 horas y la concentración en el líquido sinovial vuelve a los niveles basales a las 24 horas de la administración; se ha calculado que para una articulación con una capacidad de 30 ml la excreción es de unos 4 ml/hora⁷. La eliminación se produce a través de la membrana sinovial y los vasos linfáticos; la degradación metabólica se produce en la misma membrana y en el hígado^{2,3}.

LOS LIGAMENTOS PERIARTICULARES Y LA CÁPSULA ARTICULAR

Ambos tejidos proporcionan estabilidad a la articulación. En las zonas proximales de las extremidades, las masas musculares que rodean las articulaciones también son imprescindibles para lograr esta estabilidad.

Dependiendo del tipo y rango de movimiento, los ligamentos y la cápsula se relajan y tensan en determinadas posiciones de flexión y extensión⁸. Esta capacidad de adaptación puede reducirse cuando hay un exceso de deposición de tejido fibroso. La materia seca que constituye los ligamentos y la cápsula está compuesta en un 75% por colágeno tipo I y algo de elastina y en un 23% por proteoglicanos. La inervación acompaña a la estructura vascular de estos tejidos⁹. Estos tejidos se modifican antes de insertarse en el hueso, de tal manera que las fibras de colágeno devienen en fibrocartilago y cartilago calcificado cerca de la zona de inserción¹⁰. El metabolismo de estos tejidos está influenciado por la actividad, de tal manera que el ejercicio los hipertrofia y la inactividad los atrofia¹¹.

EL HUESO SUBCONDRALE

Proporciona un soporte estable al cartilago articular. La placa subcondral consiste en hueso cortical con el sistema de canales haversianos dispuesto paralelamente a la superficie articular. Es más deformable que la cortical diafisaria⁹ y experimenta remodelaciones como respuesta al ejercicio¹².

EL CARTÍLAGO ARTICULAR

Constituye la superficie articular y, juntamente con el líquido sinovial, posibilita que el movimiento articular se realice con una fricción mínima. Macroscópicamente, tiene una superficie suave e hialina. Dependiendo del grosor, entre 1 a 4 mm, el color puede variar de blanco opaco a rosado debido a la transparencia del color del hueso subcondral. Carece de red vascular, linfática y nerviosa, por lo que su nutrición, así como la eliminación de residuos metabólicos, se realiza por difusión. Los vasos sanguíneos de la subíntima sinovial proporcionan los solutos nutricionales, que difunden a través de la íntima hasta el líquido sinovial y desde éste, a través de la matriz extracelular del cartilago, llegan a los condrocitos¹⁹.

Los condrocitos representan entre el 1% y el 12% del volumen del cartílago, siendo el resto matriz extracelular (MEC) que, a su vez, está compuesta por tres componentes principales: agua, colágeno y proteoglicanos. El contenido de agua varía entre el 70% y 80%, siendo mayor en animales jóvenes. En términos de materia seca, la MEC está compuesta por un 50% de colágeno, un 35% de proteoglicanos, un 10% de glicoproteínas (factores de crecimiento, COMP, proteinasas), un 3% de minerales, un 1% de lípidos y un 1% de otras sustancias².

El examen microscópico del espesor del cartílago revela 4 zonas contiguas que se diferencian por la morfología de los condrocitos y la orientación de las fibras de colágeno. Cada zona responde a diferentes estímulos¹³. Los condrocitos de cada zona tienen un ritmo de crecimiento¹⁴, una expresión génica^{15,16} y un nivel de biosíntesis específicos^{17,18}. La zona superficial o tangencial, que supone entre el 10% y el 20% del espesor del cartílago, es la que presenta una mayor concentración de condrocitos, que tienen una forma alargada y están dispuestos de tal forma que su axis mayor mantiene un paralelismo con la superficie articular; las fibras de colágeno, cuya densidad es mayor en esta zona que en las capas más profundas, también se disponen de forma paralela a la superficie. Se acepta la existencia de una lámina acelular de colágeno sobre la superficie de esta zona y débilmente unida al estrato celular de la misma. En la zona intermedia o transicional (40%-60% del espesor del cartílago) los condrocitos presentan un tamaño mayor y una morfología más ovoidea o redondeada; las fibras de colágeno se disponen de forma más aleatoria u oblicua respecto a la superficie articular. La zona profunda o radiada (30% del espesor del cartílago) se distingue porque incluye los condrocitos de mayor tamaño, de morfología algo alargada y orientados perpendicularmente a la superficie articular; las fibras de colágeno también se orientan perpendicularmente a la superficie articular. Adyacente al hueso subcondral, se encuentra la zona de cartílago calcificado, compuesta por células y matriz calcificada¹⁹. Los condrocitos de las zonas intermedia y profunda sintetizan más colágeno tipo II y GAGs¹⁶⁻¹⁸.

La superficie del cartílago presenta poros de un diámetro aproximado de 6 nm que permiten el paso de algunos solutos (iones, glucosa, etc)²⁰.

El colágeno total del cartílago está compuesto por colágenos formadores de fibrillas (tipos I, II, III, V, y XI) y no formadores de fibrillas²¹, siendo el colágeno tipo II el más importante cuantitativamente (90% a 95% del colágeno total)²². La principal diferencia entre el tipo I y II reside en el número de moléculas de hidroxilisina y en el grado de glicosilación. Las moléculas de colágeno tipo II se depositan a lo largo de un núcleo filamentososo de colágeno tipo XI²³. El colágeno tipo IX se dispone longitudinalmente a lo largo de las fibrillas de colágeno tipo II, actuando como interfase entre varias fibrillas de tipo II y entre éstas y los proteoglicanos, proporcionando estabilidad mecánica²⁴. Los tipos VI, XII y XIV desempeñan funciones como nexos entre las fibrillas de colágeno y otros componentes de la MEC²⁵. El colágeno tipo II forma una malla tridimensional que alberga los proteoglicanos (PGs) e hialuronano (HA) que proporcionan resistencia a la compresión.

Los proteoglicanos constituyen el 35% de la MEC seca. Químicamente, constan de un núcleo proteico al que se fijan glicosaminoglicanos (GAG). Entre los grandes proteoglicanos, el agregano representa el 85% de los proteoglicanos de la MEC; los tres GAG principales que integran su molécula son el condroitin-4-sulfato, el condroitin-6-sulfato y el keratan sulfato (KS). Las moléculas de agregano se unen para formar agregados de agregano que se unen al hialuronano. Los pequeños proteoglicanos representan el 5% de los proteoglicanos, están representados por el biglicano, decorin, fibromodulin entre otros. El decorin y fibromodulin se encuentran asociados a las moléculas de colágeno próximas a la superficie del cartílago articular. El decorin inhibe la formación de colágeno tipo I y II y el fibromodulin inhibe la fibrilogenesis. El biglicano y el decorin se unen al TGF- β impidiendo que desarrolle su función biológica¹⁹. En el cartílago normal existe un recambio permanente y equilibrado entre la síntesis de PGs por los condrocitos y la degradación por proteinasas extracelulares, que están influenciadas por citoquinas como IL-1²⁶.

Los condrocitos responden ante los distintos niveles de stress de tal forma que los niveles de stress mecánico insuficientes o excesivos favorecen los procesos catabólicos²⁷, mientras que los niveles fisiológicos normales favorecen los procesos anabólicos²⁸. Las cargas soportadas actúan como estímulos mecánicos, osmótico/iónicos y eléctricos que pueden afectar la homeostasis celular²⁹. Los condrocitos responden ante una amplia variedad de estímulos intracelulares y extracelulares, que incluyen la concentración de H⁺, el volumen, la presión, la osmolaridad, la concentración de Ca²⁺, factores de crecimiento y citoquinas. Se desconoce la importancia relativa de cada uno de estos factores. El Ca²⁺, por ejemplo, condiciona muchas funciones celulares, incluyendo la síntesis y degradación de la matriz³⁰.

HUESO

Los osteoblastos trabajan coordinadamente con los osteoclastos formando una "unidad de remodelación ósea" (URO). El osteocito también participa activamente en este dúo, ya que por medio del óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas puede inhibir la actividad osteoclástica y estimular la actividad osteoblástica. En el adulto, la remodelación acontece sobre todo en el hueso esponjoso³¹.

Las citoquinas y FC no poseen receptores en los osteoclastos (o poseen expresión muy baja), sino en los osteoblastos. El receptor para calcitonina está en los osteoclastos. De este modo se asegura un estrecho control sobre la actividad potencialmente destructiva o reabsortiva osteoclástica. La actividad reabsortiva depende de la expresión de MMP y catepsina. El osteoblasto expresa receptores para citoquinas y FC proosteogénicos, antiresortivos, como antiosteogénicos o proreabsortivos. Si en un momento predominan estos últimos, el osteoblasto activa paracrinamente el osteoclasto. Esta activación depende de mediadores solubles como IL-1, IL-6, IL-11 y PGE₂. La PGE₂ puede ser sintetizada por el osteoblasto y por el osteoclasto para acción autocrina. Cuando el osteoclasto es activado por los mediadores solubles, produce PGE₂.³¹

En la matriz predomina el colágeno tipo I. La solidez la proporciona la matriz mineralizada por precipitación de hidroxapatita.

CIRCULACIÓN SANGUÍNEA

La función de la membrana sinovial es decisiva en el mantenimiento de la homeostasis articular porque permite el intercambio de nutrientes y subproductos metabólicos entre la sangre de los capilares de la membrana y los tejidos articulares. La eficiencia de este intercambio depende de la densidad y buen estado de la red capilar y de la circulación sanguínea^{32,33}.

Todos los tejidos articulares disponen de un suministro vascular, excepto el cartílago, que es avascular. En las articulaciones diartrodiales el flujo sanguíneo está conducido una red de arteriolas procedentes de las arterias epifisarias y que se ubican en la unión del periostio con la membrana sinovial, formando un círculo perimetral. Las arteriolas más gruesas penetran en el hueso y nutren parte de la epífisis y el hueso subcondral, hasta la capa profunda del cartílago calcificado. Las arteriolas más pequeñas permanecen en la periferia del cartílago, configurando la circulación pericondral. La membrana sinovial posee una amplia red capilar que se prolonga emitiendo una arteriola central a lo largo de las vellosidades o "villi". Las vellosidades son una zona muy importante para el intercambio de sustancias y para la producción de hialuronano³⁴.

La circulación a nivel de la membrana sinovial puede verse afectada por la presión intraarticular (PIA), la temperatura local, la movilidad articular, los reflejos, el tono vasomotor y la liberación local de mediadores vasoactivos. El ejercicio es el principal activador de la circulación articular³⁵. La presión intraarticular (PIA), que normalmente tiene unos valores inferiores a la presión atmosférica, tiene una gran influencia sobre la circulación sanguínea articular, porque la presión a nivel de los capilares de la membrana sinovial es muy baja y estos se pueden colapsar fácilmente si se incrementa la PIA³⁶; esto es lo que ocurre cuando existe un derrame o efusión sinovial con una PIA igual o superior a 30 mmHg en la articulación metacarpofalagiana del caballo, pudiendo llegar a una situación de acidosis intraarticular si la PIA se aproxima a 45 mmHg³⁶⁻³⁸. Si estas alteraciones no se resuelven, la reducción de la circulación sanguínea derivará en otras consecuencias tales como hipoxia crónica, fibrosis e hipertrofia sinoviales, progresiva disminución de la red capilar de la membrana sinovial, acidosis local, disminución de la capacidad de eliminación de catabolitos, incremento de la producción de determinados mediadores de la inflamación y dificultades para la difusión de medicamentos administrados sistémicamente.

El ejercicio es muy importante en el mantenimiento de la circulación articular y la PIA porque incrementa el flujo sanguíneo y también el drenaje linfático. Sin embargo, a medida que progresa la fibrosis y, por tanto, disminuye la movilidad articular, el efecto beneficioso del ejercicio se manifiesta en menor medida y, en aquellos casos en que la fibrosis va acompañada de una sustancial reducción de la red vascular, puede incluso incrementar la hipoxia local³⁹.

LA LUBRICACIÓN

La concentración y las propiedades físico-químicas del hialuronano ayudan a explicar en parte el mecanismo de lubricación por el cual se minimiza la fricción entre los tejidos blandos y las partes óseas, pero resultan insuficientes para explicar los mecanismos de baja fricción necesarios para mantener la integridad de las superficies cartilagosas opuestas y sometidas a cargas. Se han elaborado varios modelos para explicar este mecanismo de baja fricción y parece que el modelo de lubricación elasto-hidrodinámico es el más aceptado. Según este modelo, a medida que se aplica presión sobre la superficie del cartílago, éste se exprime y libera agua que se interpone entre las dos superficies que se enfrentan y soportan la carga⁴⁰. Como consecuencia de la salida de líquido del cartílago, las moléculas de proteoglicanos de la matriz cartilaginosa se aproximan entre sí y generan unas fuerzas de repulsión entre ellas, como los polos de un imán⁴¹. Inversamente, a medida que disminuye la presión entre las superficies cartilagosas como resultado de la progresión del movimiento, el fluido es reabsorbido. Este flujo y reflujo de fluido entre el cartílago y el espacio intraarticular tiene también consecuencias sobre la nutrición del cartílago ya que facilita el intercambio de solutos hasta una profundidad de 6 mm del grosor cartilaginoso⁴².

FISIOPATOLOGÍA DE LA OSTEOARTRITIS

Existen varias corrientes de opinión para explicar la fisiopatología articular. Algunos investigadores han propuesto varios mecanismos específicos en la patogénesis de la OA, por ejemplo: como consecuencia de la existencia de un cartílago defectuoso con propiedades biomecánicas anormales, o de la presencia de cambios anormales en el hueso subcondral, o de la exposición del cartílago normal a cargas anormales⁴³. Otros autores, aún reconociendo que a veces el proceso que conduce a la OA puede tener origen en algún tejido concreto de los que componen la articulación, prefieren mantener una visión más integral, ya que en la enfermedad clínica suelen estar involucrados varios de los tejidos articulares y, a medida que la OA progresa, la afectación puede generalizarse a todos ellos^{3,7,19}.

El desequilibrio puede iniciarse como consecuencia de cargas mecánicas anormales, de presentación progresiva o repentina, o como consecuencia de un fallo metabólico tisular¹⁹. Y así, por ejemplo, la afectación de los ligamentos y de la capsula articular puede motivar inestabilidad y una distribución anormal de las cargas, que repercuten en la integridad del cartílago y pueden provocar una respuesta del hueso subcondral. La fibrosis de la cápsula articular puede reducir la movilidad articular y dificultar el riego sanguíneo de la articulación, afectando a la homeostasis de la membrana sinovial, líquido sinovial y cartílago articular. La membrana sinovial y el cartílago pueden producir sustancias catabólicas (prostaglandinas, citoquinas, TNF y MMP's) que degradan el colágeno II, el agregano y otras glicoproteínas de la matriz cartilaginosa³. El exceso de líquido sinovial puede contribuir a la inestabilidad articular y a elevar la presión intraarticular (PIA). El hueso subcondral puede intervenir como causa primaria⁴⁴. Algunas situaciones metabólicas sistémicas, como la obesidad, también podrían estar involucradas en la OA^{45,46}.

A pesar de la clara interrelación entre todos los tejidos articulares, nos extenderemos un poco más en la revisión del cartílago, el hueso subcondral y la membrana sinovial debido a su importancia específica y a las conexiones entre su fisiopatología molecular y el plasma rico en plaquetas como tratamiento regenerativo.

En el cartílago los condrocitos actúan como sensores que responden a la presión. Bajo condiciones normales, responden produciendo componentes de la MEC, tales como agregano y colágeno tipo II. Sin embargo, un stress mecánico anormal, tal como ocurre en la OA, altera el metabolismo de los condrocitos e induce la producción de proteasas y mediadores de la inflamación. Estos procesos conducen a una elevación de los niveles de IL-1 y TNF- α que, a su vez, disminuyen la síntesis de colágeno e incrementan las proteasas (incluidas las MMPs) y otros mediadores de la inflamación como IL-8, IL-6, IL-17, IL-18, PGE₂ y óxido nítrico (NO). El NO tiene múltiples efectos sobre los condrocitos, ya que inhibe la síntesis de colágeno y PG's y activa la producción de MMPs⁴⁷. Por otra parte, como consecuencia de los procesos oxidativos, los condrocitos sufren un proceso que ha sido demostrado histológicamente: la senescencia o apoptosis⁴⁸. El stress oxidativo causa un acortamiento de los telómeros y una disminución del número y de las funciones de las mitocondrias, con la subsiguiente disminución de la producción de ATP. El NO es una causa directa de la apoptosis de los condrocitos⁴⁹.

En el hueso subcondral, las funciones de resorción y remodelación de los osteoblastos y osteoclastos pueden desequilibrarse y participar activamente en la OA. Aún no está claro si las citoquinas del hueso conducen el proceso de la OA o si bien representan una respuesta consecuente a un stress mecánico o a la presencia de sustancias originadas en el cartílago o en la membrana sinovial⁴⁷. El NO está relacionado con las funciones de la célula ósea. La isoforma endotelial (ecNOS) se expresa en el hueso e interviene en la regulación de la actividad osteoblástica y formadora de hueso bajo la influencia de las cargas mecánicas. El ecNOS actúa junto con las prostaglandinas estimulando la formación de hueso e inhibiendo la resorción ósea⁵⁰. Por otra parte, IL-1 y TNF inducen iNOS en las células ósea, lo que potencia una pérdida de hueso⁵¹. La expresión de factores de crecimiento, IGF-1 y TGF- β está muy incrementada en las zonas con osteofitos y, de hecho, contribuyen en la formación de osteofitos y remodelación ósea⁵². La producción de VEGF estimula la angiogénesis en el hueso subcondral y este proceso es independiente del estímulo sobre la vascularización en la membrana sinovial⁵³.

La membrana sinovial es el tejido con más capacidad de reacción inflamatoria de los tres. La membrana sinovial concentra el proceso inflamatorio en la proximidad de áreas de cartílago o hueso lesionados. La membrana inflamada puede liberar proteinasas y citoquinas que pueden acelerar la destrucción de cartílago o de hueso. Incluso en aquellos casos de OA incipientes o subclínicos, se ha podido demostrar la presencia de estromelisin y colagenasas mediante tinciones inmunohistoquímicas. Los cambios sinoviales incluyen la hipertrofia e hiperplasia, frecuentemente acompañadas de infiltración leucocitaria⁵¹. La sinovial produce algunas de las quimoquinas y metaloproteinasas que degradan el cartílago. Cerrando el ciclo, los propios productos de degradación del cartílago provocan la liberación

de más colagenasas y otras enzimas hidrolíticas por parte de la sinovial. La sinovial experimenta una hiperplasia vascular a medida que progresa la OA. Esta cascada bioquímica desencadena la liberación de sinovial de IL-1 β y TNF- α que incrementan la espiral inflamatoria⁵¹. La OA erosiva representa un estadio más avanzado con mayores niveles de proteinasas y citoquinas.

HOMEOSTASIS Y BIOPATOLOGÍA DE LA OA

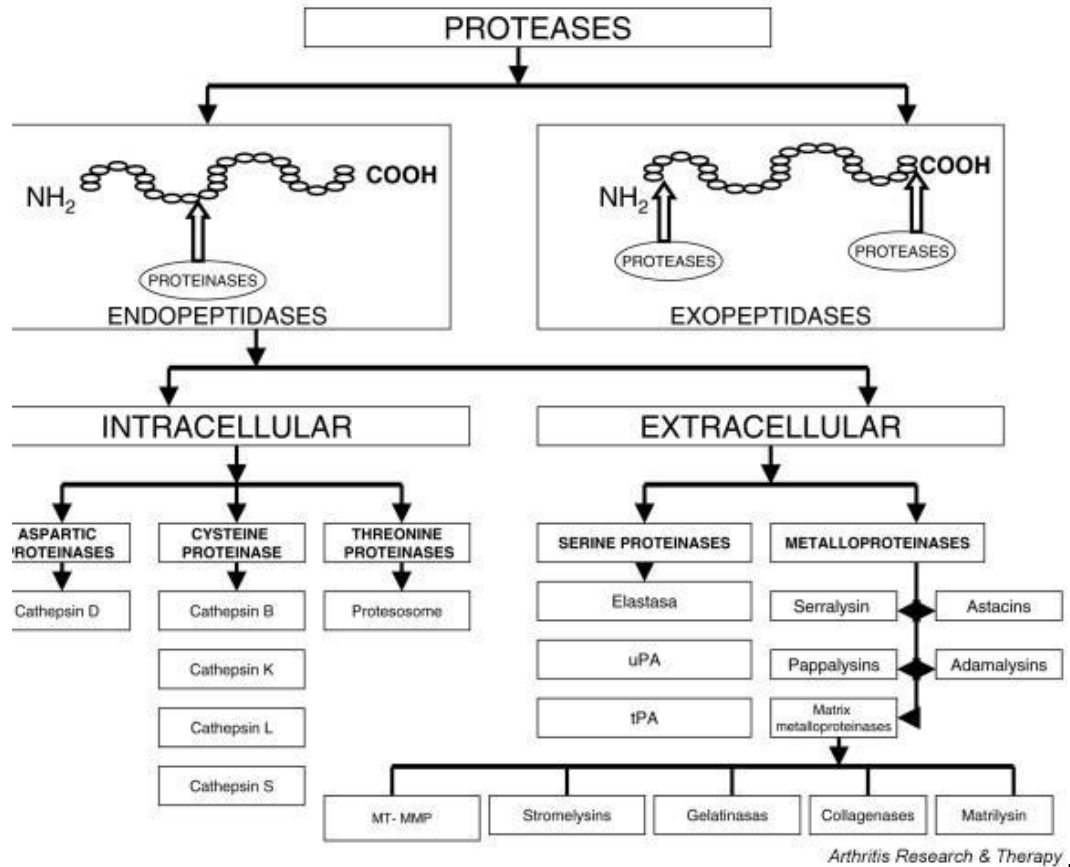
Todos los tejidos articulares están sujetos a unos procesos de recambio y mantenimiento que son el resultado de un equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos. La OA podría definirse como la ruptura de este equilibrio, una vez que los procesos reparadores anabólicos resultan insuficientes para equilibrar los catabólicos.

ENZIMAS DEGRADADORAS DE LA MEC

Las proteinasas se clasifican en 4 grupos principales según tengan afinidad por el ácido aspártico, la serina, la cisteína o los zinc-péptidos. Estas últimas constituyen el grupo de las metaloproteinasas de la matriz (MMP).

Metaloproteinasas de la matriz

Estas endopeptidasas pueden ser secretadas por los sinoviocitos, condrocitos, macrófagos y neutrófilos. Algunas MMPs pueden estimular su propia síntesis y la de sus precursores enzimáticos, así como disminuir la actividad de los inhibidores tisulares de MMPs (TIMP). Entre las metaloproteinasas más estudiadas se encuentran las colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13), estromelisin (MMP-3, MMP-10 y MMP-11), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y agrecanasas. Entre las colagenasas, MMP-8 es liberada por los leucocitos PMN humanos y equinos⁵⁴. MMP-13 es mucho más agresiva en la degradación de colágeno II que MMP-1. MMP-1, MMP-3 y MMP-13 están reguladas positivamente por las citoquinas catabólicas Interleuquina-1 (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral (TNF). IL-1 β estimula la fosforilación de la protein-quinasa (MAPK), lo que resulta en la activación de factores de transcripción que estimulan la producción de MMPs y agrecanasas^{55,56}. MMP-1 y MMP-13 degradan colágeno II y proteoglicanos. MMP-3,-10,-2 y -9 degradan proteoglicanos, fracciones de colágeno y elastina³. Se ha observado que varios miembros de la familia de enzimas ADAM (*a desintegrin and metalloproteinase*) pueden ser expresados por los condrocitos. Algunas de estas enzimas ADAM fraccionan el agrecano en lugares específicos, dando lugar a fragmentos que pueden ser detectados en el líquido sinovial de articulaciones con OA. Estas enzimas han sido denominadas agrecanasas y tienen muchas similitudes con MMP, pudiendo ser inhibidas por TIMP-1⁵⁷. Algunas moléculas agrecanasas son ADAMTS (*ADAM with thrombospondin type 1 motifs*), como la agrecanasa-1 (ADAMTS-4) y agrecanasa-2 (ADAMTS-5) son enzimas proteolíticas que degradan el agrecan del cartílago en la OA⁵⁸.



Group MMPs

Collagenases MMP-1 (collagenase-1), MMP-8 (collagenase-2),
 MMP-13 (collagenase-3),
 MMP-18 (collagenase-4)

Gelatinases MMP-2 (gelatinases A), MMP-9 (gelatinases B)

Stromelysins MMP-3 (stromelysin-1), MMP-10 (stromelysin-2),
 MMP-11 (stromelysin-3)

Matrilysins MMP-7, MMP-26

MT MMPs MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP),
 MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP),
 MMP-24 (MT5-MMP), MMP-25 (MT6-MMP)

Rengel Y, Ospelt C, Gay S. Arthritis Res Ther. 2007; 9(5): 221 Summary of proteases. MMP, matrix metalloproteinase; MT, membrane-type; tPA, tissue-type plasminogen activator; uPA, urokinase-type plasminogen activator.

EICOSANOIDES

Las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos son metabolitos del ácido araquidónico que están producidos por las células inflamatorias, los condrocitos y los sinoviocitos. Estas sustancias están presentes en la articulaciones inflamadas como consecuencia de las citoquinas catabólicas (IL-1 β y TNF)⁵⁹. PGE₂ participa en el proceso inflamatorio desencadenando una vasodilatación, reduciendo el umbral del dolor, estimulando el activador del plasminógeno y la degradación de proteoglicanos⁶⁰. Por otra parte, PGE₂ tiene efectos antiinflamatorios desde el momento en que estimula la expresión génica de citoquinas antiinflamatorias e inhibe la expresión de algunas citoquinas catabólicas (IL-1) y MMP^{3,61}. Se desconoce el balance neto de esta doble actividad.

Los leucotrienos causan vasodilatación e intervienen en la quimiotaxis. Se ha observado una correlación positiva entre la concentración de leucotrieno B₄ y el recuento de leucocitos en el líquido sinovial de los caballos con OA⁶².

ÓXIDO NÍTRICO

Este radical libre es un catabolito resultante de la oxidación de la L-arginina catalizada por enzimas sintetizadas expresadas por macrófagos y células endoteliales bajo el estímulo de la presencia de endotoxinas y citoquinas (IL-1 y TNF- α)^{51,63}. El NOS se presenta bajo varias formas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) y citoquina-inducible (iNOS); esta última es la más estudiada en patología articular. La síntesis de colágeno II y proteoglicanos por los condrocitos se inhiben si se crean las condiciones bajo las cuales se incrementa la producción de iNOS. Estimula la actividad de MMPs e interfiere en la expresión de IL-1ra por los condrocitos^{26,49}.

CITOQUINAS

Según sus efectos se clasifican como catabólicas, moduladoras o anabólicas.

Las citoquinas catabólicas o proinflamatorias más estudiadas son IL-1 y TNF- α , que pueden ser segregadas por los sinoviocitos y los condrocitos. Sus niveles se incrementan en la OA, con lo que estimulan la producción de MMP, óxido nítrico y prostaglandina E₂ (PGE₂), a la vez que inhiben la síntesis de agregano y de colágeno tipo II.³ Además, IL-1 puede inhibir la producción natural de inhibidores tisulares de MMP (TIMP) y de antagonistas de los receptores de IL-1 (IL-1ra).

Las citoquinas reguladoras o moduladoras, tales como IL-4, IL-10 y IL-13, reducen la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF, MMPs y prostaglandinas, y estimulan la síntesis de TIMP y IL-1ra^{6,64}.

La investigación de las citoquinas anabólicas es de gran interés en la búsqueda de nuevas modalidades terapéuticas⁶⁵. Las citoquinas anabólicas incluyen factores de crecimiento tales como IGF, TGF- β , FGF, BMP-2 y PDGF que actúan promoviendo la multiplicación de

condrocitos y la producción de MEC (colágeno tipo II y proteoglicanos). Se sabe que IGF-I estimula la producción de PG de la matriz⁶⁶ y la proliferación de los condrocitos⁶⁷, pero que este efecto se reduce en sujetos de edad avanzada y en caso de articulaciones con osteoartritis^{67,68,69}. Así como IGF-I surte escaso efecto sobre los condrocitos alterados, TGF- β neutraliza los efectos catabólicos de IL-1 y puede estimular la reparación del cartílago lesionado; así, por ejemplo, bloquea el efecto inhibitor de IL-1 sobre la producción de GAGs y colágeno^{70,71}. BMP-2 puede estimular la síntesis de proteoglicanos por parte de los condrocitos si IL-1 no está presente. TGF- β y BMP-2 estimulan la síntesis de colágeno II y PG⁷², pero también se han relacionado con la formación de condrocitos en los márgenes articulares y la consiguiente formación de osteofitos en articulaciones artríticas. PDGF es un FC con potente efecto mitogénico y quimiotáctico sobre los condrocitos y células mesenquimales indiferenciadas⁶⁶. El PDGF también estimula la proliferación de los condrocitos y la síntesis de PG, asimismo actúa como un potente quimiotáctico para células de origen mesenquimal⁶⁶. Estos son sólo algunos de los efectos aislados que se conocen.

Es de singular importancia el conocimiento de las secuencias en las que intervienen los FC, sus sinergias y las cascadas bioquímicas que originan para poder intervenir en el curso de la enfermedad⁷³⁻⁷⁴.

El equilibrio entre las citoquinas es fundamental para el mantenimiento de la estructura y función articular, ya que sus efectos no son taxativamente anabólicos o catabólicos. La familia de los factores de crecimiento TGF- β se asocia generalmente a una respuesta anabólica o reparativa; por otra parte, IL-1 β y TNF- α se asocia a un intenso efecto catabólico. Existen evidencias de que IL-1 β y TNF- α , y TGF- β por otra parte, mantienen una relación antagónica como señales que comparten unas mismas rutas bioquímicas a través de la fosforilación de protein-quinasas⁷⁶ que conducen a la activación de factores de transcripción tales como AP-1, ATF, Elk-1 y NF- κ B⁷⁷. Se supone que en esta relación, predomina el efecto neutralizador de TGF- β sobre IL-1 β ⁷⁸ y, a medida que avanza la edad del individuo, se pierde esta capacidad de neutralización⁷⁹. En determinados tejidos, TGF- β 1 estimula la concentración de IL-1ra⁸⁰.

INHIBIDORES NATURALES DE LAS METALOPROTEINASAS Y DE LAS CITOQUINAS

Los inhibidores tisulares naturales de las metaloproteinasas (TIMP) a nivel articular son TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3. Pueden ser sintetizados por diversas células entre las que se incluyen condrocitos y sinoviocitos. Actúan uniéndose a MMP y formando un complejo inactivo.

Las citoquinas catabólicas ejercen su acción uniéndose a los receptores de membrana. IL-1ra se une a los receptores específicos de IL-1, bloqueándolos e impidiendo la acción de IL-1. Existen varias isoformas, las secretadas (sIL-1ra) y las intracelulares (icIL-1ra), producidas por condrocitos, fibroblastos sinoviales, neutrófilos y macrófagos.

HIALURONANO Y NOCICEPCIÓN. EFECTOS MOLECULARES Y CELULARES DEL HIALURONANO

Más allá de la función como lubricante y amortiguador de presiones, el hialuronano está claramente relacionado con la nocicepción. El HA disminuye los impulsos nerviosos evocados por el movimiento de las articulaciones inflamadas y disminuye la sensibilidad nerviosa de los canales de iones^{81,82}.

El HA, en función de la dosis y de su peso molecular (PM), también atenúa la síntesis de PGE₂ por parte de los sinoviocitos y condrocitos⁸³ y la síntesis de bradikina en ratas⁸⁴.

Además, el HA puede tener efectos directos o indirectos sobre la sustancia P e inhibe la permeabilidad vascular incrementada por la sustancia P⁸⁴.

HA Y MEC

Según diversos estudios in vitro realizados con explantes de cartílago de diferentes especies, el HA exógeno estimula la síntesis de HA endógeno en función del PM y la dosis^{85,86}. También estimula la síntesis de PG en cartílago equino, incluso en presencia de IL-1, y suprime o disminuye la salida y degradación de PGs del cartílago; buena parte de estos efectos dependen de la dosis⁶.

HA Y LOS MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN

En diferentes especies se ha comprobado que el AH suprime la producción de TNF- α e inhibe la expresión de IL-1 β y estromelina (MMP-3) y estimula la síntesis de TIMP-1 dependiendo de la dosis y PM⁸⁷. Resulta interesante observar que la fragmentación del AH en el líquido sinovial estimula la expresión de MMPs y receptores CD44⁸⁸. Por tanto, la depolimerización del HA del líquido sinovial que acontece en la OA puede contribuir al incremento de enzimas degradantes y da sentido a la utilización clínica del HA exógeno, ya que éste estimula la producción de AH endógeno⁸⁹

También tiene efectos sobre el ácido araquidónico y sus metabolitos, ya que reduce los niveles de ácido araquidónico, algunos leucotrienos y la producción de PGE₂ inducida por IL-1 α ; estos efectos también dependen de la dosis y PM⁹⁰. Por otra parte, estimula las concentraciones de cAMP, por lo que el AH puede actuar como un antiinflamatorio.

Dependiendo de la dosis y PM, también tiene efectos antioxidantes, inhibiendo el stress oxidativo inducido por IL-1⁹¹ y el anión superóxido⁹².

HA Y LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO

Dependiendo de la concentración y PM, el AH regula la migración de linfocitos y PMN inducida por el leucotrieno B₄, así como la fagocitosis, la degranulación y la perjudicial adhesión de los neutrófilos al cartílago⁹³.

INFLUENCIA DEL PESO MOLECULAR DEL HA

Muchos de los efectos del AH evaluados in vitro dependen de la concentración y peso molecular (PM) del mismo.

Se ha sugerido que los efectos de los preparados de HA con un PM superior a 1×10^6 d son clínicamente mejores. Los estudios in vitro que analizan los efectos del HA sobre los condrocitos y algunos estudios clínicos⁹⁴ también parecen corroborar esta opinión; sin embargo, es posible que cuando se desea un efecto más allá de la superficie cartilaginosa, tal es el caso del hueso subcondral, ligamentos o meniscos, los preparados de bajo PM sean más apropiados porque difunden mejor⁸⁹.

LA GLUCOSAMINA

Inhibe la producción de MMPs inducida por IL-1 β al interferir en la fosforilación de la proteína-kinasa MAPK.⁵⁶ La adición de glucosamina (hidrocloruro) y condroitin sulfato a explantes de cartílago equinos acondicionados con IL-1 α consigue disminuir la liberación de GAGs totales al medio, como manifestación de degradación del cartílago⁹⁵.

Tabla 1. Efectos del Hialuronano.

Célula/Tejido		Efecto	Influencia : PM	Dosis
Leucocitos	Linfocitos	↓ Proliferación, migración, quimiotaxis, estimulación.	Sí	Sí
	Neutrófilos	↓ Migración, fagocitosis , activación y degranulación.	N/A	Sí
		↓ Agregación v adhesión al cartílago (degradación)	Sí	Sí
		↓ Radicales libres	N/A	Sí
Fibroblastos sinoviales		↑ Síntesis HA	Sí	Sí
		↓ Liberación de PGE, inducida por IL-1	Sí	Sí
		↓ Liberación de ácido araquidónico,	Sí	Sí
		↓ Células inflamatorias, inflamación y grosor de la membrana sinovial		
Condrocitos/Cartílago		↑ Densidad condrocitos, compacidad v grosor del cartílago	N/A	N/A
		↓ PGE, IL-1, TNF- α , MMP-3	N/A	N/A
		↓ Apoptosis de los condrocitos		
		↑ Producción de TIMP-1	Sí	N/A
		↑ Síntesis de PG,(incluso en presencia de IL-1 α)	N/A	Sí
		↓ Liberación de PG de la matriz del cartílago	N/A	Sí
	↑ Producción de cAMP			

Elaboración propia. Basada en: Caron JP. (2005) y Moreland LW. (2003)

DOLOR

No existe una buena correlación entre el dolor y el grado de OA⁹⁶, aunque este hecho puede que sólo refleje las limitaciones de las técnicas de imagen utilizadas en el diagnóstico, especialmente la radiología; es difícil realizar un diagnóstico radiológico de la OA cuando la alteración se asienta básicamente en los tejidos blandos. Las fibras mielínicas A- δ y amielínicas C forman la ruta aferente del arco reflejo del dolor y detectan los estímulos nocivos que dañan o ponen en peligro la integridad corporal, por ello se denominan "nociceptores". Las fibras A- δ inician el dolor agudo asociado a un insulto agudo, mientras que las fibras C son las responsables del dolor más persistente. Los receptores de las terminaciones pueden tener distintas sensibilidades frente a los estímulos químicos, mecánicos y térmicos. El cartílago articular no está inervado, pero el resto de los tejidos articulares, como el hueso subcondral, la cápsula articular y los meniscos, son ricos en ambos tipos de fibras⁹⁶. Tras la agresión, las células del sistema inmunológico y las células lesionadas liberan localmente sustancias sensibilizadoras de los nociceptores, como histamina, iones potasio, serotonina, PGE₂.⁵³ Como consecuencia de estos estímulos, las terminaciones sensoriales liberan neuropéptidos de la familia de las taquininas (Sustancia P, neurokinina A, y B, neuropéptido K), CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) y neuropéptido Y. La sustancia P liberada actúa a través de los receptores NK₁ de las células endoteliales de los capilares y estimulando directamente una mayor liberación de histamina por parte de las células plasmáticas, contribuyendo así a la extravasación de plasma. CGRP, actuando a través de los receptores CGRP, provoca una intensa y duradera vasodilatación⁹⁷. En modelos animales experimentales la infusión local de sustancia P exacerba la artritis⁹⁸. Los niveles elevados de sustancia P pueden estimular la liberación de citoquinas proinflamatorias, IL-1 y TNF, por parte de los monocitos⁹⁹. Pero esta secuencia también puede ser descrita de forma inversa, cerrando un círculo vicioso, ya que TNF- α , IL-1 β y IL-8 inducen la liberación de sustancias sensibilizadoras de los nociceptores y causan una hipersensibilidad persistente de los mismos¹⁰⁰⁻¹⁰². IL-1 β y PGE₂, además, pueden actuar directamente sobre los nociceptores y sobre cascadas de mensajeros secundarios y kinasas, alterando la sensibilidad de los receptores de transmisión primarios y los canales de sodio necesarios para la transmisión del potencial de acción¹⁰³. IL-1 β actúa a través de una protein-quinasa (p38 MAPK)¹⁰⁴, a su vez regulada por mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*)¹⁰⁵. Así se contribuiría a perpetuar un ciclo de "inflamación neurogénica"¹⁰⁶, que se enmarca dentro de una concepción e interpretación de la inflamación y el dolor amplias, entendiendo que la respuesta inflamatoria es modulada en parte por una comunicación bidireccional entre el cerebro y el sistema inmune. Esto incluye mecanismos hormonales y neuronales por medio de los cuales el cerebro regula la función del sistema inmunitario y, en sentido contrario, las citoquinas permiten que el sistema inmune regule el cerebro¹⁰⁷. Escuetamente, se pueden citar ejemplos de estas relaciones: la simpatectomía de las articulaciones se asocia a una disminución de la inflamación; la activación de adrenoreceptores β con altas

concentraciones de norepinefrina o adenosina resulta en un incremento de la concentración intracelular de cAMP y de respuestas antiinflamatorias, mientras que la activación de adrenoreceptores α_2 con bajas concentraciones de norepinefrina o adenosina desencadena la liberación de sustancias proinflamatorias, como la sustancia P¹⁰⁸.

Actualmente, una parte de la investigación con finalidad terapéutica está dirigida a interceptar estas secuencias, por ejemplo: neutralizar las protein-quinasas¹⁰⁹, ensayar agonistas de los receptores β -adrenérgicos¹¹⁰ y de los receptores μ morfínicos¹¹¹ e investigar antagonistas de los receptores de citoquinas proinflamatorias (IL-1ra), amén de las terapias regenerativas propiamente dichas.

Las relaciones entre algunas citoquinas y el HA con el dolor ya han sido mencionadas anteriormente.

En humanos se ha demostrado que la glucosamina y del condroitin sulfato, solos o combinados, disminuyen el dolor en los pacientes con OA¹¹².

EFUSIÓN SINOVIAL Y COMPOSICIÓN DEL LÍQUIDO SINOVIAL

El grado de efusión sinovial no siempre está correlacionado con la gravedad de la OA. Revela un desequilibrio entre la producción (circulación sanguínea) y la evacuación (circulación linfática). La OA suele ir acompañada de cambios en la viscosidad del líquido sinovial debido a una disminución de la concentración de hialuronano y/o degradación molecular del mismo¹¹³. El contenido en proteínas y la citología del líquido sinovial no siempre reflejan la situación real de la articulación. El estudio de biomarcadores de síntesis y degradación, así como de los cristales, presentes en el líquido sinovial, abre un camino para la detección precoz, la valoración de la situación real de la articulación y eficacia de los tratamientos.

BIOMARCADORES

Este apartado se desarrolla en el siguiente capítulo.

DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

Es una opinión bastante extendida que aún hoy la artroscopia sigue siendo el método de referencia para evaluar las articulaciones y, especialmente, el cartílago. Sin embargo, la utilización práctica de este procedimiento quirúrgico como método exclusivamente diagnóstico es poco habitual.

A pesar de las limitaciones comentadas anteriormente, durante muchos años la radiología ha sido el método diagnóstico más empleado y existe una abundante base de datos que ha permitido identificar unos signos radiológicos que sí se relacionan con la presencia de AO, como son: los osteofitos periarticulares, la disminución del espacio articular, la lisis y/o esclerosis del hueso subcondral, los fragmentos osteocondrales y la remodelación ósea.

La ultrasonografía es otro método de diagnóstico por imagen que se ha consolidado¹¹⁴.

La resonancia magnética proporciona abundante información, pero el diseño de las unidades actualmente disponibles limita mucho su utilización en la clínica equina.

REPARACIÓN DEL CARTÍLAGO POR MECANISMOS NATURALES. PRONÓSTICO.

El modelo de curación del cartílago equino se parece mucho al modelo humano⁶⁷.

Aún sigue vigente la observación realizada en 1743 según la cual “una vez que el cartílago se destruye, nunca se cura”¹¹⁵, entendida la curación como regeneración o “restitutio ad integrum”. Aún existen muchos obstáculos para la regeneración del cartílago basada en tratamientos celulares.¹¹⁶ Las lesiones cartilaginosas son reparadas por medio de tejido fibrocartilaginoso, con mayor o menor éxito en función de la superficie y espesor afectados. Las propiedades funcionales y las características histológicas del fibrocartílago neoformado son de inferior calidad que las del tejido original. Las lesiones que afectan a todo el espesor del cartílago, lo que incluye el cartílago calcificado pero no el hueso subcondral, y que ocupan una superficie superior a 5 mm², tienen un peor pronóstico¹¹⁷. Se han descrito mecanismos de reparación intrínsecos, basados en la limitada capacidad de los condrocitos para multiplicarse y reparar las lesiones: el término “matrix flow” describe la propagación de condrocitos y matriz cartilaginosa desde la periferia de la lesión hacia el centro de la misma en un intento de rellenar el defecto; se considera que su efecto reparador se limita a lesiones de pequeño tamaño. Los mecanismos extrínsecos se basan en la aportación de células y otros factores no procedentes del cartílago, sino del hueso subcondral; una forma de implementar este mecanismo natural es, por ejemplo, la reavivación del hueso subcondral mediante la perforación o microfractura quirúrgica (*micropicking*) para poder aportar células indiferenciadas y factores de crecimiento que estimulen la reparación.

En la Introducción General ya se han descrito las tendencias terapéuticas actuales de la medicina regenerativa. A continuación, se presentan los resultados obtenidos con el tratamiento basado en el PRP.

MOTIVOS PARA UTILIZAR PRP EN ARTICULACIONES

Creemos que hay dos motivos básicos para utilizar el PRP: por sus efectos sobre la estructura articular (neutralización o atenuación de los mecanismos catabólicos de la inflamación; estímulo anabólico regenerativo) y por sus efectos sobre el control del dolor.

1.- El PRP incluye FC con efectos anabólicos sobre los condrocitos (diferenciación y multiplicación) e induce la síntesis de MEC (Colágeno II y PGs)^{31,52,66-76}.

2.- Algunos factores de crecimiento inhiben o neutralizan los efectos de las citoquinas catabólicas, con lo que se preserva la integridad estructural. TGF- β 1 actúa como un antagonista de IL-1, ya sea inhibiendo directamente IL-1 o estimulando la liberación de IL-1ra^{70,71,76-80}.

3.- Dependiendo de la concentración de leucocitos y del tiempo de almacenamiento, en los sobrenadantes de los concentrados plaquetarios se detecta IL-1ra liberada por los neutrófilos¹¹⁹⁻¹²³.

4.-El PRP reduce el dolor¹²⁴⁻¹²⁵. Este efecto puede ser el resultado del sumatorio de varios efectos: la inhibición o neutralización de citoquinas proinflamatorias (TGF- β / IL-1 via p38 MAPK) y otras sustancias (sustancia P, PGE2) que hipersensibilizan los nociceptores⁹⁹⁻¹¹², el estímulo sobre la síntesis de ácido hialurónico^{127,128} y, en general, por el reequilibrio homeostático.

5.-El PRP estimula la síntesis de ácido hialurónico por los fibroblastos sinoviales, lo que contribuye a disminuir el dolor, mejorar la lubricación y controlar o revertir la inflamación^{81-97,125,127,128}.

2.2 ESTUDIOS CLÍNICOS

2.2.1 ARTICULACIONES

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

En este estudio se incluyeron 42 caballos de diferentes sexos, edades, razas y aptitudes, divididos en dos grupos. Un primer grupo de 12 caballos (7 trotadores, 2 doma, 2 silla), afectados con lesiones antiguas y recurrentes, cuyo historial clínico era bien conocido. Se trataron 12 articulaciones (7 metacarpo-falangianas, 3 carpos, 1 femoro-tibio-rotuliana, y 1 tarso-crural). Un segundo grupo de 30 caballos referidos (17 trotadores, 2 doma, 2 salto, 9 silla), de los cuales 10 presentaban lesiones articulares recientes y otros 20 padecían lesiones antiguas y recidivantes. Se trataron un total de 30 articulaciones (6 interfalangiánas distales, 8 metacarpo-falangianas, 2 metatarso-falangiana, 14 femoro-tibio-rotulianas).

Entre los 12 caballos del primer grupo se administraron 24 dosis de PRP; y entre los 30 caballos del segundo grupo se administraron 56 dosis.

GRUPO CONTROL

Se considera como tal el primer grupo de 12 caballos, ya que se conocía el historial clínico y deportivo de estos caballos desde que aparecieron las lesiones, así como su respuesta al tratamiento convencional basado en la administración de AINES, corticoides, ácido hialurónico y GAG, solos o en combinación.

En el momento en que se iniciaron los tratamientos todos los caballos presentaban cojeras que les impedían trabajar.

EVALUACIÓN DE LA COJERA

Se realizó un completo examen de la cojera incluyendo una determinación del grado de la misma, bloqueos anestésicos perineurales e intraarticulares para localizar las lesiones, radiografías y ecografías.

Las cojeras se clasificaron de 0 a 5, siguiendo los criterios AAEP¹²⁹. Donde 0= normal y 5= el caballo no es capaz de soportar peso sobre la extremidad.

Los resultados de los test de flexión durante un minuto se clasificaron en una escala de 0 a 3, donde 0= resultado negativo, 1= ligero incremento de la cojera, 2= moderado incremento de la cojera y 3= severo incremento de la cojera.

Se evaluó el calor local y la sensibilidad a la palpación.

Los pacientes se volvieron a evaluar antes de cada tratamiento (cada 10-15 días, si recibieron varias dosis) y a intervalos no definidos hasta que se reincorporaron a sus entrenamientos.

EVALUACIÓN RADIOLÓGICA

A pesar de sus limitaciones, la radiología sigue siendo la técnica de diagnóstico que acumula la mayor base de datos sobre la OA y la más asequible. La literatura científica¹⁸ recoge una serie de signos radiológicos indicadores de OA:

- a) los osteofitos periarticulares
- b) la disminución del espacio articular
- c) la esclerosis del hueso subcondral
- d) la lisis del hueso subcondral
- e) los fragmentos osteocondrales
- f) la remodelación ósea.

En el presente estudio, clasificamos los casos según presenten o no signos radiológicos y, en caso afirmativo, los clasificamos según los criterios expuestos anteriormente.

Las radiografías se realizaron con un sistema digital indirecto (VetRay 3600).

EVALUACIÓN ECOGRÁFICA

Se realizaron estudios ecográficos para complementar los radiológicos. Se evaluaron los tejidos blandos, aspecto del líquido sinovial y superficie articular. Fue la técnica de referencia para diagnosticar las lesiones de los meniscos y la sinovitis proliferativa o villonodular.

Se utilizaron sondas lineales rectas y microconvexas de 7,0 Mhz y 10 Mhz.

SEGUIMIENTO CLÍNICO

El estudio se inició en abril de 2005 y se finalizó en octubre de 2008. El seguimiento continuó durante un periodo mínimo de un año y hasta tres años y medio.

Del total de los 42 caballos tratados con PRP, se registraron los datos correspondientes a la evaluación clínica y a sus carreras deportivas, prestando especial atención al rendimiento atlético y a las recaídas acontecidas antes y después de volver a la competición o nivel deportivo previo.

PREPARACIÓN DEL PRP

El PRP se preparó según el método de tubo y doble centrifugación¹³⁰, obteniendo 100 ml de sangre de forma aséptica de la vena yugular mediante una palomilla 16 G (Braun) y depositándola en tubos al vacío, estériles, de 5 ml., conteniendo citrato sódico al 3,2 %. A

continuación los tubos se centrifugaron a 120g durante 5 minutos. En condiciones asépticas, se aspira el 50% de la columna de plasma que está adyacente a la capa leucocitaria. El plasma obtenido se vuelve a centrifugar a 240g durante 5 minutos y se recupera el 25% de la columna de plasma adyacente al sedimento y éste mismo. Esta última fracción, contenida en jeringas estériles, se activa con cloruro cálcico (4.5mEq/5ml) adicionando 50 μ l / 1 ml PRP. Se realizó el recuento plaquetario de cada muestra de sangre obtenida.

ESQUEMA DE TRATAMIENTO CON PRP

La zona afectada de la extremidad se preparó de forma aséptica para las inyecciones. Los caballos se sedaron con detomidina (Domosedan[®], Pfizer) – butorphanol (Torbugesic[®], Fort Dodge Laboratories Inc.). El PRP se inyectó intraarticularmente entre 1 y 3 veces en intervalos de 10-15 días, según la evolución de la sintomatología clínica, basada en el grado de dolor a la flexión y cojera. Durante las semanas que duró el tratamiento los caballos se mantuvieron en reposo o dando paseos a la mano. No se administró ningún otro tratamiento sistémico o tópico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los dos grupos de 12 y 30 caballos, se aplicó el test T para muestras dependientes, para comparar la evolución de las cojeras de los caballos antes y después del tratamiento.

Igualmente, se aplicó el test ANOVA para evaluar la repercusión en el resultado final, de los factores "lesión aguda o crónica", "cambios radiológicos", "recuento plaquetario" y "número de dosis". Asimismo, se evaluaron estos factores en relación al momento en que se produjeron las recaídas, antes o después de la competición.

En el caso de los caballos de carreras, se consideraron favorables aquellos casos que consiguieron competir sin manifestar cojera en, al menos, 5 carreras. Y en el caso de los caballos de recreo se consideraron favorables aquellos casos que volvieron a su nivel atlético previo sin manifestar cojera durante un periodo mínimo de 6 meses.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante software SPSS ver.14. Se estableció un intervalo de confianza de 95% y se consideraron valores de $P < 0,05$ como significativos.

Caso	Artic	Cambios RX					Ecografía	Dosis	Rec A	Compite	Re c
		Osfit	DEA	ELSub	FOC	Remod					
1	Carpo	Si	Si		No			2	Si	No	
2	Carpo	Si	Si		Si	Si		1	Si	No	
3	Carpo	Si	Si		Si	Si		1	Si	No	
4	Mcf	No	No	No	No	No		3	No	Si	No
5	Mcf	No	No	No	No	No		3	No	Si	No
6	Mcf	No	No	No	No	No		1	No	Si	No
7	Mcf	No	No	No	No	No	S villono	2	No	Si	Si
8	Mcf	No	Si	No	No	No		1	No	Si	Si
9	Mcf	No	No	No	Si	No		3	No	Si	No
10	Mcf	No	No	No	No	No		1	No	Si	No
11	FTR	No	No	Si	No	No		3	No	Si	No
12	Tcr	No	No	No	Si	No		3	No	Si	No
1	2ªlf	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
2	2ªlf	No	No	No	No	No		2	No	Si	Si
3	2ªlf	Si	No	No	No	si		2	Si	No	
4	2ªlf	No	Si	No	No	No		1	Si	No	
5	2ªlf	Si	Si	No	Si	si		2	Si	No	
6	2ªlf	No	No	No	Si	No		1	Si	No	
7	Mcf	No	No	No	No	No		1	No	Si	No
8	Mcf	No	No	No	No	No		1	No	Si	No
9	Mcf	No	No	No	No	No		3	No	Si	No
10	Mcf	No	No	No	No	No		3	No	Si	No
11	Mcf	Si	Si	No	Si	Si		1	Si	No	
12	Mcf	No	No	No	Si	No		2	No	Si	No
13	Mcf	No	No	No	Si	No		2	No	Si	No
14	Mcf	Si	Si	No	Si	Si		1	Si	No	
15	Mtf	No	No	No	No	No		2	No	Si	Si
16	Mtf	No	No	No	No	No		2	Si	No	No
17	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
18	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
19	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
20	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
21	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
22	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
23	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
24	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
25	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
26	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
27	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
28	FTR	No	No	No	No	No		2	No	Si	No
29	FTR	No	No	No	Si	No		2	Si	No	
30	FTR	Si	No	No	No	Si		2	Si	No	

Osfit: osteofitos; DEA: disminución espacio art.; ELSub:esclerosis/lisis subcondral; FOC: fragmentos osteocondrales; Remod: remodelación ósea

RESULTADOS

1. El análisis estadístico aplicado sobre la muestra de 12 caballos con un historial conocido de problemas crónicos recidivantes, mostró diferencias significativas entre la situación clínica previa y posterior al tratamiento (Test T: $p < 0,000$), ya que 9 caballos consiguieron volver a la competición; de estos, 3 caballos recayeron tras alcanzar el nivel de la competición. El test ANOVA mostró que el factor "número de dosis" no resultó significativo dentro del intervalo de 2 a 3 dosis ($p = 0,431$); sin embargo, el factor "presencia de cambios radiológicos" sí resultó relevante en el resultado final ($p = 0,014$). El factor "aguda/crónica" no pudo ser evaluado ya que todos los caballos presentaban lesiones antiguas y fueron considerados "crónicos". El factor "recuento plaquetario" no resultó significativo ($p = 0,786$).
2. En el grupo heterogéneo de 30 caballos, con lesiones agudas y crónicas, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre la situación clínica previa y posterior al tratamiento (Test T: $p < 0,000$), ya que 21 caballos consiguieron volver a la competición; de estos, 2 caballos recayeron tras alcanzar el nivel de la competición. Igualmente, el test ANOVA mostró que el factor "aguda/crónica" en apariencia resulta relevante ($p = 0,019$). El factor "número de dosis" no resultó significativo dentro del intervalo de 2 a 3 dosis ($p = 0,534$). El factor "recuento plaquetario" no resultó significativo ($p = 0,788$). El factor "presencia de cambios radiológicos" sí resultó relevante en el resultado final ($p < 0,000$).
3. En este segundo grupo, las recaídas que se producen antes de llegar a alcanzar el nivel de la competición están muy influenciadas por el factor "cambios radiológicos" ($p = 0,021$).
4. Los cambios radiológicos que de forma individualizada han repercutido menos desfavorablemente en el resultado final han sido los pequeños fragmentos osteocondrales ($< 4\text{mm}$) ya que 4 caballos, de los 7 que presentaban únicamente este signo radiológico, han podido volver a competir o a su nivel atlético previo.
5. La disminución de la sensibilidad dolorosa frente a la flexión ya fue especialmente significativa después de la primera dosis de PRP. Todos los caballos, incluso aquellos con las lesiones más graves y que no se recuperaron desde el punto de vista atlético, experimentaron una disminución de la sensibilidad dolorosa.
6. Se administraron 80 dosis de PRP distribuidas entre los 42 caballos y no se observó ninguna reacción adversa.

DISCUSIÓN

Los 12 caballos del grupo control, con lesiones crónicas y con un historial clínico y terapéutico bien conocido, experimentaron una evolución favorable y más duradera que la que se obtenía con los tratamientos convencionales. El 75% (9/12) recuperaron su nivel atlético previo o volvieron a la competición, aunque al cabo de poco tiempo, el 33% (3/9) recayeron. Por tanto, finalmente, el 50% (6/6) recuperó su nivel atlético previo y lo mantuvo durante mucho tiempo. Antes de iniciar el tratamiento con PRP todos los caballos de este grupo manifestaban cojeras que impedían su utilización deportiva.

El grupo de 30 caballos, con lesiones agudas y crónicas, también experimentó una evolución favorable y duradera. El 70% (21/30) recuperó su nivel atlético previo o volvió a la competición, aunque posteriormente, el 9,5% (2/21) recayese. Por tanto, finalmente, el 63,3% (19/30) de los caballos se mantuvo sin cojeras de forma estable.

En todos los casos, incluidos aquellos que no se recuperaron totalmente de la cojera, se observó una marcada disminución del dolor después de la administración de la primera dosis. Las terminaciones nociceptivas se distribuyen por la membrana sinovial y el hueso subcondral y se sensibilizan y estimulan según la presencia de determinadas sustancias que se acumulan como consecuencia de la acción de citoquinas catabólicas como IL-1 y TNF- α . La IL-1 puede actuar también directamente sobre los nociceptores. El estado de hipersensibilización periférica se puede instalar de forma persistente y cerrar un ciclo de "inflamación neurológica". Algunos FC, como TGF- β , antagonizan los efectos de IL-1 y TNF- α sobre los condrocitos⁷⁶ y nociceptores⁹⁹⁻¹¹². La administración intraarticular de PRP se ha relacionado con el incremento relativamente sostenido de GAGs y HA en el líquido sinovial^{127,128} y ello también puede explicar el efecto analgésico^{81-97,125,127,128}.

Este estudio está basado en una clasificación de los signos radiológicos de la OA. El factor "cambios radiológicos" ha resultado muy influyente sobre las posibilidades de recuperación del nivel atlético previo o el regreso a la competición, lo cual induce a pensar que el PRP constituye una modalidad de tratamiento especialmente indicada en aquellas lesiones imputables a los tejidos blandos articulares y en aquellas situaciones en las que se observan limitados cambios radiológicos, especialmente, diminutos fragmentos osteocondrales.

La terminología "lesión aguda" y "lesión crónica", entendidas sin más como "reciente" o "antigua" y disociadas de los "cambios radiológicos", no resulta de utilidad a efectos de prever cuál puede ser el resultado del tratamiento con PRP, si bien es cierto que con el paso del tiempo la evolución de la OA permitirá que afloren más "cambios radiológicos". Además, a nivel bioquímico, la actividad anabólica y catabólica coexisten y están siempre presentes como parte del mecanismo de homeostasis (MMPs y TIMMPs; IL-1-TNF- α y TGF- β ; IL-1 y IL-1ra). En todo caso, parece que los factores de crecimiento tienen capacidad para activar las secuencias de cascadas bioquímicas que ponen en marcha los procesos de curación con independencia de la fase en la que se encuentre la lesión.

Por lo que respecta a las recaídas, el factor status "agudo vs crónico" tampoco se ha mostrado significativo, pero sí el factor "cambios radiológicos".

Todas las recaídas se observaron en el grupo de caballos de carreras al trote. En este grupo se acumulan más factores de riesgo, como la velocidad, las superficies duras y la repetición del stress.

En los hipódromos locales los caballos trotadores compiten un promedio de dos veces al mes durante casi todo el año. A lo largo de estos años, en que se ha realizado este estudio, no siempre ha sido posible controlar los protocolos de reincorporación progresiva al trabajo. Aún así, el porcentaje de recaídas, como se ha citado antes, es más favorable. Tal vez cabe comentar que los entrenadores contemplan los nuevos tratamientos más como un recurso para abreviar los periodos de descanso que como un método para reducir las recaídas.

En cualquier caso, los resultados obtenidos con el tratamiento con PRP son más favorables que los obtenidos mediante tratamientos reparadores convencionales

El factor "recuento plaquetario" no ha tenido influencia en la evolución de las lesiones ni en las recaídas, por lo que suponemos que con la técnica utilizada para la obtención del PRP se asegura un suministro "mínimo" de FC.

Tras haber suministrado un total de 80 dosis de PRP, se ha constatado la buena tolerancia al PRP autólogo y ausencia de complicaciones, como se ya se ha observado en otros estudios piloto¹³¹.

CONCLUSIONES

El PRP se puede utilizar de forma segura en caballos y representa una alternativa novedosa y valiosa para el tratamiento de lesiones articulares acompañadas de pocos cambios radiológicos, ya que puede proporcionar factores de crecimiento que alivian el dolor, aceleran la curación, mejoran los porcentajes de curación y disminuyen las recaídas en comparación con los tratamientos convencionales de la medicina reparativa.

Se recomienda administrar, al menos, 2 dosis de PRP.

El coste económico del tratamiento con PRP obtenido por el método de tubo y doble centrifugación es comparable al de los tratamientos habituales convencionales.

Las estrictas condiciones de asepsia que requiere el método de tubo utilizado para la obtención de PRP no lo hacen recomendable para uso domiciliario.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Henderson B, Pettipher ER: The synovial lining cell: Biology and pathobiology. *Semin Arthritis Rheum* 1985;15:1-32.
2. Todhunter RJ: Anatomy and physiology of sinovial joints. In McIlwraith CW, Trotter GW, editors: *Joint disease in the horse*, Philadelphia, 1996, WB Saunders.
3. McIlwraith CW: General pathobiology of the joint and response to injury. In McIlwraith CW, Trotter GW, editors: *Joint disease in the horse*, Philadelphia, 1996, WB Saunders.
4. Dee R: The innervation of joints. In Sokoloff L, editor: *The Joints and Synovial Fluid*, New York, 1978, Academic Press.
5. Gronblad M, Korkala O, Liesi P, et al: Innervation of synovial membrane and meniscus, *Acta Orthop Scand* 1985;56:484-486.
6. Moreland LW: Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:54-67.
7. Popot MA, Bonnaire Y, Guehot J, et al: Hyaluronan in horses: physiological production rate, plasma and sinovial fluid concentrations in control conditions and following sodium hyaluronate administration. *Equine Vet J* 2004; 36(6):482-487.).
8. McIlwraith CW: Diseases of joints, tendons, ligaments, and related structures. In Stashak TS, editor: *Adam's Lameness in horses*, ed 5, Philadelphia 2002, Williams & Wilkins.
9. Mankin HJ, Radin EL: Structure and function of joints. In McCarty DJ, editor. *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, ed 2, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
10. Ralphs JR, Benjamin M: The joint capsule: Structure, composition, ageing and disease. *J Anat* 1994;184:503-509.
11. Thorton GM, Shrive NG, Frank CB: Healing ligaments have decreased cyclic modulus compared to normal ligaments and immobilization further compromises healing ligament response to cyclic loading, *J Orthop Res* 2003;21:716-722.
12. Kawcak CE, McIlwraith CW, Norrdin RW, et al :Clinical effects of exercise on subchondral bone of carpal and metacarpophalangeal joints in horses, *Am J Vet Res* 2000;61:1252-1258.
13. Darling, EM; Athanasiou, KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005;23:425-432.
14. Kim, HT; Zaffagnini, S; Mizuno, S; Abelow, S; Safran, MR. A peek into the possible future of management of articular cartilage injuries: Gene therapy and scaffolds for cartilage repair. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*. 2006;36:765-773.

15. Darling, EM; Hu, JCY; Athanasiou, KA. Zonal and topographical differences in articular cartilage gene expression. *Journal of Orthopaedic Research*. 2004;22:1182–1187.
16. Hidaka, C; Cheng, C; Alexandre, D; Bhargava, M; Torzilli, PA. Maturation differences in superficial and deep zone articular chondrocytes. *Cell and Tissue Research*. 2006;323:127–135.
17. Klein, TJ; Chaudhry, M; Bae, WC; Sah, RL. Depth-dependent biomechanical and biochemical properties of fetal, newborn, and tissue-engineered articular cartilage. *Journal of Biomechanics*. 2007;40:182–190.
18. Chung C, Burdick JA: Engineering Cartilage Tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 14;60(2):243-262.
19. Frisbie DD: Synovial Joint Biology and Pathobiology. In: Auer JA, Stick JA: *Equine Surgery*, 3ed, 2006. Saunders. Elsevier.
20. McCutchen C: The frictional properties of animal joints. *Wear* 1962;5:1.
21. van der Rest M, Garrone L: Collagen family of proteins, *FASEB J* 1991;5:2814-23.
22. Vachon AM, Keeley FW, McIlwraith CW, et al: Biochemical analysis of normal articular cartilage in horses, *Am J Vet Res* 1990;51:1905-1911.
23. Eikenberry EF, Mendler M, Burguin R, et al: Fibrillar organization in cartilage. In Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG et al, editors: *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, New York, 1992, Raven Press.
24. Akeson WH: Articular cartilage and its exacting characteristics: The benchmark for all attempts to achieve articular cartilage regeneration or repair. In Daniel DM, Pedowitz RA, O'Connor JJ, et al, editors: *Daniel's Knee injuries: Ligament and Cartilage Structure, Function, Injury and Repair*, ed 2, Philadelphia, 2003, Lippincott Williams & Wilkins.
25. Kiely CM, Whittaker SP, Grant ME, et al: Type VI collagen microfibrils: Evidence for a structural association with hyaluronan, *J Cell Biol* 1992;118:979-990.
26. McIlwraith CW: Use of synovial fluid markers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Vet J*. 2005;(5):473-482.
27. Skiöldebrand E, Heinegard D, Olofsson B, et al: Altered homeostasis of extracellular matrix proteins in joints of standardbred trotters during a long-term training programme. *J Vet Med*. 2006;53:445-449.
28. March L: Articular cartilage in health and disease. In Sambrook P, editor: *The musculoskeletal System*, New York, 2001, Churchill Livingstone.

29. Kim YJ, Sah RLY, Grodzinsky AJ, et al: Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behaviour: physical stimuli. *Arch Biochem Biophys*. 1994; 311:1-12.)
30. Wilkins RJ, Fairfax TP, Davies ME, et al: Homeostasis of intracellular Ca²⁺ in equine chondrocytes: response to hypotonic shock. *Equine Vet J*. 2003; 35(5):439-443.)
31. García A, Alfonso G, Ramón O, et al: Osteobiología: aspectos novedosos del tejido óseo y la terapéutica con el plasma rico en plaquetas. *Med UNAB*. 2007; (10);3:212-224.
32. Levick JR. Hypoxia and acidosis in chronic inflammatory arthritis; relation to vascular supply and dynamic effusion pressure. *J Rheumatol* 1990;17:579-582.
33. Bertone AL, Hardy J, Simmonds EJ, Muir WW. Vascular and trans-synovial forces of the stationary isolated joint. *Am J Vet Res* 1998;59(4):495-503.
34. Hardy J, Bertone AL, Muir WW. Local hemodynamics, permeability and oxygen metabolism of innervated or denervated isolated equine joints. *Am J Vet Res* 1998;59(10):1307-1316.
35. Bertone AL. Joint Physiology. In Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor JR, editors: *Equine Sports Medicine and Surgery*. 2004. Saunders. Elsevier.
36. Hardy J, Bertone AL, Muir WW. Joint pressure influences synovial blood flow as determined by colored microspheres. *J Appl Physiol* 1996;80:1225-1232.
37. Strand E, Martin GS, Crawford MP, et al. Intra-articular pressure and elastance of the equine metacarpophalangeal joint in health and disease. *Vet Surg* 1994;23:417.
38. Richman AI, Su EY, Ho G. Reciprocal relationship of synovial fluid volume and oxygen tension. *Arthritis Rheum* 1981;24:701-705.
39. Merry P, Williams R, Cox N, et al Comparative study of intra-articular pressure dynamics in joints with acute traumatic and chronic inflammatory effusions: potential implications for hypoxic-reperfusion injury. *Ann Rheum Dis* 1991;50:17-20.
40. Palmer J, Bertone AL. Joint biomechanics in the pathogenesis of traumatic arthritis. In: McIlwraith CW, Trotter G eds. *Joint disease in the horse*. Philadelphia PA: Saunders;1996:104-119.
41. Delahay JN: Biomechanics and biomaterials. In Wiesel SW, Delahay JN, editors: *Principles of Orthopaedic Medicine and Surgery*, Philadelphia 2001, WB Saunders.
42. Maroudas A, Ziv I, Weisman N, et al: Studies of hydration and swelling pressure in normal and osteoarthritic cartilage. *Biorheology* 1985;22:159-169.
43. Caron JP: Osteoarthritis. In Ross MW, Dyson SJ, editors: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*, Philadelphia, 2003, WB Saunders.

- 44.Kawcak CE, Fribie DD, McIlwraith CW, Norrdin RW, Park RD, James SD: The role of subchondral bone in joint disease: a review. *Equine Vet J* 2001;33:120-126.
- 45.Dumond H, Presle N, Terlain B, et al: Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48 (11):3118-3129.
- 46.Buff Pr, Dodss AC, Morrison CD, et al: Leptin in horses:Tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *J Anim Sci* 2002;80(11):2942-2948.
- 47.Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson B: Osteoarthritis: A Tale of Three Issues. *Bull NYU Hospital for Joint Diseases*. 2008;66(3):244-50.
- 48.Kuhn K, D´Lima DD, Hashimoto S, Lotz M: Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*.2004;12:1-16.
- 49.Martin JA, Brown TD, Heiner AD, Buckwalter JD: Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;(427 suppl):s96-103.
- 50.van ´t Hof RJ, Ralston SH: Nitric oxid and bone. *Inmunology*. 2001;103(3):255-61.
- 51.Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB: Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic agents. *Arthritis Rheum*. Jun 2001;44(6):1237-47.
- 52.Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis cartilage* 2006 May;14(5)403-12.
- 53.Walsh DA, Bonnet Cs, Turner EL, et al: Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Jul;15(7):743-51.
- 54.Billinghurst RC, O´Brian K, Poole AR et al: Inhibition of articular cartilage degradation in culture by a novel nonpeptidic matrix metalloproteinase inhibitor, *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:594-597.
- 55.Caron JP, Tardif G, Martel-PelletierJ, et al: Modulation of matrix metalloprotease 13 (collagenase 3) gene expression in equine chondrocytes by interleukine 1 and corticosteroids *Am J Vet Res* 1996,;57:1631-1634.
- 56.Scotto d´Abusco A, Calamis V, Cicione C, Grigolo B, Politi L, Scandurra R: Glucosamine affects intracelular signalling through inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in human chondrocytes. *Arthritis Res ans Ther*. 2007;9.
- 57.Arner EC, Pratta MA, Trzaskos JM, et al: Generation and characterization of aggrecanase: a soluble , cartilage-derived aggrecan-degrading activity. *J Biol Chem* 1999;274:6594.

58. Tang BL: ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 (1):33-34.
59. Wieland HA, Michaelis M, Kirshbaun BJ, et al: Osteoarthritis: an untreatable disease. *Nat Rev Drug Disc* 2005;4:331-334.
60. Tung JT, Arnold CE, Alexander LH, et al: Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin-1 β -stimulated matrix metalloproteinases 1, 3, and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. *Am J Vet Res* 2002;63(7):987-993.
61. Tchetina E, Di Battista J, Zukor D, Antoniou J, Poole R: Prostaglandin PGE2 at very low concentrations suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic articular cartilage: this involves a decrease in expression of proinflammatory genes, collagenases and COL10A1, a gene linked to chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(4).
62. Bertone AL, Palmer JL: Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. *Vet Surg* 2001;30(6):528-538.
63. Frean Sp, Bryant CE, Froling IL, et al: Nitric oxide production by equine articular cells in vitro. *Equine Vet J.* 1997. 29:98.
64. Martell-Pelletier J, Alaaeddine N, Pelletier JP: Cytokines and their role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Front Biosci* 1999;4:694-703.
65. Frisbie DD, McIlwraith CW: Evaluation of gene therapy as a treatment for equine traumatic arthritis and osteoarthritis. *Clin. Orthop* 2000.:S273-287.
66. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE: A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(5):403-12.
67. Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AL: Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89(5):672-85.
68. Fortier LA, Müller Bj, Cerione RA. The small G-protein Cdc42 is involved in insulin-like growth factor-I resistance in aging chondrocytes.
69. Martin JS, Ellerbrocke SM, Buckwalter JA. Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factors binding proteins. *J Orthop Res* 1997;15;491-98.
70. Bodo M, Carinci P, Baroni T, et al: Role of growth factor on extracellular matrix production by chick embryo fibroblast in vitro: antagonist effect of TGF-beta through the control of IL-1 and IL-1ra secretion. *Cytokine.* 1998;10(5):353-60.

71. Bodo M, Carinci P, Baroni T, et al: Interleukin pattern on Apert fibroblast in vitro. *Eur J Cell. Biol.* 1998;7(4):383-388.
72. Davidson E, Vitters E, LEM van Lent P, van de Loo F, van den Berg W, van der Kraan P: Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) stimulation point toward a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(5).
73. Hickey DG, Frenkel SR, Di Cesare PE. Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am J Orthop* 2003 Feb;32(2):70-6.
74. van den Berg WB, van der Kraan PM, Scharstuhl A, van Beningen HM. Growth factors and cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001 oct;(391 suppl):244-50.
75. Yaeger P, Masi TL, Buck JL, Binette F, Ross T, McPherson JM. Synergistic action of transforming growth factor- β and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Experimental Cell Res.* 1997;237;2;15 dec;318-25.)
76. Roman-Blas JA, Stokes DG: Modulation of TGF- β signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(12):1367-1377.
77. Baud, V; Karin, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 2001;11:372– 377.) (Roman-Blas, JA; Jimenez, SA. NF- κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14:839– 848.
78. Takahashi, N; Rieneck, K; van der Kraan, PM; van Beuningen, HM; Vitters, EL; Bendtzen, K; van den Berg, WB. Elucidation of IL-1/TGF- β interactions in mouse chondrocyte cell line by genome-wide gene expression. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:426–438.
79. Scharstuhl, A; van Beuningen, HM; Vitters, EL; van der Kraan, PM; van den Berg, WB. Loss of transforming growth factor counteraction on interleukin 1 mediated effects in cartilage of old mice. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:1095–1098.
80. Perrier S, Kherratia B, C Deschaumes C, Ughetto S, et al: IL-1ra and IL-1 production in human oral mucosal epithelial cells in culture: differential modulation by TGF- β 1 and IL-4. *Clin Exp Immunol.* 2002; 127(1):53–59.
81. Pozo MA, Balazs EA, Belmonte C: Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative. *Exp Brain Res* 1997;116:3-9.
82. Gomis A, Pawlak M, Schmidt RF, Belmonte C: Effects of elastoviscous substances on the mechanosensitivity of articular pain receptors. In *Proceedings Osteoarthritis Res Soc Int World Congress on Osteoarthritis*, sept 2001, Washington, DC, USA.

83. Frean SP, Lees P: Effects of polisulphated glycosaminoglycan and hyaluronan on prostaglandin E2 production by cultured synoviocytes. *Am J Vet Res.* 2000 ;61(5):499-505.
84. Aihara S, Murakami N, Ishii R, Kariya K, Azuma Y, Hamada K, Umemoto J, Maeda S: Effects of sodium hyaluronate on the nociceptive response of rats with experimental induced arthritis. *Nippon Yūgurigaku Zasshi* 1992; ;100:359-365.
85. Moore AR, Willoughby DA: Hyaluronan as a drug delivery system for diclofenec: a hypothesis for mode of action. *Int J Tissue React* 1995, 17:153-156.
86. Smith MM, Ghosh P: The synthesis of hyaluronic acid by human sinovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheum Int* 1987;7:113-122.
87. Comer JS, Kincaid SA, Baird AN, Kammermann JR, Hanson RR, Ogawa Y: Immunolocalization of stromelysin, tumor necrosis factor (TNF) alpha, and TNF receptors in atrophied canine articular treated with hyaluronic acid and transforming growth factor beta. *Am J Vet Res* 1996;57:1488-1496.
88. Ohno-Nakahara M, Honda K, Tanimoto K: Induction of CD44 and MMP expression by hyaluronidase treatment of articular chondrocytes. *J Biochem.* 2004. 135(5):567-575.)
89. Caron JP: Intra-Articular Injections for Joint Disease in Horses. *Vet Clin of North Am: Equine Practice.* 2005.21(3):559-573.)
90. Yasui T, Akatsuka M, Tobetto K, Umemoto J, Ando T, Yamashita K, Hayakawa T: Effects of hyaluronan on the production of stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in bovine articular chondrocytes. *Biomed Res* 1992;13:343-348.
91. Hirota W: Intra-articular injection of hyaluronic acid reduces total amounts of leukotriene C4, 6-keto-prostaglandin F1alpha, prostaglandin F2alpha and interleukin-1beta in sinovial fluid of patients with internal derangement in disorders of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;36:35-38.
92. Fukuda K, Oh M, Asada S, Hara F, Matsukawa M, Otani K, Hamanishi C.: Hyaluronic acid inhibits interleukin-1-evoked reactive oxygen species of bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:390-392.
93. Fukuda K, Takayama M, Ueno M, Oh M, Asada S, Kumano F, Tanaka S: Hyaluronic acid inhibits interleukin-1-induced superoxide anion in bovine chondrocytes. *Inflamm Res* 1997;46:114-117.
94. Phillips MW: Clinical trial comparison of intra-articular sodium hyaluronate products in the horse. *J Equine Vet Science.* 1989. (1):39-40.)

95. Dechant JE, Baxter GM, Frisbie GW, Trotter GW, McIlwraith CW: Effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulphate, alone and in combination, on normal and interleukin-1 conditioned equine articular cartilage explants metabolism. *Equine Vet J*. 2005; 37:227-231.)
96. Gwilym SE: Understanding pain in osteoarthritis. *J Bone and Joint Surg*. 2008; 90(3):280-287.)
97. Tobetto K, Nakai K, Akatsuka M, Yasui T, Ando T, Hirano S: Inhibitory effects of hyaluronan on neutrophil-mediated cartilage degradation. *Connect Tissue Res* 1993;29:181-190.
98. Levine JD, Clark R, Devor M, et al. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science*. 1984;226:547-549.)
99. Brain S, Cox H: Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. *Br J Pharmacology* 2006;147:202-211.
100. Caron JP, Bowker RM, Abhold RH, et al: Substance P in the sinovial membrane and fluid of the equine middle carpal joint. *Equine Vet J* 1992;24:364-366.
101. Sachs D, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH: Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. *Pain* 2002 Mar;96(1-2):89-97.
102. Cheng JK, Ji RR.: Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res*. 2008 Oct;33(10):1970-8.
103. Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, Wen YR, Zhang YQ. : Protein kinases as potential targets for the treatment of pathological pain. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;(177):359-89.
104. Hucho, T; Levine, JD. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron*. 2007;55:365-376.
105. Binshtok AM, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Vardh D, Shi L, Brenner GJ, Ji RR, Bean BP, Woolf CJ, Samad TA.: Nociceptors are interleukine sensors. *J Neurosci*. 2008 Dec 24;28(52):14062-73.
106. Proud CG.: mTORC1 signalling and mRNA translation. *Biochem Soc Trans*. 2009 Feb;37 (pt1):227-31.
107. Eskandari F, Webster JI, Sternberg E. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther*. 2003;5:251-265.)
108. Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum*. 2001;44:493-507).

109. Bonnet DS, Walsh DA: Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 2005;44(1):7-16.
110. Malfait AM, Malik AS, Marinova-Mutafchieva L, et al. The beta2-adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. *J Immunol* 1997.;159:6253-59.
111. Stein A, Yassouridis A, Szopko C. Intraarticular morphine versus dexametasone in chronic arthritis. *Pain*. 1999; 83:525-32.
112. Brown K, Heitmeyer S, Hoofkin E, et al: P38 MAPK inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with osteoarthritis. *J of Inflammation*. 2008; 5:22)
113. Bruyère O, Burlet N, Delmas PD, Rizzoli R, Cooper C, Reginster JY: Evaluation of symptomatic slow-action drugs in osteoarthritis using the GRADE system. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2008; 9:165.
114. Tulamo RM, Houttu J, Tupamaki A, et al: Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritides. *Am J Vet Res* 1996;57:932-937.
115. Denoix JM: *The equine distal limb: Atlas of clinical anatomy and comparative imaging*, Ames, 2000, Iowa State University Press.
116. Hunter W: Of the structure and diseases of articulating cartilages, *Philosof Trans* 1743;470:514-521
117. Steinert A, Ghivizzani S, Rethwilm A, et al: Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res and Thererapy*.2007;9:213.
118. Hurtig MB, Fretz PB, Doige CE, et al: Effects of lesión size and location on equine articular cartilage repair, *Can J Vet Res*, 1988;52:137-146.
119. Bütternova I, Bäumlér H, Kern F, et al: Release of WBC-derived IL-1 receptor antagonist into supernatants of RBCs: influence of storage time and filtration. *Transfusion* 2002;41:67-73.
120. Kluter H, Schlenke P, Muller-Steinhardt, Paulsen M, Kirchner H: Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion* 2003;37:362-367.
121. Stack G, Snyder EL: Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 2003 ;34:20-25.
122. Wadhwa M, Seghatchian J, Lubenko M, Contreras P, Dilger C, Bird R: Cytokine levels in platelet concentrates: quantitation by bioassays and immunoassays. *Br J Haematology* 2003 ;93:225-234.

- 123.Schröder AK, von der Ohe M, Fleischer D et al: Differential synthesis of two interleukin-1 receptor antagonist variants and interleukin-8 by peripheral blood neutrophils. *Cytokine*. 2005 7;32(5):246-53.
- 124.Zavadil DP, Satterle CC, Costigan JM, Holt DW, Shostrom VK. Autologous platelet gel and platelet-poor plasma reduce pain with total shoulder arthroplasty. *J Extra Corpor Technol* 2007;39(3):177-82.
- 125.Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Klepchick PR, Mooar PA. The efficacy of autologous platelet gel in pain control and blood loss in total knee arthroplasty. An analysis of the haemoglobin, narcotic requirement and range motion. *Int. Orthop* 2007 ;31(3):309-13.).
- 126.Sampson S, Gerhardt M: Platelet rich plasma injections grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2009.
127. Anitúa E, Sánchez M, Nurden AT, Zalduendo MM, de la Fuente M, Azofra J, Andía I: Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by sinovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology* 2007;46:1769-1772.
- 128.Oguchi T, Ishiguro N: Differential stimulation of three forms of hyaluronan synthase by TGF-beta, IL-1beta and TNF-alpha. *Connect Tissue Res* 2004;45:197-205.
129. Association of Equine Practitioners (AAEP). *Guide for Veterinary Service and Judging of equestrian Events: Definition and Classification of Lameness*. Lexington: AAEP.1991, p19.
130. Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M. Evaluation of Single and Double Tube Methods for Concentrating Equine Platelets. *Res Vet Science* 81 (2006)237-245.
- 131.Carmona JU,Argüelles D, Climent F. Report of the intraarticular treatment with platelet rich plasma in 7 horses with joint disease. In *Proceedings 14th ECVS Annual Meeting*. Lyon. France. 2005.

CAPÍTULO 3

BIOMARCADORES

3.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

ARTICULACIONES. OSTEOARTRITIS (OA)

Algunos estudios señalan que el 60% de las coxeras están relacionadas con la osteoartritis (OA)¹. La mayor parte de los conocimientos relacionados con el diagnóstico de la OA están fundamentados en las bases de datos radiológicas acumuladas a lo largo de muchos años. Sin embargo, con frecuencia, no existe una buena correlación entre la información diagnóstica que aportan las imágenes radiológicas y la situación real de la articulación osteoartrítica¹; lo mismo puede decirse respecto a los signos clínicos tradicionales². Las otras técnicas de diagnóstico por imagen también presentan limitaciones, ya sean de tipo económico, ergonómico o relacionadas con la sensibilidad intrínseca de la técnica. Se están realizando estudios para interpretar, trasponer o correlacionar los hallazgos obtenidos mediante la ultrasonografía y la resonancia magnética con los radiológicos³⁻⁷. Aún así, la artroscopía se mantiene como la técnica "gold standard" para diagnosticar y evaluar el estado real de una articulación, especialmente en lo que concierne al cartílago articular⁸.

Los biomarcadores constituyen otra vía de apoyo para el diagnóstico y el seguimiento de las artropatías⁹. En la articulación sana existe un equilibrio anabólico/catabólico. La alteración de este equilibrio está asociada a la patología articular e implica que determinadas sustancias originales, sus fragmentos o metabolitos, o aquellas moléculas que tienen un rol en los procesos metabólicos (citoquinas, proteasas y enzimas inhibidoras), están presentes en cantidades anormales, **indicando** que están inhibidos o sobreactivados determinados procesos de síntesis o degradación¹⁰.

Estos indicadores se pueden encontrar en el líquido sinovial si proceden del cartílago, menisco, ligamentos o membrana sinovial, y también en el torrente circulatorio (suero) y orina si proceden del hueso subcondral o se incorporan desde el líquido sinovial¹¹.

Los biomarcadores pueden clasificarse desde distintos puntos de vista. Como se ha dicho, pueden ser indicadores de **síntesis** o **degradación** y, a su vez, referirse al metabolismo del **hueso**¹², del **cartílago**, de la **membrana sinovial** o **mixtos**. Asimismo, pueden clasificarse en **directos** (sustancias originales y fragmentos o productos de degradación del colágeno tipo I, II o proteoglicanos) o **indirectos** (sustancias que intervienen en el metabolismo o integridad de estos tejidos: enzimas proteolíticas y sus inhibidores, factores de crecimiento y citoquinas catabólicas). En general, se puede decir que los biomarcadores indirectos resultan más útiles en el ámbito experimental^{11,13} que en el clínico, es decir, que cuando se trata de evaluar la importancia del daño del cartílago y definir el status de la articulación. Según sean las técnicas utilizadas en su determinación, se pueden clasificar en **bioquímicos** o **inmunológicos**; las técnicas bioquímicas permiten identificar, por ejemplo, fragmentos sulfatados de PG y GAGs; las técnicas inmunológicas son más sensibles en la identificación y cuantificación de componentes del hueso y cartílago, ya que se basan en el uso de

anticuerpos poli o monoclonales específicos para epitopos de fragmentos de moléculas que integran dichos tejidos (PGs, agregano, colágeno tipo I y II, COMP, etc)^{10,11}.

Los biomarcadores se pueden utilizar para: 1) detectar la lesión articular antes que los métodos convencionales; 2) clarificar los procesos patobiológicos de la articulación; 3) distinguir entre articulaciones afectadas y sanas y precisar el grado de degradación del cartílago articular; 4) monitorizar la respuesta al tratamiento; 5) pronosticar^{11,14}.

Se debe tener cuidado durante la interpretación clínica de los resultados, ya que la especificidad de tejido, la velocidad de metabolización y eliminación, las variaciones circadianas, la edad, el ejercicio y otros factores que afectan a los niveles de los biomarcadores se desconocen en buena parte¹⁴⁻²². Si no se especifica claramente qué es lo que detecta una determinada técnica analítica, se puede crear cierta confusión a la hora de interpretar algunos resultados. Así por ejemplo, no es lo mismo detectar la COMP íntegra (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) que fragmentos de la COMP, ya que una elevación o disminución de los valores puede indicar un proceso patológico o todo lo contrario²³.

Algunos de los biomarcadores mencionados, determinados en el suero o en el líquido sinovial, se han mostrado útiles en el diagnóstico de lesiones óseas y articulares^{8-11,14,24}.

TENDONES

Por lo que respecta a los tendones, el rango de biomarcadores disponibles es más reducido y la mayoría de los estudios se han centrado en la COMP^{16,26,31,33,38,46} y, en menor grado, en el PICP (propéptido de colágeno tipo I). Recientemente, se están estudiando otros posibles biomarcadores tales como el tenascin, el tenomodulin y el scleraxis (basic helix-loop-helix bHLH transcription factor), entre otros^{25,26}.

NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Recientemente, se ha abierto otra línea de investigación basada en la determinación de los niveles de la expresión génica correspondiente a distintos biomarcadores mediante DNA-MA (DNA microarrays). Por este procedimiento se confía poder descubrir nuevos biomarcadores, concretar su especificidad de tejido y cuantificar su expresión génica (a nivel de la transcripción) en las distintas situaciones de normalidad y enfermedad. Los primeros estudios realizados con cartílago equino resultan prometedores²⁷.

INFORMACIÓN BÁSICA SOBRE LOS BIOMARCADORES ENSAYADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO: GAGS, COMP Y ÁCIDO HIALURÓNICO.

GAGS

Los GAGs puede clasificarse dentro del grupo de biomarcadores directos del metabolismo del cartílago y se detectan mediante técnicas bioquímicas. El test con 1,9 DMMB (dimethyl methylene blue; azul de dimetilmetileno) identifica todos los GAGs sulfatados presentes en el

líquido sinovial y compara el resultado obtenido con una curva standard conocida de condroitin sulfato (CS)⁴⁷.

Se han detectado niveles incrementados de GAGs en el líquido sinovial de articulaciones con osteocondritis dissecans (OCD) y artritis traumáticas⁴⁸, en las articulaciones con lesiones agudas o crónicas definidas con parámetros clínicos y radiológicos y en articulaciones con lesiones del cartílago detectables mediante artroscopía pero sin sinovitis o cambios radiológicos⁴⁹. Algunos estudios indican que las concentraciones séricas de GAGs no se correlacionan con las concentraciones de GAGs en el líquido sinovial⁴⁹. Sin embargo, otros estudios consideran que los niveles de GAGs detectados tanto en el líquido sinovial como en el suero son indicadores útiles de los problemas articulares^{11,24,25}.

Existe una significativa correlación entre la concentración de GAGs y el recuento de leucocitos en el líquido sinovial⁴⁹. La migración de neutrófilos hacia la articulación inflamada y la subsiguiente liberación de citoquinas, enzimas proteolíticas y eicosanoides inducen alteraciones tanto en la matriz cartilaginosa como en la membrana sinovial. La activación de los condrocitos y sinoviocitos por estos mediadores de la inflamación genera un incremento de la actividad de síntesis de los condrocitos y también de los productos degradados. La acción de las metaloproteinasas degrada la proteína nuclear de los proteoglicanos cerca de su unión con el hialuronato, con lo que se escinden pequeños fragmentos de proteoglicanos con cadenas laterales de GAGs que difunden en el líquido sinovial. El incremento de síntesis de GAGs como respuesta al estímulo inflamatorio junto a la dificultad de que los GAGs puedan ser retenidos en la matriz, puede explicar el incremento de su concentración en el líquido sinovial⁴⁹.

COMP

Esta proteína no colágena de la familia de las trombospondinas fué descrita por primera vez en 1992²⁸. La molécula de COMP es una proteína pentamérica compuesta por cinco subunidades, a modo de brazos radiales, enlazadas por puentes disulfuro y con un peso molecular de 435 kDa (humano)²⁹ y 512 kDa (equino)³⁰. Inicialmente, la COMP fue hallada en el cartílago, pero también se ha encontrado en tendones y membranas sinoviales^{31,32}. Funcionalmente, COMP interviene en la formación de fibrillas mediante el engarce y asociación de moléculas de colágeno mediante los extremos de su molécula³³. La COMP también puede interactuar con moléculas no colágenas como la fibronectina y agregan apoyando interacciones en el medio de la matriz extracelular (MEC)³⁴. La asociación de la COMP con el precursor de la granulina-epitelina, que estimula la proliferación de condrocitos³⁵, hace pensar que pueda tener un papel en la relación células-MEC.

La COMP puede clasificarse como un biomarcador directo del metabolismo del cartílago y se detecta mediante técnicas inmunológicas (anticuerpos poli o monoclonales; ELISA sándwich; Western blot). Los fragmentos de la COMP son biomarcadores de degradación. En medicina humana se considera que probablemente sea el único biomarcador con sensibilidad

predictiva de la pérdida de cartílago y que guarda una buena correlación con los hallazgos puestos en evidencia por la resonancia magnética³⁶.

En condiciones normales, se considera que la mayor parte de la COMP presente en el líquido sinovial está íntegra, mientras que en el suero se encuentra fragmentada³⁷. Se ha documentado que cuando la matriz cartilaginosa articular se degrada debido a un proceso patológico, se producen fragmentos de la COMP que se difunden hacia el líquido sinovial y el torrente circulatorio³⁷, por lo que puede detectarse en líquido sinovial, suero³⁸ y orina³⁹. Se estima que la vida media de la COMP sérica humano es de 7,4 horas¹⁹. Existen técnicas analíticas enfocadas a la detección de la COMP íntegra y otras para detectar fragmentos. Si no se tiene en cuenta este hecho, se puede crear cierta confusión al estudiar las conclusiones de los diversos trabajos científicos que se han realizado para determinar la utilidad de la COMP como biomarcador del cartílago y al asignar un significado clínico a los resultados obtenidos en caballos⁴⁰⁻⁴³. Un estudio determinó la utilidad de la detección de fragmentos de la COMP en caballos mediante la utilización de anticuerpos monoclonales con gran afinidad por la COMP degradada, concluyendo que las articulaciones afectadas presentaban unos niveles más altos de COMP fragmentada y que este procedimiento resulta útil para el estudio de la OA equina⁴⁴. La utilización de nuevos anticuerpos monoclonales específicos para epitopos de pequeños fragmentos de la COMP en combinación con la técnica de sándwich ELISA, se muestra como una técnica útil para la detección de la COMP degradada, tanto en líquido sinovial como en el suero, en caballos con OA⁴⁵.

Los niveles séricos de la COMP pueden estar influenciados también por la edad, ejercicio y por la COMP procedente de los tejidos blandos. Los caballos más jóvenes presentan niveles séricos más altos de COMP⁴⁶. Parece ser que, dentro de un mismo grupo de edad, las tendinitis localizadas en zonas sin vainas tendinosas no tienen un reflejo significativo en los niveles séricos de la COMP⁴⁶; sin embargo, los niveles de la COMP en las vainas tendinosas digitales aumentan cuando en ellas se localiza una lesión tendinosa o séptica⁴⁶. Por lo tanto, se considera que los niveles séricos de la COMP son más representativos del estado de las articulaciones que de las tendinitis⁴⁶.

ÁCIDO HIALURÓNICO (AH)

Este glicosaminoglicano no sulfatado, compuesto de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, se encuentra a medio camino entre un biomarcador directo e indirecto; se detecta mediante técnicas inmunológicas (sándwich ELISA). Aunque el AH se encuentra en la matriz del cartílago, este tejido constituye una fuente de HA muy pequeña si se compara con la síntesis de HA por los sinoviocitos. Si la membrana se inflama se produce un incremento de secreción de HA en la membrana y los tejidos de alrededor, más que en el propio espacio intraarticular. Según esto, los niveles plasmáticos de HA están mayormente participados por la aportación de la membrana sinovial y esto convierte a este biomarcador en un indicador casi único del "status" de la membrana. Ello no significa que los niveles plasmáticos de HA no sean indicativos de lesión articular; de hecho, se han correlacionado con el grado de

progresión radiológica de la enfermedad articular, con la osteoartritis y artritis reumatoide en humanos^{50,51}.

En el caso de los caballos, los estudios realizados ponen de relieve algunos hechos que dificultan la correlación de las concentraciones de HA presentes tanto en el líquido sinovial como en el suero con el status real de la articulación. De una parte, la efusión sinovial que puede acontecer durante la inflamación puede tener un efecto diluyente de la concentración real de HA; de otra parte, la degradación del HA por las hialuronidasas y radicales superóxido puede disminuir la eficiencia funcional del HA sin que por ello disminuya la concentración total de HA en el líquido sinovial; por último, algunos estudios indican que no existe una correlación entre la concentración de GAGs y HA en el líquido sinovial⁴⁹ ni entre la concentración de HA y el grado de enfermedad articular^{23,49}.

En condiciones normales y según los métodos analíticos empleados, se obtienen valores en la concentración de HA que varían entre 29 y 760 ng/ml en el plasma y entre 0,25 y 0,48 mg/ml en el líquido sinovial⁵². El peso molecular del HA endógeno en los caballos varía entre $1-10 \times 10^6$.^{53,54} La vida media plasmática del HA endógeno se ha estimado en 15-90 minutos y la producción media diaria de HA es de unos 65mg (33-164 mg) por caballo (114 µg/kg p.v /24h)⁵². Tras la administración vía intravenosa de 37,8 mg de hialuronato sódico (Hyonate®), la concentración plasmática recupera su nivel basal a las 3 horas. La vida media del hialuronato sódico (Hyonate®) administrado intraarticularmente es de unas 5 horas y la concentración en el líquido sinovial vuelve a los niveles basales a las 24 horas de la administración; se ha calculado que para una articulación con una capacidad de 30 ml el aclaramiento es de unos 4 ml/hora⁵². La eliminación se produce a través de la membrana sinovial y los vasos linfáticos; la degradación metabólica se produce en la misma membrana y en el hígado^{53,54}.

OBJETIVOS

Existen pocos estudios que utilicen los biomarcadores para monitorizar los efectos o los resultados de los tratamientos de las lesiones musculoesqueléticas en los caballos⁵⁵. En el presente trabajo se pretende monitorizar la respuesta al tratamiento con PRP de lesiones de los tejidos blandos y articulaciones mediante la utilización de tres biomarcadores: la COMP, los GAGs y el ácido hialurónico.

3.2 ESTUDIOS CLÍNICOS

ARTICULACIONES Y TEJIDOS BLANDOS

MATERIAL Y MÉTODOS

GRUPOS DE PACIENTES

Se trataron un total de 17 caballos de deporte que se dividieron en tres grupos según la estructura anatómica lesionada. Grupo 1: integrado por 6 caballos (5 trotadores y 1 de salto) lesionados con tendinitis agudas del tendón flexor digital superficial (TFDS), de 12 ± 5 días de antigüedad, de distinto grado ultrasonográfico (entre Cat IV y VI)⁵⁶ y sin afectación de las vainas sinoviales. Grupo 2: compuesto por 4 caballos (2 de salto y 2 de silla), lesionados con tenosinovitis a nivel de la articulación metacarpo falangiana. Grupo 3: incluye 7 caballos (5 trotadores, presentando 4 articulaciones metacarpofalangianas y 1 femoro-tibio-rotuliana afectadas; 1 de salto, presentando 1 articulación femoro-tibio-rotuliana afectada; y 1 de doma, presentando 1 articulación tarsocrural afectada). En el examen radiológico de las articulaciones se descartaron algunos de los signos clásicos de la OA (osteofitos periarticulares, lisis o esclerosis del hueso subcondral), aunque se observaron otros como una leve disminución del espacio intraarticular, fragmentación osteocondral o indicios de remodelación ósea.

De cada paciente se obtuvieron varias muestras de suero (durante días consecutivos o alternos) y de líquido sinovial para establecer los niveles basales de la patología en curso. Posteriormente, se administró la dosis de PRP vía intratendinosa, intrasinovial o intraarticular según se tratase de los grupos 1,2 ó 3, respectivamente. A las 24 horas se inició la obtención de muestras de suero, que se continuó a días alternos. Algunos caballos recibieron una segunda dosis a los 15 ± 2 días de la primera y, a continuación se reanudó la toma de muestras de suero siguiendo la misma pauta. De esta forma y en total, de los 6 caballos del grupo 1 se obtuvieron 6 muestras de sueros para establecer los niveles séricos basales, se administraron 11 dosis de PRP y se obtuvieron 46 muestras de sueros para evaluar sus efectos; de los 4 caballos del grupo 2 se obtuvieron 4 muestras de sueros para establecer los niveles basales, se administraron 8 dosis de PRP (2 a cada caballo) y se obtuvieron 60 muestras de suero para evaluar los efectos; finalmente, de los 7 caballos del grupo 3 se obtuvieron 7 muestras de suero para determinar niveles basales, se administraron 10 dosis de PRP intraarticulares y se tomaron 34 muestras de suero para evaluar sus efectos.

GRUPOS DE CONTROLES

Se establecieron dos grupos de controles, positivos y negativos. El grupo 4 (controles positivos), constituido por 2 caballos trotadores que presentaban lesiones agudas del TFDS (categorías ultrasonográficas IV y V), de 8 ± 2 días de antigüedad, sin afectación de la vaina tendinosa, no recibió ningún tratamiento médico. Y el grupo 5 (controles negativos), integrado por 7 caballos sanos (6 trotadores y 1 de salto).

De los 2 caballos del grupo 4 se obtuvieron 14 muestras de suero a intervalos de 3 ± 1 días para determinar los niveles de COMP y GAGs. De los 7 caballos sanos del grupo 5 se obtuvieron 14 muestras de sueros y 8 muestras de líquido sinovial para determinar los

valores basales de COMP, GAGs y AH en suero y líquido sinovial. A continuación, el grupo 5 se subdividió en un subgrupo de 4 caballos y se les administró un volumen de 10 ml de solución fisiológica estéril en una articulación tarsocrural y al día siguiente se inició el muestreo de sueros, que se continuó a días alternos y durante 15 días; las muestras de líquido sinovial se recogieron cada 3 ± 1 días durante los mismos 15 días. Al segundo subgrupo de 3 caballos se les administró una dosis de 10 ml de PRP en la articulación tarsocrural y a las 24 horas se inició el muestreo de sueros y líquido sinovial siguiendo la pauta mencionada. Transcurridos 3 meses, a los 4 caballos que recibieron las dosis de solución salina estéril se les administraron sendas dosis de 10 ml de PRP en la articulación tarsocrural y se procedió con la misma pauta de muestreo de sueros y líquido sinovial, previa determinación de los niveles basales en suero y líquido sinovial.

Todas las muestras recogidas de suero y líquido sinovial se colectaron en tubos Vacutainer® estériles, sin aditivos, se centrifugaron para eliminar restos celulares y se congelaron a -25°C durante el periodo de recogida de muestras. Posteriormente se conservaron a -70°C hasta la realización de los correspondientes análisis.

Para minimizar las fluctuaciones de los biomarcadores debidas al ejercicio, todos los caballos de los 5 grupos se mantuvieron en reposo.

PREPARACIÓN DEL PRP

El PRP se preparó según el método de tubo y doble centrifugación³, obteniendo 100 ml de sangre de forma aséptica de la vena yugular mediante una palomilla 16G (Braun) y depositándola en tubos al vacío, estériles, de 5 ml., conteniendo citrato sódico al 3,2 %. A continuación los tubos se centrifugan a 120g durante 5 minutos. En condiciones asépticas, se aspira el 50% de la columna de plasma que está adyacente a la capa leucocitaria. El plasma obtenido se vuelve a centrifugar a 240g durante 5 minutos y se recupera el 25% de la columna de plasma adyacente al sedimento y éste mismo. Esta última fracción, contenida en jeringas estériles, se activa con cloruro cálcico (4.5mEq/5ml) adicionando 50 μl / 1 ml PRP. Se realizó un recuento plaquetario de las muestras de sangre obtenidas.

DETERMINACIONES ANALÍTICAS. TÉCNICAS UTILIZADAS Y ANÁLISIS DE FACTORES QUE PUEDEN INFLUENCIAR LOS RESULTADOS.

DETERMINACIÓN DE LOS GAGS

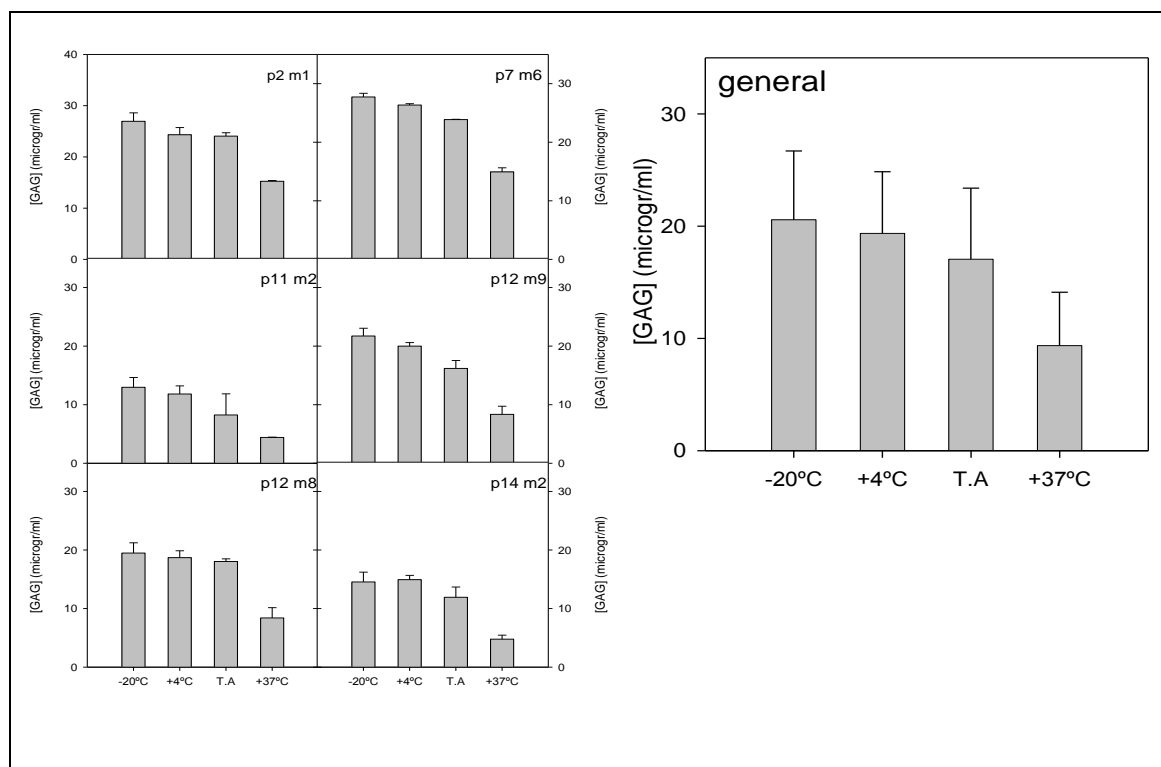
Para la determinación de los GAGs se utilizaron como estándar diferentes concentraciones de condroitin-6-sulfato (C4384, Sigma Aldrich. Madrid.España) en un rango de 0-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para obtener la curva patrón (ver figura 3). Para la realización del test se dispusieron, por duplicado, 50 μl de los estándares y de las muestras en una placa de 96 pocillos (Nunc-F, Labclinics, Barcelona, España), se añadieron 200 μl de 1.9 dimetil-metileno (341088, Sigma Aldrich. Madrid. España). Tras una agitación suave, la lectura de la absorbancia se realizó a 531 nm en un lector multiplaca Victor 3 (Perkin-Elmer. Madrid. España).

ESTUDIO DE TERMOLABILIDAD DE LOS GAGS

Debido a que esta prueba analítica es de tipo bioquímico y al amplio rango de valores que se pueden obtener, se realizaron unas pruebas para determinar la termolabilidad de los GAGs y cómo ésta podía afectar a su concentración dependiendo de las condiciones de temperatura y tiempo de transporte de las muestras al laboratorio y de las condiciones ambientales en el propio laboratorio. Para ello se eligieron al azar 6 muestras de sueros y se determinó la concentración de GAGs inmediatamente después de la descongelación y a las 24 horas después de mantenerlas a +4°C, temperatura ambiente (TA) y a 37°C.

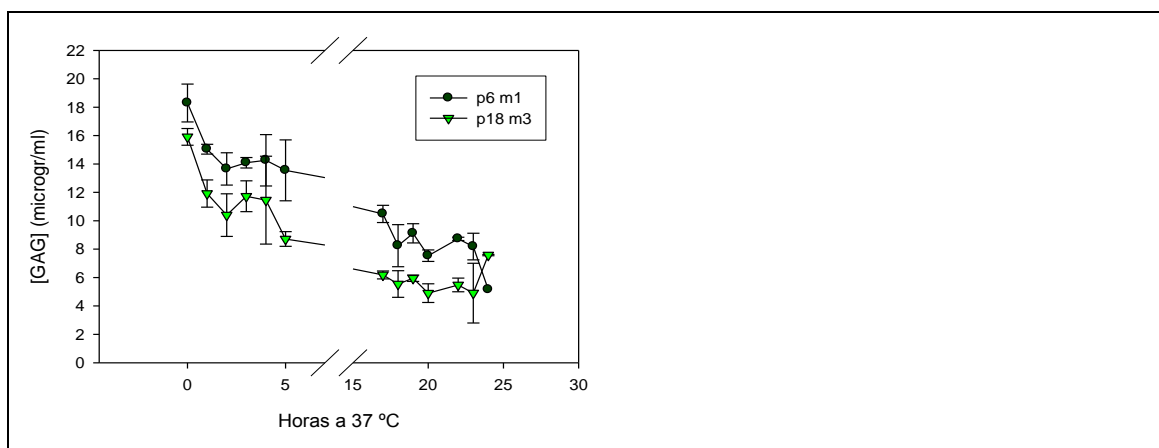
En la figura 1 se pueden observar a la izquierda los resultados de las 6 muestras de sueros independientes analizadas y a la derecha, la gráfica que recoge todos los datos conjuntos. Entre una muestra analizada inmediatamente después de la descongelación y otra descongelada y mantenida a +4°C durante 24 horas no hay diferencias en el contenido de GAGs. En las muestras mantenidas a TA se observa un pequeño descenso de los GAGs, que resulta muy evidente en las muestras mantenidas a 37°C.

Fig.1



A continuación, se realizó otro experimento con 2 muestras de suero para determinar la cinética de degradación de los GAGs mantenidos a 37°C. La figura 2 muestra que al cabo de una hora a 37°C ya se ha degradado el $21 \pm 5,15\%$ de los GAGs totales.

Fig.2



DETERMINACIÓN DE LA COMP

Para cuantificar la COMP se utilizó una técnica directa de tipo ELISA sandwich (comercializada COMP® ELISA. Anamar Medical. Gothenburg. Sweden), siguiendo las indicaciones del fabricante y en la que dos anticuerpos monoclonales son dirigidos contra determinantes antigénicos separados de la molécula COMP. Se incuban 25 µl de los estándares, de los controles y de las muestras, durante 2 horas con un anticuerpo de detección anti-COMP, conjugado con peroxidasa, en agitación constante en una placa de ELISA revestida con un anticuerpo de captura anti-COMP conjugado con peroxidasa. Después de realizar 6 lavados, se añade el substrato tetra-metil-bencidina (TMB) y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detiene añadiendo a cada pocillo 50 µl de ácido sulfúrico 0,5M. Finalmente, se procede a la lectura de la absorbancia a 450 nm en un lector multiplaca Victor 3 (Perkin-Elmer. Madrid. España). Previamente, se determinó la curva patrón (Ver figura 3).

DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO (AH)

Para cuantificar el AH se utilizó una técnica directa de tipo ELISA sandwich (comercializada DuoSet. R&D Systems Europe Ltd. Abingdon. UK.), siguiendo las indicaciones del fabricante y en la que dos anticuerpos monoclonales son dirigidos contra determinantes antigénicos separados de la molécula de hialuronano. El anticuerpo de captura (agrecan) es absorbido en las placas de poliestireno (Maxisorp-NUNC, Labclinics. Barcelona. España) en un tampón carbonatado 0,1M durante toda la noche a 4°C. Los pocillos sobrantes de la placa se bloquean incubándolos con 200 µl/pocillo de PBS 0,05% Tween-20 con 0,05% NaNO₃ durante 1 hora a 37°C. Se añaden los estándares y las muestras, 100 µl/pocillo a las

diluciones apropiadas, y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS 0,05% Tween-20, se añade el anticuerpo de detección (anti-AH biotinilado) y se incuba 2 horas a 37°C; a continuación se elimina el anticuerpo no unido mediante 2 lavados con PBS 0,05% Tween-20 y se añaden 100 µl/pocillo de estreptavidina-peroxidasa durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez realizados los lavados con PBS 0,05% Twenn-20, se añade el substrato OPD (Sigma Aldrich. Madrid. España) y se detiene la reacción enzimática a los 30 minutos añadiendo 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2N. Finalmente, se procede a la lectura de la absorbancia a 450 nm en un lector multiplaca Victor3 (Perkin-Elmer. Madrid. España). Previamente, se determinó la curva patrón (Ver figura 3).

CURVAS PATRÓN

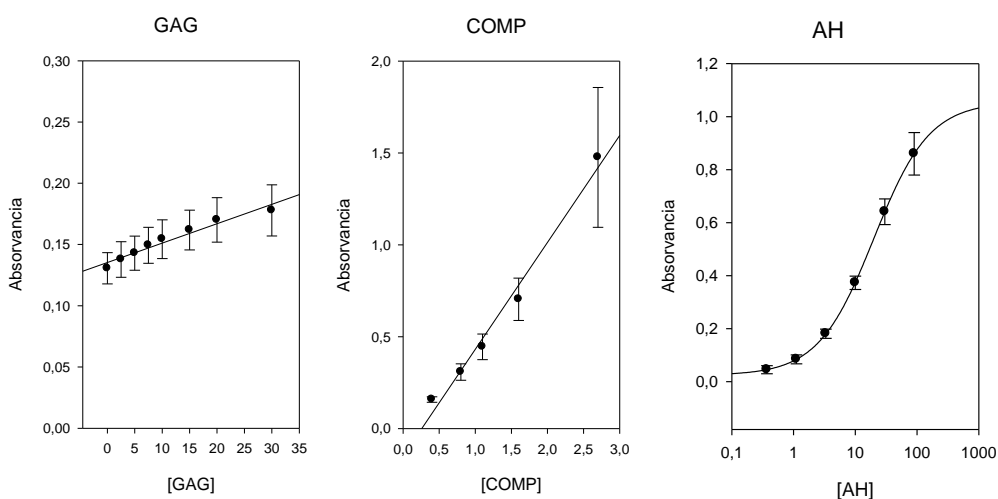


Figura 3. Patrones utilizados para los biomarcadores. Medida a 531 nm (GAGs), 450 nm (COMP y AH)

INFLUENCIA DEL EJERCICIO Y LA EDAD EN LOS NIVELES DE GAGs Y COMP

Son conocidas las posibles fluctuaciones en los valores de estos biomarcadores como consecuencia del ejercicio y de la edad, por lo que todos los caballos se mantuvieron en reposo durante el periodo de muestreo. En lo que concierne a la edad se analizó su posible influencia distribuyendo la totalidad de las muestras por edades, resultando que no se aprecia ninguna diferencia atribuible a la edad sobre la concentración de GAGs y una posible mínima influencia sobre la COMP (Ver figura 4).

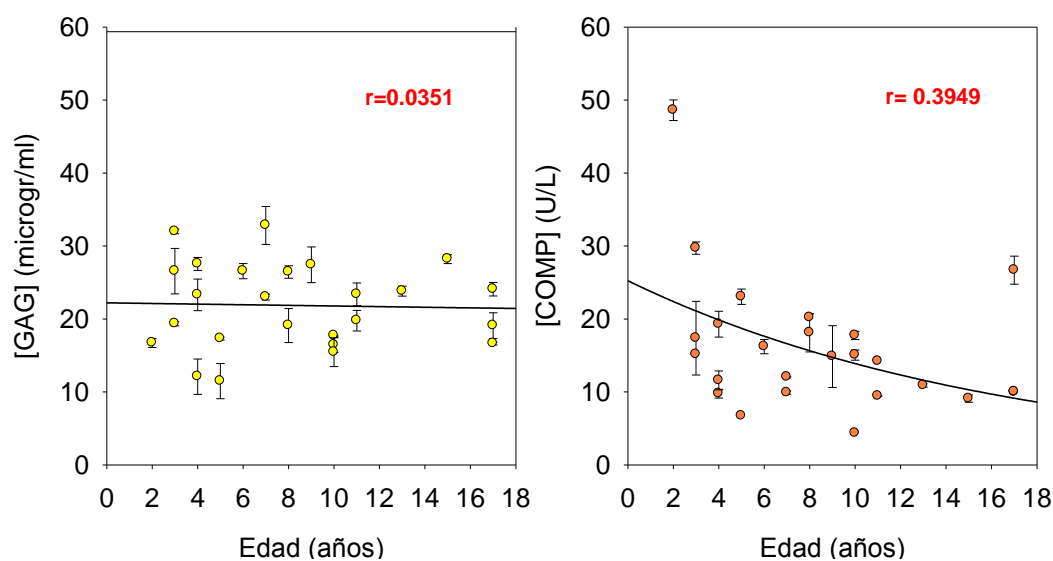


Figura 4. Posible influencia de la edad sobre las [GAGs] y [COMP] según la edad de los caballos de la muestra.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio estadístico entre grupos con una distribución normal se realizó mediante test paramétricos T-test para muestras independientes y Paired T-test para muestras dependientes; entre grupos con una distribución anormal se utilizó el test Wilcoxon para muestras dependientes y Kruskal-Wallis para las independientes, mediante el software SPSS ver 14.0; parte de los gráficos se han realizado con el software SigmaPlot ver 10.0. Se consideró significativo un $p < 0,05$.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE LOS GAGS EN SUERO Y LÍQUIDO SINOVIAL

A) Determinación de los niveles basales de GAGs en las distintas situaciones clínicas (grupos controles y lesionados). (Ver figs. 5 y 6)

Se determinaron los niveles basales de GAGs séricos (S) y en el líquido sinovial (LS) para las distintas situaciones clínicas (grupos), resultando las siguientes concentraciones de GAGs (medias \pm SD): caballos sanos, I grupo 5 (S= $18,04 \pm 2,27$ $\mu\text{g/ml}$; LS= $25,55 \pm 7,07$ $\mu\text{g/ml}$), con tendinitis agudas del TFDS del grupo 1 (S= $23,72 \pm 5,91$ $\mu\text{g/ml}$), con tenosinovitis del grupo 2 (S= $24,05 \pm 0,75$ $\mu\text{g/ml}$), con OA del grupo 3 (S= $22,2 \pm 7,24$ $\mu\text{g/ml}$). Los resultados del análisis de las muestras de sueros de los controles positivos, grupo 4 (tendinitis sin tratamiento), mostraron unas concentraciones séricas de GAGs estables ($26,5 \pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$) a lo largo del tiempo controlado y que permanecieron dentro del rango del grupo 1. (fig. 6)

B) Determinación del efecto de la administración intraarticular de suero salino fisiológico sobre la concentración de GAGs en caballos sanos. (Ver figs. 5 y 7)

Al analizar las muestras de sueros y líquidos sinoviales recogidas tras la administración de 1 dosis de 10 ml de suero salino fisiológico en las articulaciones tarsocrurales del grupo de caballos sanos (grupo 5) se obtuvieron las siguientes concentraciones de GAGs (medias \pm SD): S= $18,1 \pm 5,11$ $\mu\text{g/ml}$ y LS= $35,20 \pm 9,47$ $\mu\text{g/ml}$.

C) Determinación del efecto de la administración intraarticular de una dosis de PRP sobre la concentración de GAGs en caballos sanos (Ver figs. 5 y 7)

Al analizar las muestras de sueros y líquidos sinoviales recogidas tras la administración de 1 dosis de 10 ml de PRP en las articulaciones tarsocrurales del grupo de caballos sanos (grupo 5) se obtuvieron las siguientes concentraciones de GAGs (medias \pm SD): S= $22,14 \pm 5,03$ $\mu\text{g/ml}$ y LS= $51,09 \pm 18,40$ $\mu\text{g/ml}$.

D) Determinación del efecto de la administración local de una dosis de PRP sobre la concentración de GAGs en caballos lesionados. (Ver figs. 5 y 8).

Al analizar las muestras de sueros recogidas tras la administración local de 1 dosis de PRP a los caballos lesionados, se obtuvieron las siguientes concentraciones séricas de GAGs (medias \pm SD) en el grupo 1 con lesiones tendinosas ($27,67 \pm 8,39$ $\mu\text{g/ml}$), en el grupo 2 con tenosinovitis ($34,28 \pm 2,05$ $\mu\text{g/ml}$) y en el grupo 3 con lesiones osteoartísticas ($25,83 \pm 6,48$ $\mu\text{g/ml}$).

E) Análisis estadístico (ver Figs. 5,7 y 8).

Al comparar los niveles basales de GAGs séricos entre los caballos sanos y los distintos grupos con lesiones, se obtienen valores que denotan diferencias significativas en la concentración de GAGs con respecto al grupo 1 con tendinitis ($p < 0,004$), al grupo 2 con tenosinovitis ($p < 0,0001$) y al grupo 3 con lesiones osteoartísticas ($p < 0,06$).

El análisis estadístico de los resultados en el grupo 5 de caballos sanos pone de manifiesto que, en relación a las concentraciones basales de GAGs presentes en el suero y en el líquido sinovial, la administración intraarticular de suero fisiológico salino no produce un incremento significativo de GAGs séricos ($p < 0,99$) ni en el LS ($p < 0,11$), pero sí es significativo el incremento inducido en el suero ($p < 0,003$) y en el LS ($p < 0,0003$) tras la administración de una dosis de PRP.

El análisis estadístico de los resultados en los distintos grupos de caballos lesionados evidencia que, en relación a las concentraciones basales de GAGs séricos propias de cada grupo, la administración local de PRP no produce un incremento significativo de GAGs séricos en el grupo 1 con tendinitis ($p < 0,28$), pero sí es significativo el incremento en el caso del grupo 2 con tenosinovitis ($p < 0,0005$) y grupo 3 con OA ($p < 0,002$).

Fig. 5 Niveles de GAGs en suero.
 Respuesta al PRP en distintas situaciones clínicas.

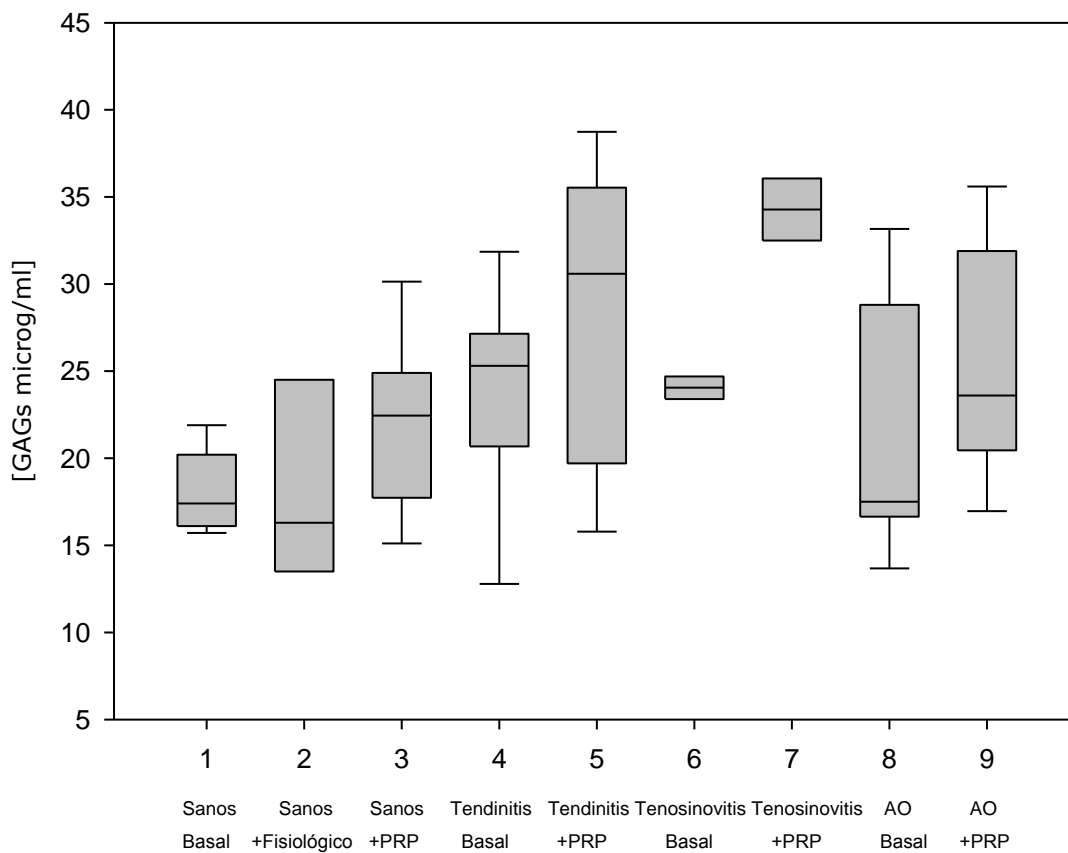


Fig. 6 Caso control. Tendinitis aguda sin tratamiento
 [GAGs] y [COMP] en suero

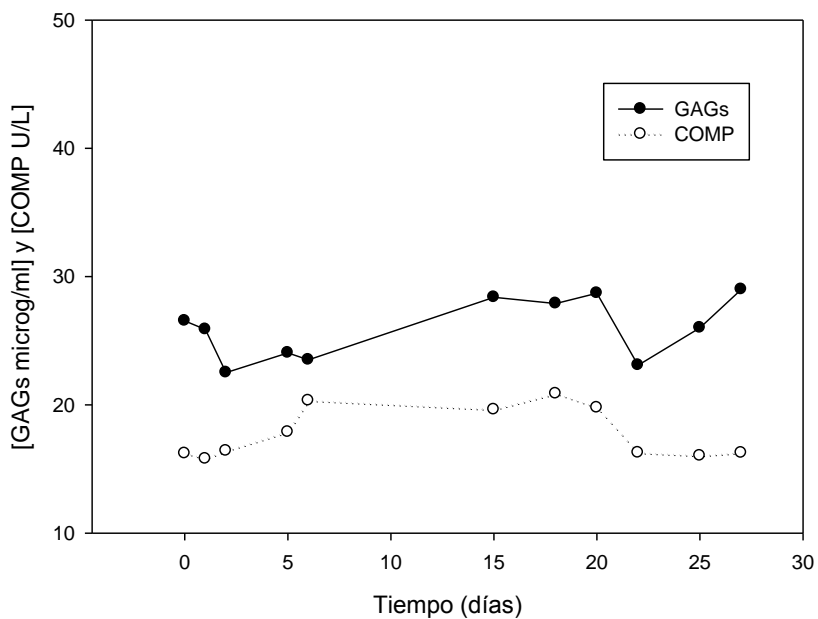


Fig. 7 Niveles de GAGs en líquido sinovial
Efecto del S.Fisiol. y PRP en articulaciones sanas

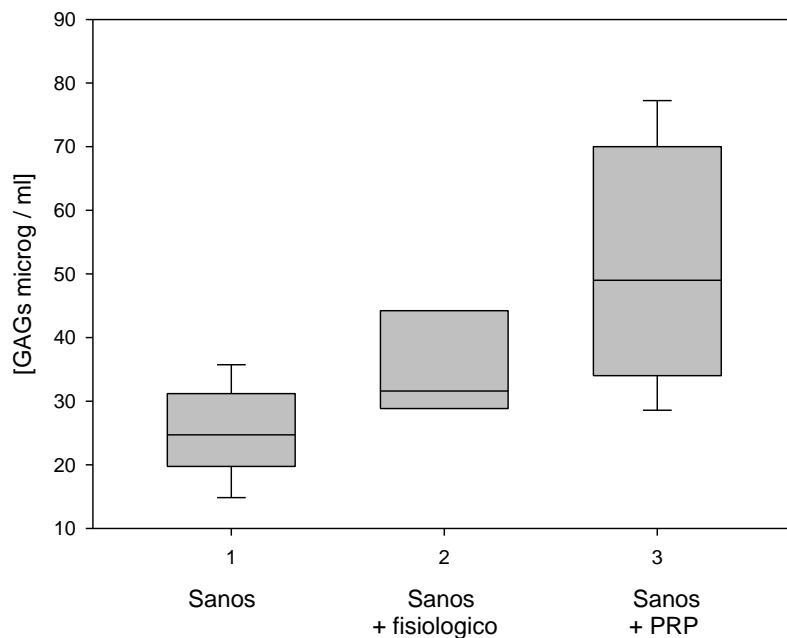
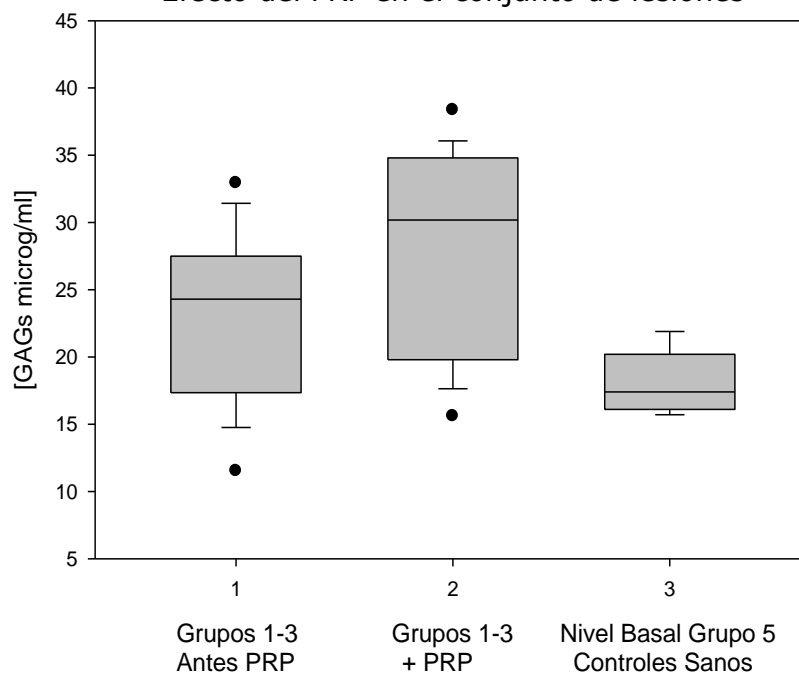


Fig. 8 Niveles de GAGs en sueros
Efecto del PRP en el conjunto de lesiones



A) Determinación de los niveles basales de COMP en las distintas situaciones clínicas (grupos controles y lesionados). (Ver figs. 6 y 9)

Se determinaron los niveles basales de COMP séricos (S) y en el líquido sinovial (LS) para las distintas situaciones clínicas (grupos), obteniéndose las siguientes concentraciones de COMP (medias \pm SD): caballos sanos del grupo 5 (S= 13,31 \pm 2,67 U/L; LS=22,18 \pm 6,46 U/L), con tendinitis agudas del TFDS del grupo 1 (S= 13,98 \pm 4,28 U/L), con tenosinovitis del grupo 2 (S= 26,65 \pm 1,55 U/L), con OA del grupo 3 (S= 37,70 \pm 10,88 U/L). Los resultados del análisis de las muestras de sueros de los controles positivos, grupo 4 (tendinitis sin tratamiento), mostraron unas concentraciones séricas de COMP estables (17,07 \pm 2,07 U/L) a lo largo del tiempo controlado y que permanecieron dentro del rango del grupo 1. (Fig.6)

B) Determinación del efecto de la administración intraarticular de suero salino fisiológico sobre las concentraciones de COMP en caballos sanos. (Ver fig. 9 y 10)

Al analizar las muestras de sueros y líquidos sinoviales recogidas tras la administración de 1 dosis de 10 ml de suero salino fisiológico en las articulaciones tarsocrurales del grupo de caballos sanos (grupo 5) se obtuvieron las siguientes concentraciones de COMP (medias \pm SD): S= 15,37 \pm 5,58 U/L y LS= 24,57 \pm 5,85 U/L.

C) Determinación del efecto de la administración intraarticular de una dosis de PRP sobre las concentraciones de COMP en caballos sanos (Ver figs. 9 y 10)

Al analizar las muestras de sueros y líquidos sinoviales recogidas tras la administración de 1 dosis de 10 ml de PRP en las articulaciones tarsocrurales del grupo de caballos sanos (grupo 5) se obtuvieron las siguientes concentraciones de COMP (medias \pm SD): S= 13,42 \pm 4,21 U/L y LS= 24,27 \pm 6,16 U/L.

D) Determinación del efecto de la administración local de una dosis de PRP sobre las concentraciones de COMP en caballos lesionados. (Ver figs. 9 y 11).

Al analizar las muestras de sueros recogidas tras la administración de 1 dosis de PRP, se obtuvieron las siguientes concentraciones de COMP (medias \pm SD) en el grupo 1 con lesiones tendinosas (11,71 \pm 2,05 U/L), en el grupo 2 con tenosinovitis (14,65 \pm 0,17 U/L) y en el grupo 3 con lesiones osteoartísticas (19,98 \pm 7,43 U/L).

E) Análisis estadístico (Ver Figs. 6, 9, 10 y 11)

Al comparar los niveles basales de COMP séricos entre los caballos sanos y los distintos grupos con lesiones, se obtienen valores que no denotan diferencias significativas con respecto al grupo 1 con tendinitis ($p < 0,64$), pero sí respecto al grupo 2 con tenosinovitis ($p < 0,000002$) y al grupo 3 con lesiones osteoartísticas ($p < 0,0000001$).

El análisis estadístico de los resultados en el grupo 1 de caballos sanos pone de manifiesto que, en relación a las concentraciones basales de COMP sérico y del líquido sinovial, la

administración intraarticular de suero fisiológico salino no produce una variación significativa de COMP sérico ($p < 0,40$) ni en el LS ($p < 0,86$); tampoco se observan variaciones significativas a nivel sérico ($p < 0,93$) y del LS ($p < 0,15$) tras la administración de una dosis de PRP.

El análisis estadístico de los resultados en los distintos grupos de caballos lesionados pone de manifiesto que, en relación a las concentraciones basales de COMP séricas propias de cada grupo, la administración local de PRP produce una disminución significativa de COMP sérico en el grupo 1 con tendinitis ($p < 0,018$), en el grupo 2 con tenosinovitis ($p < 0,0008$) y en el grupo 3 con OA ($p < 0,0002$).

Fig. 9. Niveles de COMP en suero
Respuesta al PRP en distintas situaciones clínicas

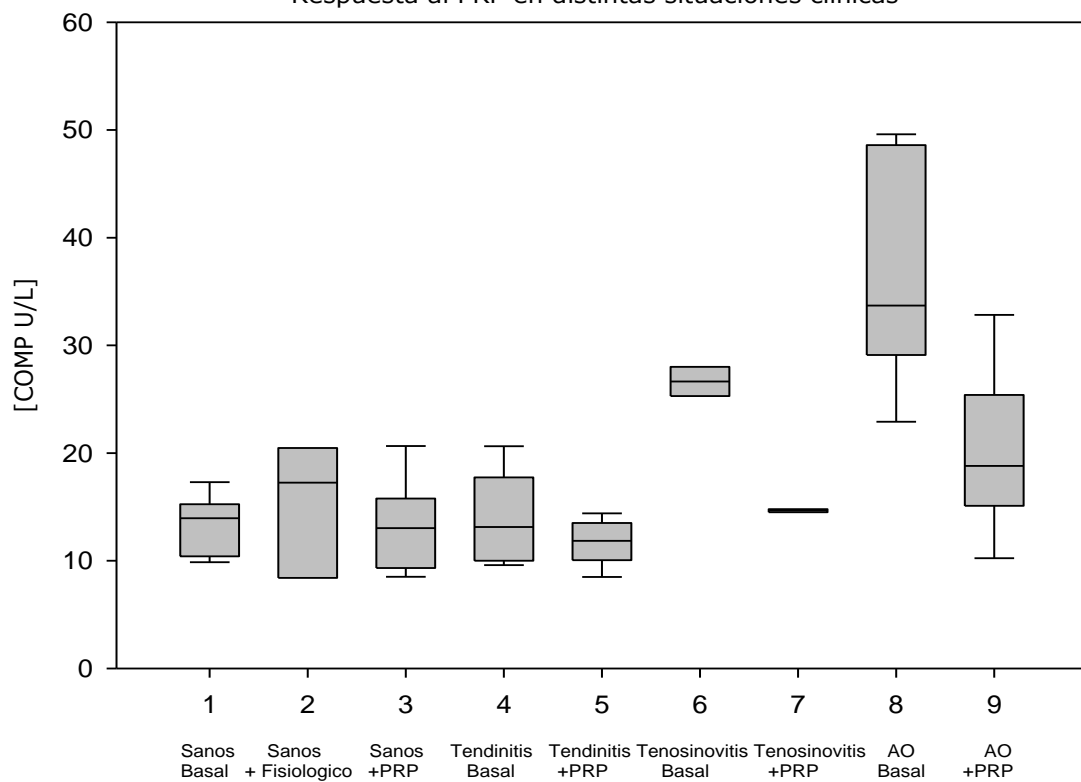


Fig. 10. Niveles de COMP en líquido sinovial
Efecto del S.Fisiol. y PRP en articulaciones sanas

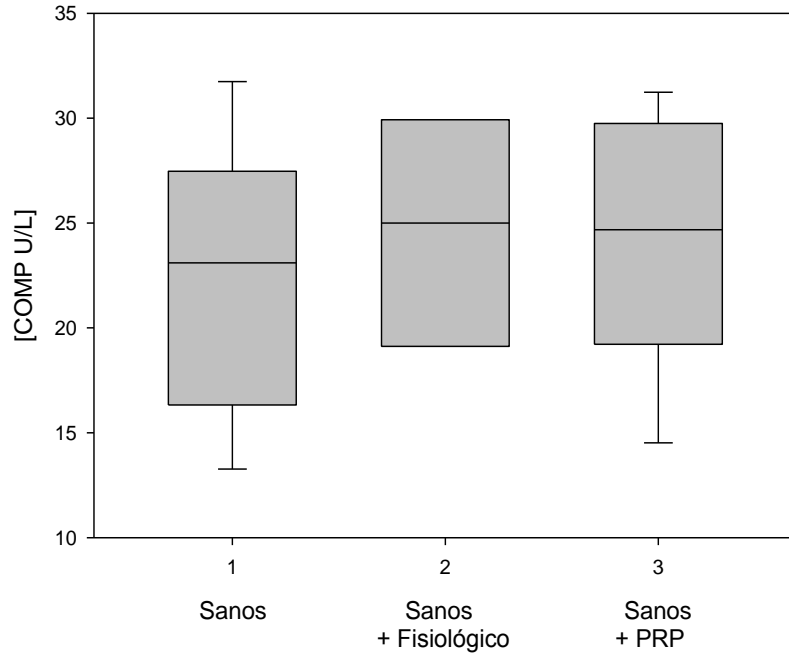
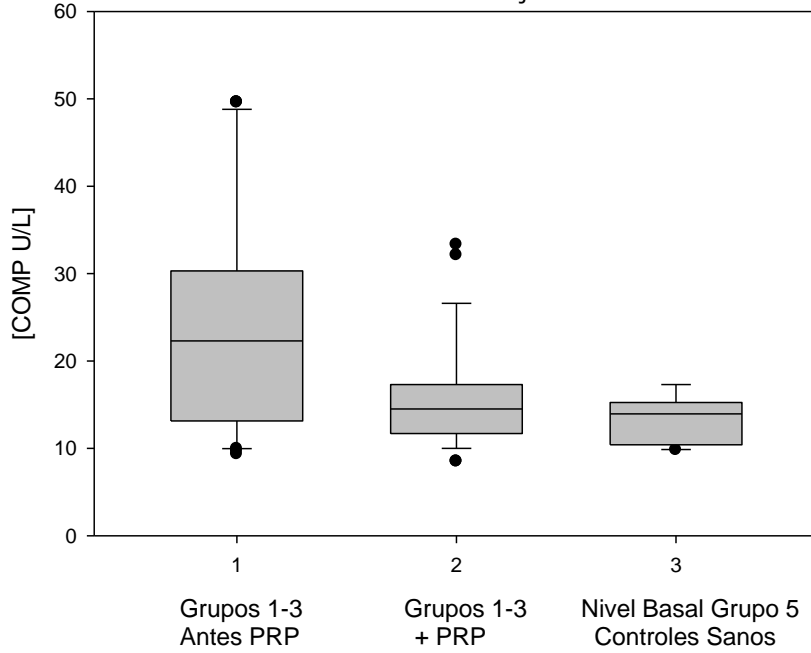


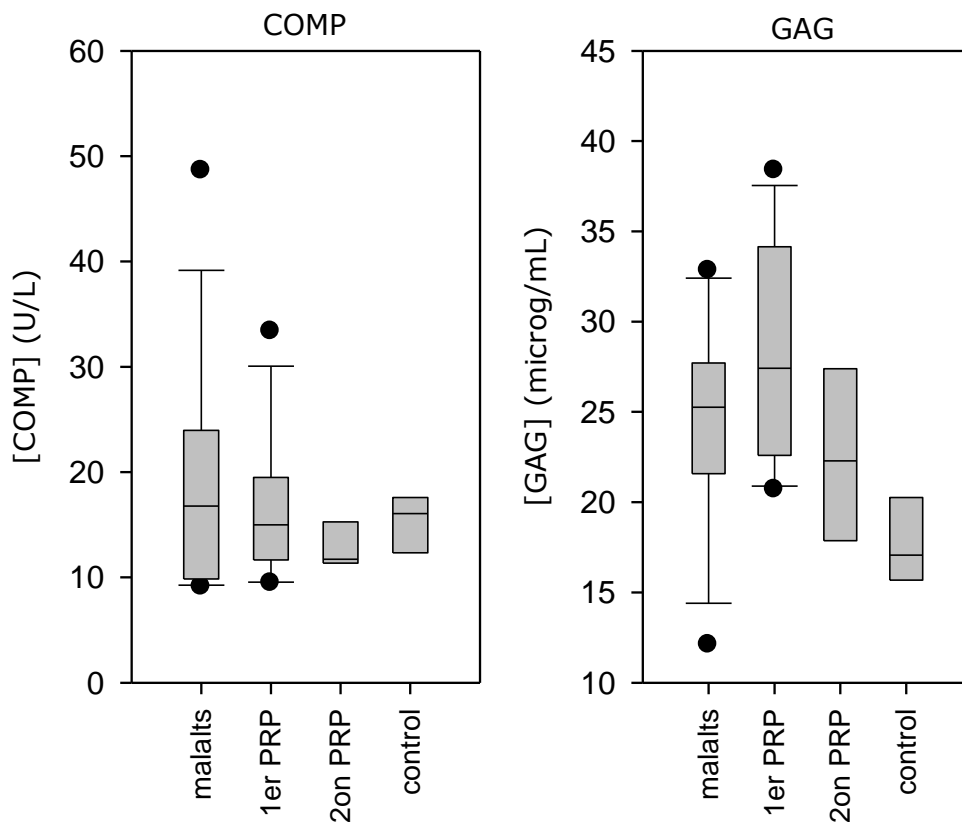
Fig. 11 Niveles de COMP en suero
Efectos del PRP sobre el conjunto de lesiones



VALORACIÓN DE LOS EFECTOS DE UNA SEGUNDA DOSIS DE PRP SOBRE LOS [GAGs] Y LA [COMP]

Al evaluar los efectos de la segunda dosis de PRP, administrada a los 15 ± 2 días de la primera, sobre la totalidad de los caballos que presentaban lesiones (grupos 1 a 3), se concluye que después de esta segunda dosis se repite un ciclo de incremento de las concentraciones de GAGs séricas, normalmente de menor intensidad, seguido de una disminución progresiva hasta alcanzar unas concentraciones de GAGs próximas o propias de los individuos sanos. Por lo que respecta a las concentraciones de COMP, se acentúa la tendencia a la disminución hasta un nivel que no presenta diferencias significativas ($p < 0,19$) respecto a los niveles propios del grupo 5, control caballos sanos. (Ver Fig. 12).

Fig. 12. Concentraciones en sueros



ESTIMACIÓN DE LA DURACIÓN DE LOS EFECTOS DE UNA DOSIS DE PRP SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE GAGs Y DE COMP

La duración media estimada de la elevación de las concentraciones séricas de GAGs resultó de 14 ± 5 días, al cabo de los cuales, la administración de una segunda dosis de PRP motivó un segundo incremento en la mayoría de los casos. La disminución de las concentraciones de COMP se mantuvo estable a lo largo del periodo que duró la toma de muestras; en la mayoría de los casos, una segunda dosis de PRP apenas indujo variaciones significativas en

la [COMP], o bien, motivó una leve reducción de las concentraciones de COMP que, a su vez, se mantuvieron estables.(Ver figS. 13-18)

Fig. 13. Efecto de la primera dosis PRP sobre [GAGs]

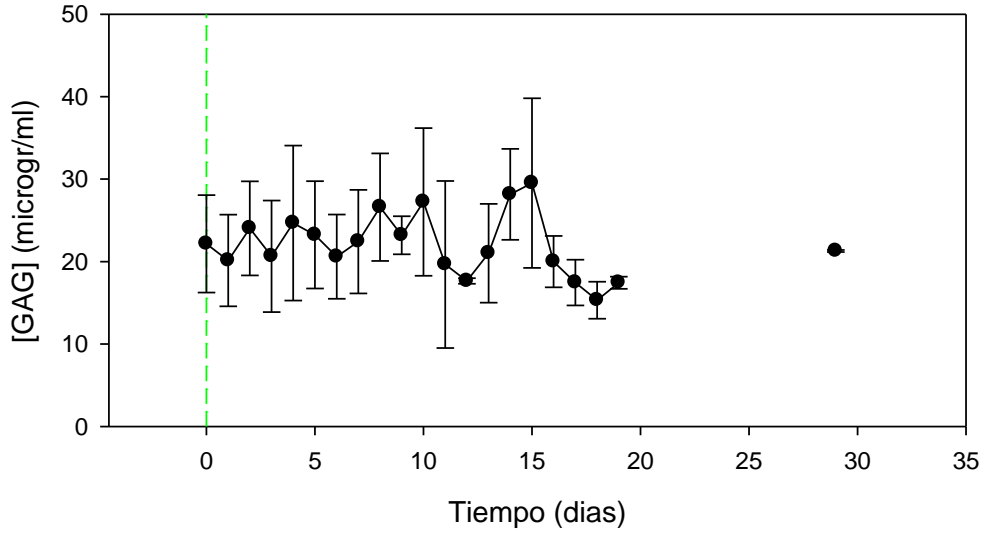
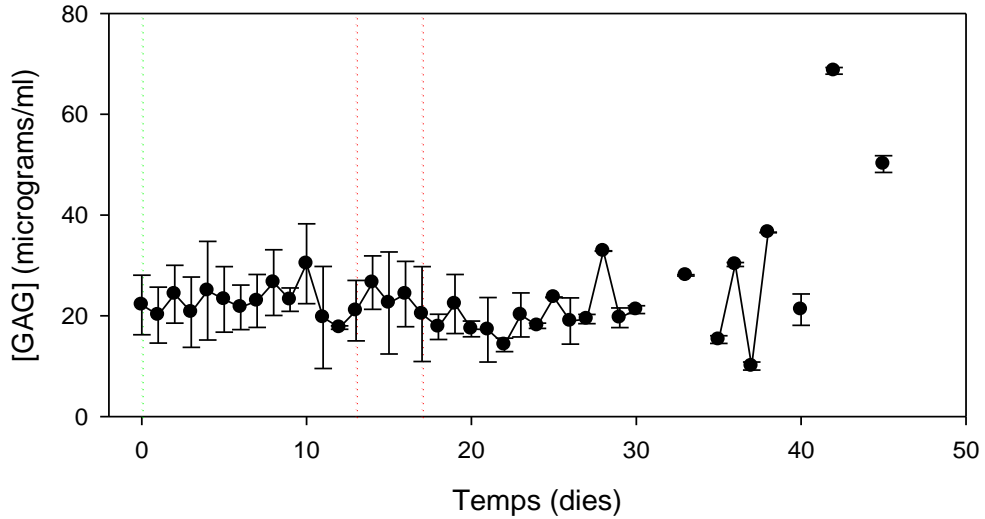
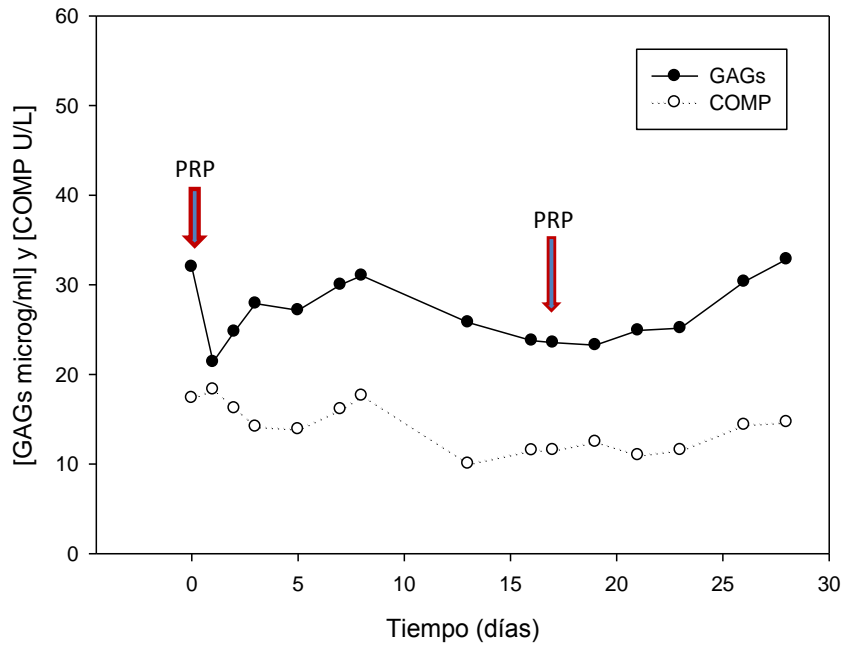


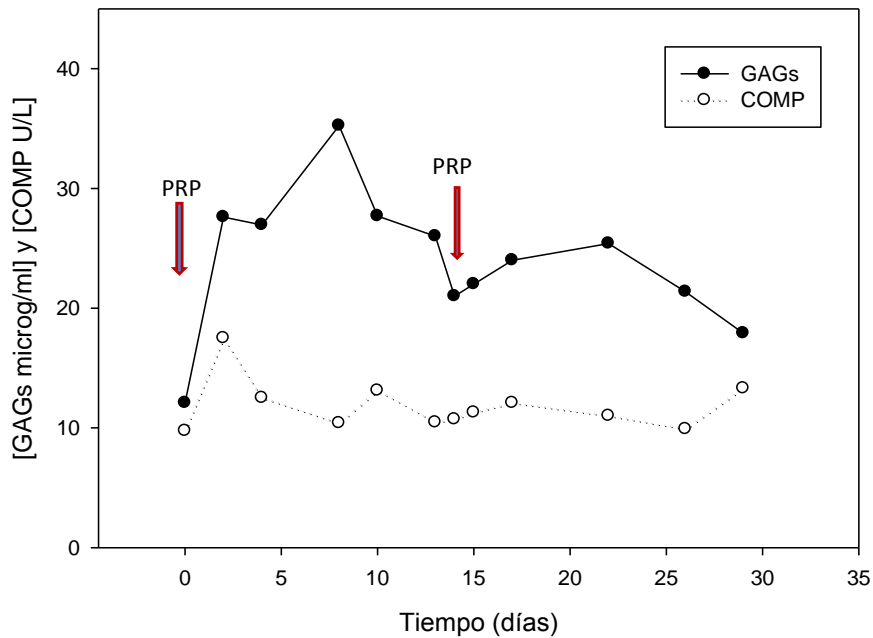
Fig.14. Efectos de la 1ª y 2ª dosis de PRP sobre [GAGs]



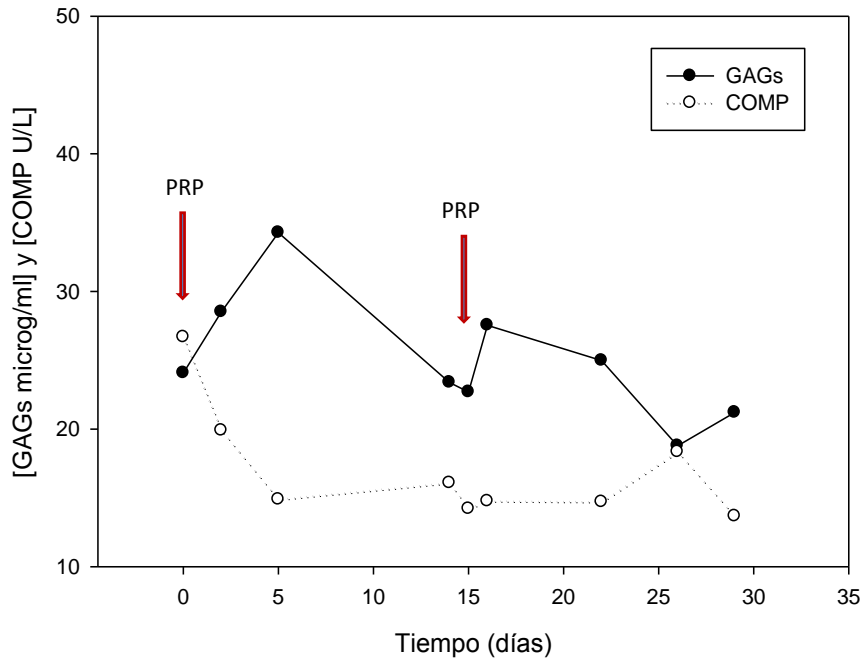
Caso nº 8. Tendinitis aguda
[GAGs] y [COMP] en sueros



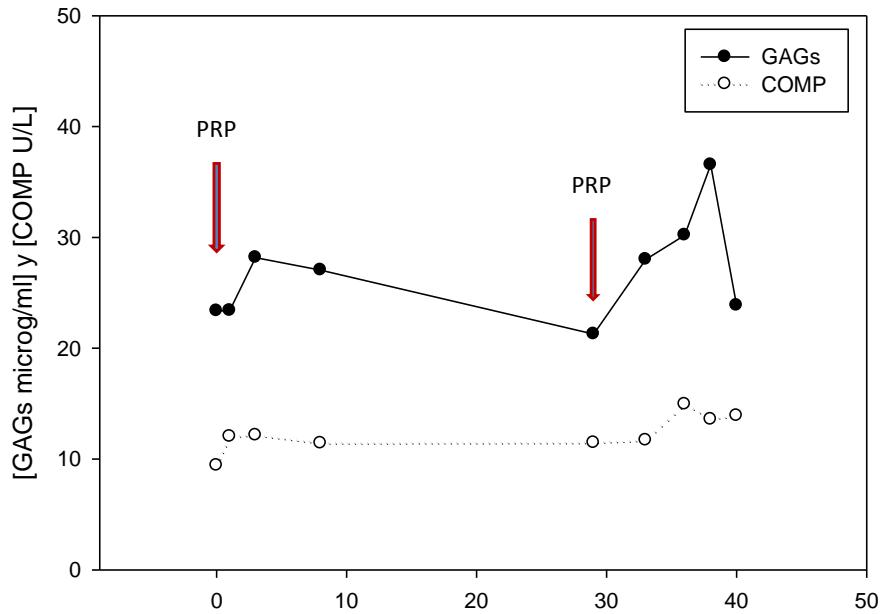
Caso nº 5. Tendinitis subaguda
[GAGs] y [COMP] en sueros



Caso n° 7. Tenosinovitis aguda
[GAGs] y [COMP] en sueros

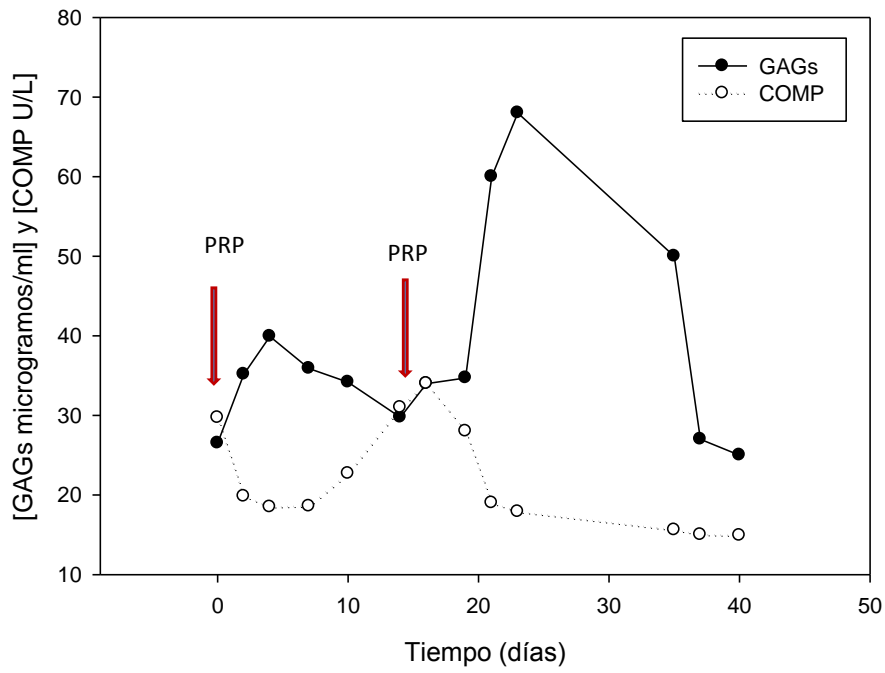


Caso n° 3. Tenosinovitis crónica.
[GAGs] y [COMP] en suero

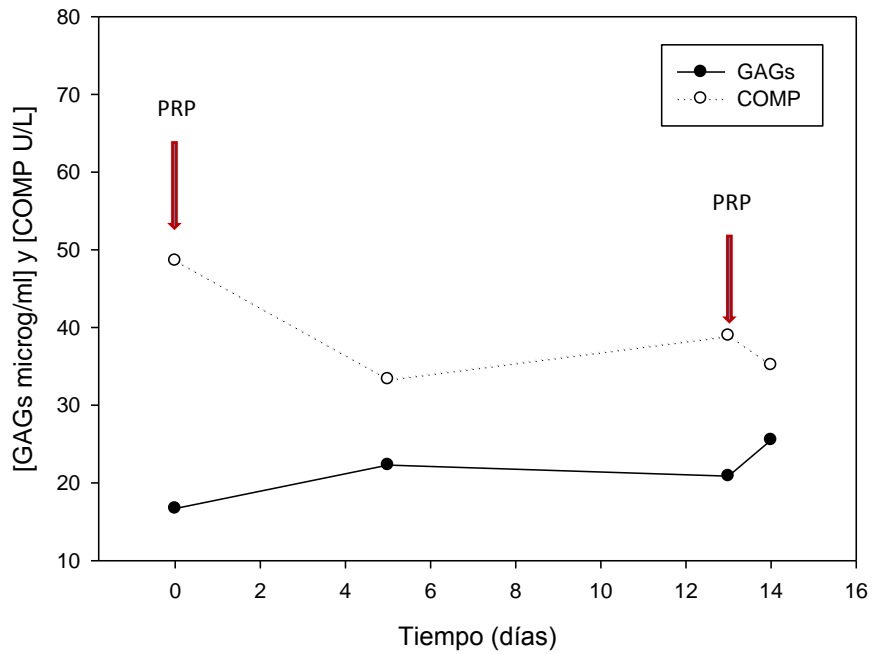


Figs. 17 y 18

Caso nº 2. Osteoartritis
[GAGs] y [COMP] en suero



Caso 1. Osteoartritis
[GAGs] y [COMP] en suero



A) Determinación de los niveles basales de AH en las distintas situaciones clínicas (grupos controles y caballos con OA). (Ver fig. 19)

Se determinaron las concentraciones basales de AH en el suero (S) y en el líquido sinovial (LS) de los caballos sanos (grupo 5), así como en el suero de los caballos con OA (grupo 3), obteniéndose las siguientes concentraciones de AH (medias \pm SD): caballos sanos del grupo 5 (S= 22 ± 2 $\mu\text{g/ml}$; LS= 432.800 ± 122.585 $\mu\text{g/ml}$), caballos con OA del grupo 3 (S= $23,3 \pm 1,03$ $\mu\text{g/ml}$).

B) Determinación del efecto de la administración intraarticular de suero salino fisiológico sobre la concentración de AH en caballos sanos. (Ver figs. 19 y 20)

Al analizar las muestras de sueros y líquidos sinoviales recogidas tras la administración de 1 dosis de 10 ml de suero salino fisiológico en las articulaciones tarsocrurales del grupo de caballos sanos (grupo 5) se obtuvieron las siguientes concentraciones de AH (medias \pm SD): S= $28,12 \pm 3,56$ $\mu\text{g/ml}$ y LS= $258.000 \pm 2.828,4$ $\mu\text{g/ml}$ durante los 5 días siguientes; los valores séricos se normalizaron a partir del 4^o ó 5^o día y, en el líquido sinovial, más tarde (no pudo precisarse).

C) Determinación del efecto de la administración intraarticular de una dosis de PRP sobre la concentración de AH en caballos sanos (Ver figs. 19, 20 ,21 y 22).

Al analizar las muestras de sueros y líquidos sinoviales recogidas tras la administración de 1 dosis de 10 ml de PRP en las articulaciones tarsocrurales del grupo de caballos sanos (grupo 5) se obtuvieron las siguientes concentraciones de AH (medias \pm SD): S= $27,3 \pm 2,86$ $\mu\text{g/ml}$ y LS= $169.500 \pm 36.343,6$ $\mu\text{g/ml}$ durante los 6 ± 1 días siguientes; los valores séricos tardaron más de 9 días en normalizarse.

D) Determinación del efecto de la administración intraarticular de una dosis de PRP sobre la concentración de AH en caballos con OA. (Ver fig. 19).

Al analizar las muestras de sueros recogidas tras la administración local de 1 dosis de PRP a los caballos lesionados con OA, se obtuvieron las siguientes concentraciones séricas de AH (medias \pm SD): S= $28,25 \pm 10,71$ $\mu\text{g/ml}$.

E) Análisis estadístico (ver Figs. 19, 20 ,21 y 22).

Al comparar los niveles basales de AH séricos entre los caballos sanos y los afectados con OA, no se evidencian diferencias significativas ($p = 0,41$).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el grupo 5 de caballos sanos pone de manifiesto que, en relación a las concentraciones basales de AH presentes en el suero y en el líquido sinovial, la administración intraarticular de suero fisiológico salino da lugar a una variación no significativa de AH séricos ($p= 0,49$) y en el líquido sinovial ($p= 0,054$). La administración intraarticular de una dosis de PRP no induce variaciones

significativas en la concentración sérica de AH ($p= 0,54$), pero sí una disminución significativa en el LS ($p < 0,0001$), con una duración de 15 a 30 días.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el grupo de caballos con OA evidencia que, en relación a las concentraciones séricas basales de AH, la administración intraarticular de PRP no induce una variación significativa de AH séricos ($p= 0,28$).

Fig. 19 Concentraciones de AH en suero

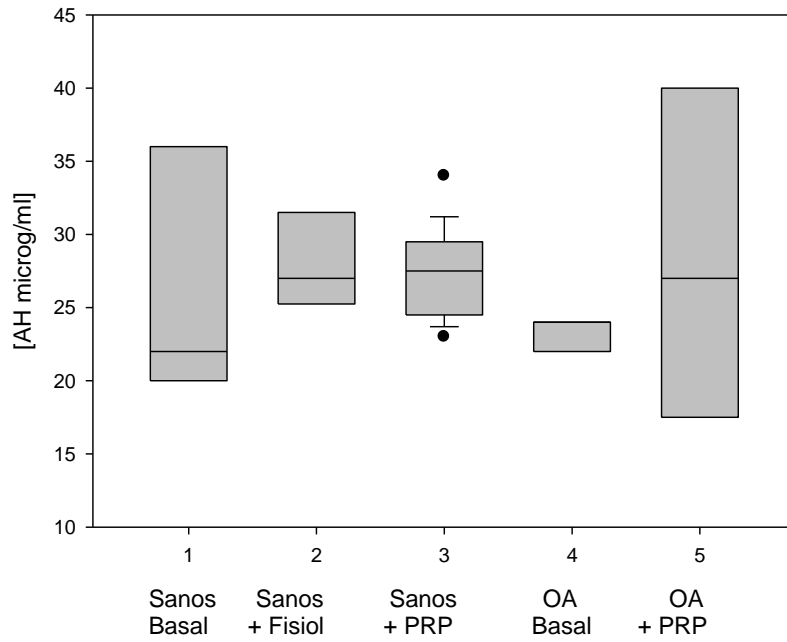


Fig. 20 Concentraciones de AH en líquido sinovial

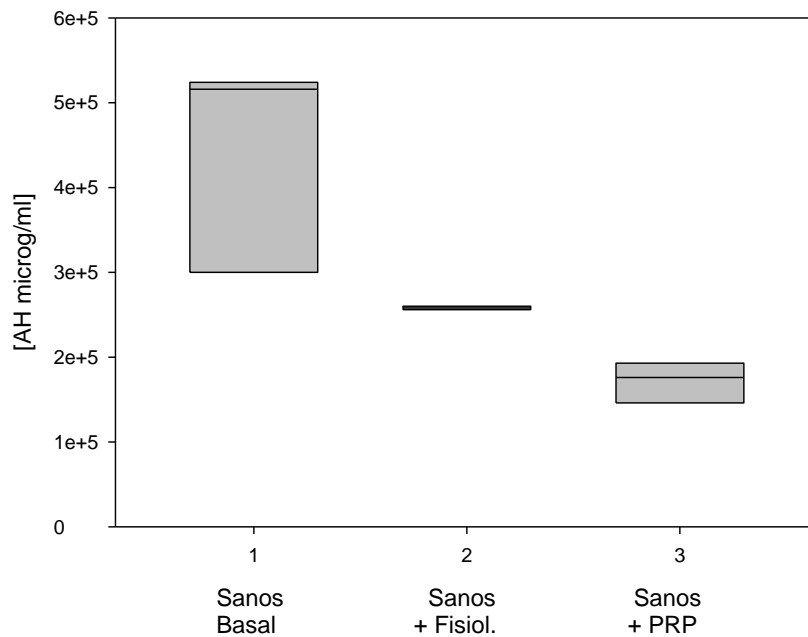


Fig. 21 Caso control. Caballo sano + PRP intraarticular.
[GAGs], [COMP] y [AH] en suero

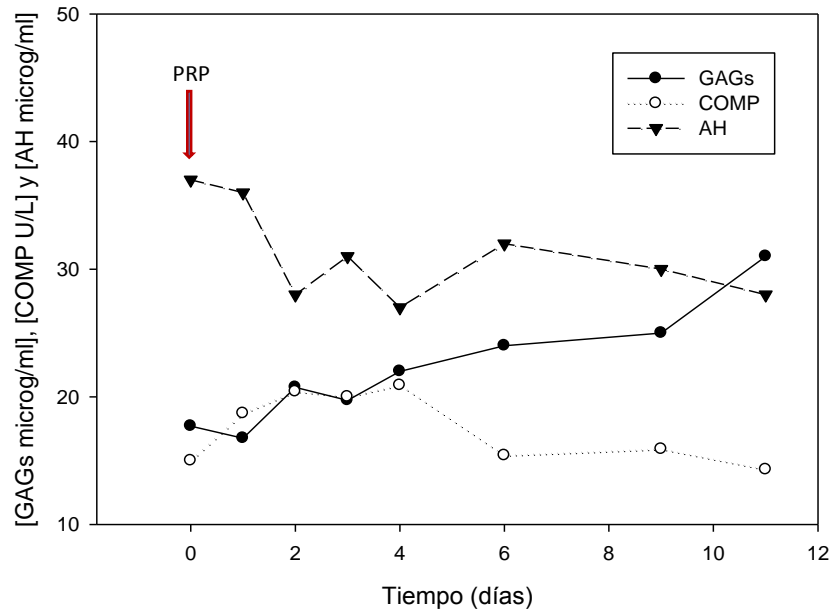
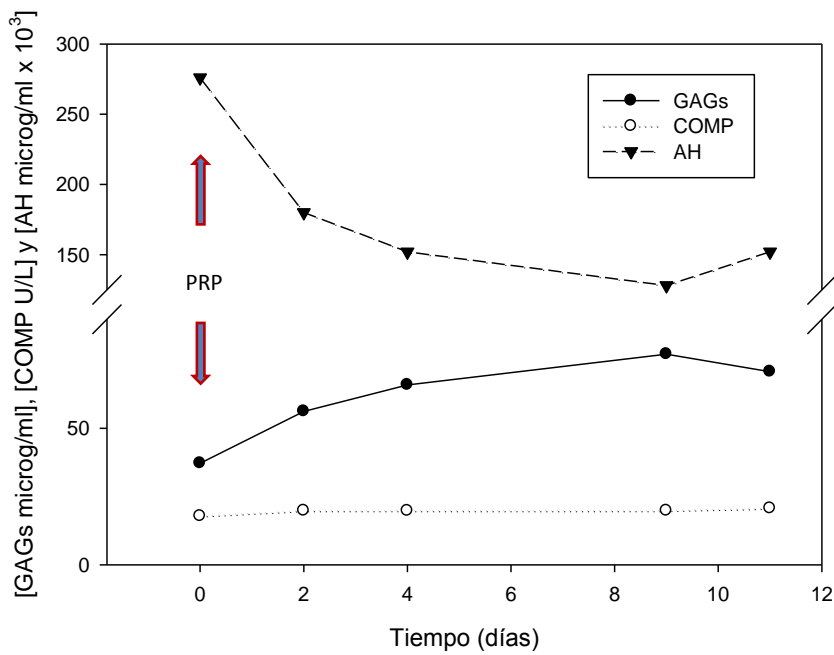


Fig.22 Caso control. Caballo sano + PRP intraarticular.
[GAGs], [COMP] y [AH] en líquido sinovial



GAGS

Desde el punto de vista estadístico ha sido posible evidenciar diferencias significativas entre los niveles séricos de GAGs correspondientes a los caballos sanos y los correspondientes a los caballos afectados con tendinitis, tenosinovitis y OA, por lo que la determinación de la concentración de GAGs sérico tendría un valor diagnóstico.

La administración de PRP en cavidades sinoviales va seguida de una elevación significativa de la concentración de GAGs en el suero y en el líquido sinovial articular. La elevación observada tras la administración intratendinosa no es significativa según el análisis estadístico, pero hay que recordar sus condicionantes anatómicos (vascularización, ausencia de membrana sinovial, etc). Interpretamos la elevación de GAGs como el resultado de un estímulo de síntesis y no de degradación, ya que la administración de PRP, lejos de acompañarse de signos clínicos propios de la inflamación que pudieran asociarse a un proceso catabólico o destructivo, se sigue de una disminución importante del dolor y de una recuperación funcional más rápida, como ya se ha mencionado en los capítulos anteriores.

COMP

La técnica analítica empleada para la determinación de la COMP es especialmente sensible para la detección de fragmentos. La mayor parte de la COMP presente en el suero está fragmentada. Desde el punto de vista estadístico no ha sido posible evidenciar diferencias significativas entre los niveles séricos de la COMP correspondientes a los caballos sanos y los correspondientes a los caballos afectados con tendinitis, pero sí se han evidenciado diferencias significativas respecto a los casos afectados con tenosinovitis y OA, por lo que la determinación de la concentración de la COMP sérico tendría un valor diagnóstico es estas dos últimas entidades lesionales. Por lo que respecta a las tendinitis, otros estudios ya han informado de la escasa influencia de la COMP de origen tendinoso en el cómputo del COMP sérico.

La administración intratendinosa de PRP o en las cavidades sinoviales en caballos afectados con tendinitis, tenosinovitis u OA, se acompaña de una disminución significativa de las concentraciones de la COMP en relación a los niveles iniciales que presentaban los mismos caballos. Sin embargo, la misma administración de PRP en caballos sanos no se acompaña de una disminución significativa de las concentraciones de la COMP. Debido a la técnica analítica utilizada, no podemos evidenciar un estímulo de síntesis de la COMP, pero sí interpretamos la disminución de la concentración de la COMP fragmentada en el suero como una disminución de los procesos catabólicos en cada una de las tres estructuras anatómicas ensayadas.

En lo que concierne al AH, con la técnica analítica utilizada no se han podido evidenciar diferencias significativas entre las concentraciones séricas de AH correspondientes a cada grupo de caballos, por lo que dicha determinación no ha resultado de utilidad diagnóstica; otros estudios⁴⁹, empleando otros procedimientos técnicos analíticos han llegado a la misma conclusión.

La disminución de la concentración de AH observada en el líquido sinovial podría deberse a un efecto de dilución, mencionado en otros trabajos⁴⁹, y no contradice la posibilidad de un estímulo de síntesis de AH.

EL CONCEPTO DE DOSIS Y PAUTA DE ADMINISTRACIÓN

Aún no se han definido estos conceptos. Sobre la base de los resultados de este estudio, a continuación se propone el siguiente protocolo de tratamiento.

Los resultados obtenidos indican que el estímulo de síntesis de GAGs tiene una duración de 14 ± 5 días y que, después del estímulo que supone la segunda administración de PRP, los niveles de GAGs disminuyen tendiendo a asemejarse a los niveles basales de los caballos sanos. La disminución de la concentración de la COMP fragmentada es bastante estable tras la primera dosis de PRP y suele acentuarse tras la segunda dosis de PRP, quedando en los niveles propios de los caballos sanos. El efecto del PRP intraarticular sobre la concentración de AH en caballos sanos se revierte entre los 15 y 30 días.

Con estos datos, consideramos que en la mayoría de los casos una única dosis de PRP resulta insuficiente, puesto que una segunda dosis de PRP pone de manifiesto un margen de mejoría en los indicadores (biomarcadores), hasta aproximarse a los niveles basales propios de los caballos sanos. Esto coincide con las conclusiones obtenidas de la experiencia clínica y del diagnóstico y seguimiento ecográficos y que han sido expuestas en capítulos anteriores.

Una vez saturados los receptores celulares, se desconoce lo que ocurre con los factores de crecimiento excedentes depositados con el PRP y su vida media en el entorno de un determinado tejido. Ello refuerza la idea de que, probablemente, con los procedimientos utilizados para concentrar plaquetas se consigue un suministro suficiente de factores de crecimiento para saturar los receptores celulares en un momento dado, pero que se precisa una acción más sostenida en el tiempo y que podría lograrse mediante la administración de dosis sucesivas; atendiendo a los resultados de este estudio, pensamos que un intervalo aproximado de 15 días podría ser adecuado.

En el siguiente capítulo, de las Conclusiones Generales, se completan los comentarios sobre el concepto de dosis e intervalo de administración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Caron JP, Genovese RL. Principles and practices of joint disease treatment. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003;pp 746-64.
2. Gwilym SE: Understanding pain in osteoarthritis. *J Bone and Joint Surg*. 2008; 90(3):280-287.
3. Kawcak CE, Frisbie DD, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW: Effects of exercise vs experimental osteoarthritis on imaging outcomes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(12):1519-25.
4. van Grevenhof EM, Ducro BJ, van Weeren PR, et al: Prevalence of various radiographic manifestations of osteochondrosis and their correlations between and within joints in Dutch Warmblood horses. *Equine Vet J*. 2009 ;41(1):11-16.
5. Relave F, Meulyzer M, Alexander K, et al: Comparison of radiography and ultrasonography to detect osteochondrosis lesions in the tarsocrural joint: A prospective study. *Equine Vet J*. 2009 ;41(1):34-40.
6. Whitcomb MB: Ultrasonographic evaluation of the distal extremity. *J Equine Vet Science*. 2009;29(1):47-59.
7. Groth AM, Weaver MP, Weller R: Intra- and interobserver agreement in the interpretation of navicular bones on radiographs and computer tomography scans. *Equine Vet J*. 2009;41(2):125-129.
8. McIlwraith CW: *Diagnostic and Surgical Arthroscopy in the Horse*, 2nd edn., 1990.
9. Fuller JC, Barr AR, Sharif M, Dieppe PA: Cross-sectional comparison of synovial fluid biochemical markers in equine osteoarthritis and the correlation of these markers with articular cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001; 9(1):49-55.
10. Rousseau JC, Delmas PD: Biological markers in osteoarthritis. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*. 2007;(3)6:346-356.
11. McIlwraith CW: Use of sinovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Vet J* 2005 (37)5:473-482.
12. Jackson BF, Lonnell K, Verheyen LP, et al: Biochemical markers of bone metabolism and risk of dorsal metacarpal disease in 2-year -old Thoroughbreds. *Equine Vet J*. 2005;37:87-91.
13. Fietz S, Einspanier R, Höppner S, et al: Determination of MMP-2 and MMP-9 activities in sinovial fluid in horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. *Equine Vet J* 2008 ;40(3):266-271.

14. Frisbie DD, Al-Sobayil F, Billingham RC, Kawcak CE, McIlwraith CW: Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008;(16)10:1196-1204.
15. Murray RC, Smith RK, Henson FM, Goodship AE: The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine carpal articular cartilage and its variation with exercise and cartilage deterioration. *Vet J.* 2001; 2001;162:121-128.
16. Smith RK, Gerard M, Dowling B, et al: Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: a proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons. *Equine Vet J Suppl.* 2002;34:241-4.
17. van den Boom R, Brama PA, Kiers GH, DeGroot J, Barneveld A, van Weeren RR: The influence of repeated arthrocentesis and exercise on matrix metalloproteinase and tumor necrosis factor alpha activities in normal equine joints. *Equine Vet J.* 2004;36(2):155-9.
18. van den Boom R, van der Harst MR, Brommer H, et al: Relationship between synovial fluid levels of glycosaminoglycans, hydroxyproline and general MMP activity and the presence and severity of articular change on the proximal articular surface of P1. *Equine Vet J.* 2005 ;37(1):19-25.
19. Andersson M, Thorstensson CA, Ross EM, et al: Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) increase temporarily after physical exercise in patients with knee osteoarthritis. *BMC Musculosk Disorders.* 2006; 7:98.
20. Melkko J et al: Clearance of NH2-terminal propeptides of types I and III procollagen is a physiological function of the scavenger receptor in liver endothelial cells. *J Exp Med.* 1994; 179:405-412.
21. Kawcak CE, Frisbie DD, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW: Effects of exercise vs experimental osteoarthritis on imaging outcomes. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2008.
22. van Weeren PR, Firth EC, Brommer H, et al: Early exercise advances the maturation of glycosaminoglycans and collagen in the extracellular matrix of articular cartilage in the horse. *Equine Vet J.* 2008;40(2):128-135.
23. Taylor SE, Weaver MP, Pitsillides AA, et al: Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronan levels in synovial fluid from horses with osteoarthritis of the tarsometatarsal joint compared to a control population. *Equine Vet J.* 2006;38(6):502-7.
24. Frisbie DD, Al-Sobayil F, Billingham RC, McIlwraith CW: Serum markers differentiate exercise from pathology and correlate to clinical parameters of pain in an osteoarthritic model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 202;10, suppl A:553.

25. Frisbie DD, Al-Sobayil F, Billingham RC, McIlwraith CW: Synovial fluid biomarkers distinguish exercise from osteoarticular pathology. 2003 Proc Am Ass Equine Practnrs. 49:116-117.
26. Aslan H, Kimelman-Bleich N, Pelled G. Molecular targets for tendon neof ormation. J Clin Invest. 2008; 118(2):439-444.
27. Huang L, Zhu W, Saunders CP, et al: A novel application of quantile regression for identification of biomarkers exemplified by equine cartilage microarray data. BMC Bioinformatics. 2008; 9:300.
28. Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, et al: Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. J Biol Chem 1992;267: 6132-6.
29. Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, et al: COMP is structurally related to the thrombospondins. J Biol Chem 1992; 267:22346-50.
30. Taylor SE, Weaver MP, Pitsillides AA, et al: Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronan levels in synovial fluid from horses with osteoarthritis of the tarsometatarsal joint compared to a control population. Equine Vet J. 2006; 38(6):502-7.
31. Di Cesare PE, Hauser N, Lehman D, et al: Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. FEBS Lett 1994; 354:237-40.
32. Di Cesare PE, Carlson CS, Stollerman ES, et al: Expression of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovium. FEBS Lett 1997;412:249-52.
33. Halász K, Kassner A, Mörgelin M, et al: COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. J Biol Chem 2007; 282:31166-31173.
34. Chen FH, Herndon ME, Patel N, et al: Interaction of cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 with aggrecan. J Biol Chem 2007;282: 24591-24598.
35. Xu K, Zhang Y, Ilalov K, et al: Cartilage oligomeric matrix protein associates with granulins-epithelin precursor (GEP) and potentiates GEP-stimulated chondrocyte proliferation. J Biol Chem 2007; 282:11347-11355.
36. Williams FMK, Spector TD. Biomarkers in Osteoarthritis. Arthritis Research & Therapy. 2008; 10:101.
37. Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, Di Cesare PE, et al: Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. Br J Rheumatology 1997; 36:1151-60.
38. Smith RK, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in digital sheath synovial fluid and serum with tendon injury. Equine Vet J. 2000; 32(1):52-8.

39. Misumi K, Tagami M, Kamimura T, et al: Urine cartilage oligomeric matrix protein (COMP) measurement is useful in discriminating the osteoarthritic Thoroughbreds. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006; 14:1174-1180.
40. Skiöldebrand E, Lorenzo T, Zunino L, et al: Concentration of collagen, aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid from equine middle carpal joints. *Equine Vet J* 2001; 33:394-402.
41. Misumi K, Villim V, Murata T, et al: Serum level of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine osteoarthritis. *Equine Vet J*. 2002; 34(6):602-8.
42. Taylor SE, Weaver MP, Pitsillides AA, et al: Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronan levels in synovial fluid from horses with osteoarthritis of the tarsometatarsal joint compared to a control population. *Equine Vet J*. 2006; 38(6):502-7.
43. Skiöldebrand E, Heinegård RD, Eloranta M, et al: Enhanced concentration of COMP (cartilage oligomeric matrix protein) in osteochondral fractures from racing thoroughbreds. *J Orthop Res* 2005; 23:156-163.
44. Arai K, Misumi DS, Carter S, et al: Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) degradation and synthesis in equine joint disease. *Equine Vet J*. 2005; 37(1):31-6.
45. Yamanokuchi K, Tagami M, Nishimatsu E, et al: Sandwich ELISA system for cartilage oligomeric matrix protein in equine synovial fluid and serum. *Equine Vet J*. 2009; 41(1):41-46.
46. Smith RKW, Heinegård RD: Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in digital sheath synovial fluid in serum with tendon injury. *Equine Vet J* 2000; 32:52-58.
47. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ: Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochem Biophys Acta*. 1989; 883: 173-177.
48. Alwan WH, Carter SD, Bennett D, et al: Glycosaminoglycans in horses with osteoarthritis. *Equine Vet J* 1991; 23:44-47.
49. Palmer JL, Bertone AI, McClain H: Assessment of glycosaminoglycan concentration in equine synovial fluid as a marker of joint disease. *Can J Vet Res*. 1995; 95:205-212.
50. Paimella L, Heiskanen A, Kurki P, et al: Serum hyaluronate level as a predictor of radiologic progression in early rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum*. 1991; 34:815-821.
51. Goldberg RH, Huff JP, Lenz ME, et al: Elevated plasma levels of hyaluronate in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 1991; 34:799-807.
52. Popot MA, Bonnaire Y, Guehot J, et al: Hyaluronan in horses: physiological production rate, plasma and synovial fluid concentrations in control conditions and following sodium hyaluronate administration. *Equine Vet J* 2004; 36(6):482-487.

53. Todhunter RJ: Anatomy and physiology of sinovial joints. In McIlwraith CW, Trotter GW, editors: Joint disease in the horse, Philadelphia, 1996, WB Saunders.
54. McIlwraith CW: General pathobiology of the joint and response to injury. In McIlwraith CW, Trotter GW, editors: Joint disease in the horse, Philadelphia, 1996, WB Saunders.
55. Dart AJ, Little CB, Chu O, et al: Recombinant equine hormone administration: effects on synovial fluid biomarkers and cartilage metabolism in horses. *Equine Vet J* 2003;35(3):302-7.
56. Rantanen NW, Jorgensen JS, Genovese RL. Ultrasonographic Evaluation of the Equine Limb: Technique. In: Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2003;

AGRADECIMIENTOS

La puesta a punto de las técnicas analíticas y el procesado de las muestras para la obtención de los resultados fueron realizados por el Dr. D Antoni Iborra Obiols.

Servei de Producció d'Anticossos

Institut de Biotecnologia i Biomedicina

Universitat Autònoma de Barcelona

08193 Bellaterra (Barcelona)

<http://ibb.uab.es/ca/serveis/anticossos>

antoni.iborra@uab.cat

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

1. Todas las lesiones de tejidos blandos de los caballos tratados en este estudio evidenciaron una rápida y favorable progresión hacia la curación al compararlas con las de los correspondientes grupos control. Después de la primera administración ya se apreció una notable disminución del dolor.
2. Los caballos tratados presentaron unos índices de regreso a la competición más favorables y una menor incidencia de recaídas, al comparar los resultados con los datos recogidos tanto de los grupos control como de la literatura científica.
3. Las lesiones crónicas de los tejidos blandos respondieron bien al tratamiento; de hecho, tan bien como las lesiones agudas.
4. Las lesiones de tejidos blandos que progresaron más lentamente y que presentaron una mayor incidencia de recaídas fueron aquellas localizadas en la zona de los polos (sección transversal) del tendón flexor digital superficial y en el ligamento suspensor. En estos casos, pensamos que debería retrasarse la reincorporación a la competición, incluso aunque el examen ultrasonográfico muestre una mejoría.
5. Se recomienda que la administración del PRP sea intralesional.
6. La terapia intraarticular evidenció unos resultados superiores, en comparación con los tratamientos tradicionales, en aquellas articulaciones que mostraban pequeños o ningún cambio radiológico. Los resultados no se han relacionado tanto con la cronicidad en sí misma como con el grado o magnitud de los cambios radiológicos.
7. El PRP administrado por vía intrasinovial (articulaciones o vainas tendinosas) incrementa las concentraciones de GAGs en el suero y en el líquido sinovial, a la vez que disminuye la COMP fragmentada. El PRP puede favorecer el balance anabólico en la curación de los tejidos, tal como han evidenciado las concentraciones de estos biomarcadores.
8. Sobre la base de la respuesta de las concentraciones de GAGs, que parece perdurar alrededor de 15 días, se propone una pauta de tratamiento con sucesivas dosis cada 2 semanas.
9. Los recuentos plaquetarios no han influenciado los resultados terapéuticos, por lo que consideramos que el método utilizado asegura un suministro suficiente de FC por administración. Para las lesiones de los tejidos blandos se recomiendan, al menos, 2 administraciones intralesionales y deberían incrementarse para las lesiones más graves, así como para las lesiones localizadas en los polos del TFDS y en el LS.
10. En el presente estudio se han administrado 358 dosis a 191 caballos sin que se hayan observado reacciones adversas.

GENERAL CONCLUSIONS

1. All soft tissue lesions of the horses treated in the study evidenced a favourable and rapid progression towards healing when compared to the corresponding control groups. A marked decrease in pain was noticed even after the first administration.
2. Treated horses had a better index of return to competition and lower incidence of re injury than control groups and what has been previously reported in the literature.
3. Chronic lesions in soft tissues responded well to treatment, in fact just as well as acute injuries.
4. The lesions that progressed less rapidly and had a higher incidence of re injury were those located in the flexor tendon pole areas (on a transverse section) and those in the suspensory ligament. In these horses we feel that return to competition should be postponed even if ultrasonographic exam shows improvement.
5. Intra lesional administration is recommended.
6. Intra articular joint therapy demonstrated superior results in those joints that showed little to no radiographic changes. Results did not seem related to chronicity in itself but more to the degree of bony changes.
7. PRP administered intrasynovially (joints and tendon sheaths) increases serum and synovial GAG concentrations together with lowering fragmented COMP. PRP may favour the anabolic balance in tissue healing as evidenced by these biomarker concentrations.
8. Based on the response of GAG concentrations which seems to last about 15 days treatment may be considered every 2 weeks.
9. As platelet counts did not influence the therapeutic outcome, we consider that the method used in this study provides enough growth factors per administration. At least 2 PRP intra lesional administrations are recommended in soft tissue injuries and this number should be increased when the severity of the injury is marked or when the lesion is located in the superficial digital flexor tendon poles or in the suspensory ligament.
10. In the present study 358 administrations to 191 horses were performed and no adverse reactions were observed.