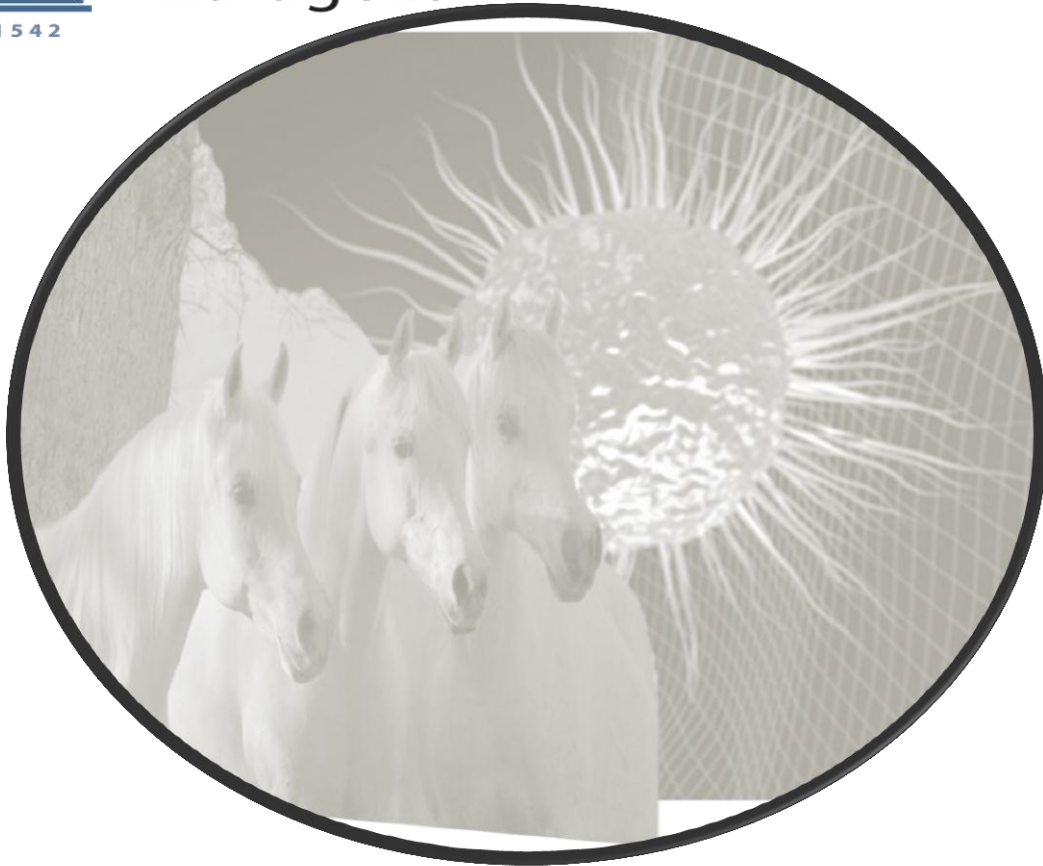




**Universidad**  
**Zaragoza**



# **ANÁLISIS DEL EFECTO INTRAARTICULAR DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AUTÓLOGAS Y ALOGÉNICAS EN CABALLOS**

**Memoria del trabajo fin de Máster**

**Realizado por: Nekane Ardanaz Laguardia**

**Dirigido por: Antonio Romero Lasheras**

**Francisco José Vázquez Bringas**

**Clementina Rodellar Penella**



## Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a los directores de mi trabajo máster por el tiempo invertido en la realización de este proyecto, tanto a nivel experimental como a la hora de realizar el documento escrito, por su paciencia y sus ganas de enseñarme lo que supone iniciar y realizar desde cero un proyecto de investigación.

En segundo lugar merece una mención especial, la investigadora Ana Rosa Remacha, por su continua dedicación, su paciencia conmigo en el laboratorio así como su interés en el procedimiento clínico, por su involucración en todo lo que a este trabajo se refiere y por las horas que hemos estado aprendiendo juntas, muchas gracias.

A la Profesora Arantza Vitoria y al resto del personal (residentes, internos, Ysabel), del área de grandes animales de Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HVUZ), por toda la ayuda prestada durante la realización de todo el experimento.

Por último agradecer al HVUZ y a LAGENBIO la posibilidad de realizar este trabajo dentro de sus instalaciones, poniendo a mi disposición todo el material necesario para la realización del experimento.

## ÍNDICE

## **ÍNDICE**

<b>1. Resumen</b>	<b>p.7</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>p.9</b>
2.1. Justificación	p.11
2.2. Hipótesis	p.11
2.3. Objetivos	p.11
<b>3. Antecedentes y revisión bibliográfica</b>	<b>p.11</b>
3.1. Articulación y patologías articulares más frecuentes en caballos	p.12
3.1.1. Anatomía de la articulación	p.12
3.1.2. Patologías articulares	p.15
3.1.3. Sinoviocentesis – Artrocentesis	p.22
3.1.3.1 Artrocentesis carpo – tarso	p.23
3.1.4. Análisis de líquido sinovial	p.24
3.2. Células madre	p.25
3.2.1. Células madre mesenquimales	p.26
3.2.1.1. Caracterización de las células madre	p.28
3.2.1.2. Relación con el sistema inmune y la inflamación	p.28
3.2.2. Células madre mesenquimales equinas	p.29
3.3. Terapia celular	p.31
3.3.1. Aplicaciones de la terapia celular en el caballo	p.31
3.3.2. Tratamiento de lesiones de cartílago en caballos	p.32
<b>4. Material y métodos</b>	<b>p.34</b>
4.1. Diseño Experimental	p.35
4.2. Animales	p.36
4.3. Extracción de células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSc)	p.36
4.3.1. Aspirado de médula ósea	p.36
4.4. Aislamiento, expansión y crioconservación de BM-MSc	p.37
4.5. Diferenciación y caracterización de BM- MSc	p.39
4.6. Determinación del fenotipo de las BM-MSc	p.39
4.7. Valoración del estado de la articulación	p.39
4.8. Inoculación articular	p.41
4.9. Preparación del pool de BS MSc alogénicas	p.42

4.10. Análisis estadístico	<b>p.42</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>p.43</b>
5.1. Extracción.	<b>p.44</b>
5.2. Aislamiento y cultivo de BM-MSC y crioconservación	
5.3. Diferenciación y determinación del fenotipo de las BM-MSC	<b>p.44</b>
5.4. Artrocentesis	<b>p.44</b>
5.5. Experimento 1: Valoración de la infiltración de MSC autólogas respecto a la de RL en la articulación tarsocrural	<b>p.45</b>
5.6. Experimento 2: Valoración de la infiltración de MSC alogénicas respecto a la de RL en la articulación carporadial.	<b>p.53</b>
5.7. Experimento 3: Valoración de la reinfiltración de MSC alogénicas respecto a la de RL en la articulación carporadial.	<b>p.62</b>
5.8. Análisis estadístico	<b>p.70.</b>
<b>6. Discusión</b>	<b>p.76</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>p.82</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>p.84</b>

## RESUMEN

## RESUMEN

El caballo, además de ser paciente dada su relevante importancia económica en los países desarrollados [1], es un animal modelo para el desarrollo de tratamientos para diferentes patologías en la especie humana. Durante los últimos años, el uso de células madre, como opción terapéutica, en lesiones osteoarticulares equinas, ha aumentado de forma exponencial.[2]

El principal objetivo de este estudio prospectivo es conocer la seguridad (existencia o no de posibles efectos adversos) de la aplicación de células madre mesenquimales obtenidas de la médula ósea (BM-MSC) autólogas y alogénicas en articulaciones equinas sanas, como paso previo a su posible uso terapéutico en patologías articulares. Se utilizaron 6 caballos adultos sanos (3 machos enteros y 3 hembras) de los cuales se han aislado, cultivado, diferenciado, caracterizado y criopreservado MSC provenientes de la 5ª y 6ª esternebras.

La realización del estudio constó de tres experimentos: En el primer experimento se comparó y evaluó el grado de inflamación que produce la inoculación intraarticular de BM-MSC autólogas frente a Ringer Lactato (RL) como control en la articulación contralateral, inoculadas en la articulación tarsocrural. El segundo experimento que comparó y evaluó el grado de inflamación que produce la inoculación intraarticular de una mezcla de BM-MSC alogénicas frente al RL, en la articulación carporadial. En el tercer experimento se comparó y evaluó el grado de inflamación que produce una segunda inoculación intraarticular de una mezcla de BM-MSC alogénicas frente al RL en la misma articulación carporadial.

En todos los experimentos, previo al implante intraarticular (0 horas), y posteriormente a las 24, 48, 72 horas, 5 y 10 días se realizaron las siguientes determinaciones clínicas y analíticas: examen visual, examen de cojera estático y dinámico (incluyendo tests de flexión), medición del perímetro de las articulaciones a estudio, medición de la temperatura de la piel sobre los recesos sinoviales, evaluación ecográfica de la articulación, medición del espesor de la membrana sinovial y de la profundidad de líquido sinovial, así como artrocentesis para la obtención de líquido sinovial para determinar el recuento leucocitario total y el recuento de neutrófilos, realizar una evaluación citológica y medir la concentración de proteínas totales.

Los resultados de este trabajo muestran que la inoculación intraarticular de MSC equinas, independientemente de su origen (autólogas o alogénicas) produce una reacción inflamatoria transitoria que se normaliza en 10 días sin necesidad de tratamiento alguno. Esta inflamación pasajera es, en la mayoría de los animales, difícilmente detectable a nivel clínico, pero sí que es muy marcada en los parámetros laboratoriales (proteínas totales y recuento leucocitario y de neutrófilos).



# INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

Las MSC, están siendo estudiadas como una herramienta fundamental de la Terapia Celular debido a sus capacidades de autorrenovación y diferenciación a distintos tejidos [3]. Además, en los últimos años ha crecido el interés sobre las MSC por su capacidad de influir sobre el sistema inmune. Un mejor conocimiento de estas características podría suponer un gran avance en el tratamiento de patologías en la especie equina, resaltando la posibilidad de traslación de los resultados obtenidos a la especie humana [4].

Durante los últimos años, el uso de las MSC en el tratamiento de lesiones osteoarticulares equinas ha supuesto el estudio de las características de proliferación, capacidad de diferenciación y marcadores de superficie de las MSC equinas. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el potencial inmunomodulador de las MSC equinas que podría tener importantes implicaciones terapéuticas[5].

La terapia con células madre se plantea como opción terapéutica para muchas patologías, sin embargo, existe una clara limitación en las terapias, derivada de la necesidad de usar células autólogas (células madre obtenidas del propio individuo a tratar) debido principalmente al tiempo requerido desde el aislamiento de las células del paciente hasta su posible uso, que normalmente es de aproximadamente un mes [6].

Si el tratamiento con células madre alogénicas (células madre de un individuo de la misma especie que el animal a tratar) demuestra ser seguro, efectivo, muchos pacientes podrían verse beneficiados mediante la existencia de bancos celulares que permitan el uso de las células criopreservadas en el momento que el clínico las necesita, [6].

El potencial del tratamiento con células madre alogénicas es evidente cuando se evalúan las diferencias entre coste, tiempo, la morbilidad y la eficacia. A nivel técnico el hecho de cultivar y almacenar células madre de diferentes individuos permitiría tratar a muchos animales con un único donante ya que la capacidad de multiplicación del número celular aumenta exponencialmente. Cómo las células se obtienen de un sólo animal la morbilidad disminuye ya que el número de animales a los que tenemos que someter a la extracción es menor. Las células madre obtenidas pueden ser seleccionadas en función de sus características (mayor capacidad inmunogénica, mayor rapidez en el crecimiento en cultivo, etc.) para optimizar el tratamiento.

Todas estas ventajas que presenta el uso clínico de células alogénicas en medicina equina deben corroborarse mediante estudios *in vivo* en los que se demuestre de manera fehaciente, que este tipo celular no presenta una respuesta inmune exacerbada en el tejido tratado.

A día de hoy se sabe que el comportamiento *in vitro* de las células madre y la funcionalidad del sistema inmune son diferentes de lo que sucede *in vivo*, y las células madre se comportan de manera diferente en función del entorno en el que son implantadas. Además, los estudios que se han realizado

*in vivo* utilizando células madre alogénicas en lesiones naturales o inducidas quirúrgicamente sólo se describen utilizando una única administración de células madre, y por lo tanto, el perfil de seguridad de estos estudios no se pueden extrapolar a repetidos protocolos de administración.[7]

## **2.2 HIPÓTESIS**

Los resultados obtenidos *in vitro* en la especie equina demuestran la capacidad inmunomoduladora de las MSC observándose una disminución significativa de la proliferación de los linfocitos T cuando son co-cultivados con MSC.

A partir de estos resultados y los obtenidos *in vivo* en otras especies como la ovina, nos planteamos el desarrollo de presente trabajo tratando de demostrar la inocuidad de las MSC tanto autólogas como alogénicas cuando son inoculadas en articulación sana en caballos

## **2.3. OBJETIVOS**

Este trabajo tiene como objetivo principal realizar un estudio de la respuesta inflamatoria en articulaciones tratadas con MSC autólogas y alogénicas.

Para ello en el presente estudio se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el grado de inflamación que produce el uso intraarticular BM-MSc autólogas en diferentes individuos.
2. Analizar el grado de inflamación que produce el uso intraarticular de BM-MSc alogénicas en diferentes individuos.
3. Valorar el grado de inflamación que produce el uso repetido intraarticular de BM-MSc alogénicas en diferentes individuos. Este último apartado tiene como propósito valorar si el sistema inmunológico del animal receptor posee un efecto “memoria” tras un primer contacto con las células madre del donante, ya que es frecuente en la clínica equina diaria la necesidad de realizar varias infiltraciones seriadas para conseguir un tratamiento satisfactorio.

## **3. ANTECEDENTES Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

El caballo es un atleta extraordinario, una característica que es el resultado de su evolución como animales de pastoreo en las antiguas praderas de América del Norte. La supervivencia en estos terrenos abiertos fue acrecentada por el desarrollo de la velocidad para escapar de los predadores, y la resistencia requerida para viajar largas distancias en búsqueda de alimentos y agua. Posteriormente, mediante la reproducción selectiva, los humanos modificaron o mejoraron las características equinas de velocidad y resistencia.

Varias características anatómicas y fisiológicas operan en conjunto para dotar al caballo con una capacidad atlética extraordinaria. El rendimiento atlético óptimo depende de un funcionamiento integral eficiente de dichas variables, entre ellas las articulaciones, por ello se deben estudiar tratamientos que mejoren o resuelvan las patologías articulares que hacen que estos animales cesen o disminuyan su potencial trabajo [8].

### **3.1 ARTICULACIONES Y PATOLOGÍAS ARTICULARES MÁS FRECUENTES**

Las patologías articulares son una causa frecuente de cojera en el caballo que puede afectar al futuro deportivo de animales de competición, aparición de un defecto estético que impida la calificación morfológica e incluso comprometer la vida del mismo en patologías graves (artritis sépticas, fracturas, etc.) [9].

La mayoría de los signos clínicos que podemos observar en un animal con patología articular son consecuencia de una reacción bioquímica que se traduce en:

- Cojeras (dolor): Producido por la inflamación articular y el aumento de presión intramedular. Los nociceptores se localizan predominantemente en la cápsula articular.
- Sinovitis: Los metabolitos inflamatorios promueven la neovascularización y la hiperplasia sinovial, esto desencadena un aumento del riego sanguíneo que produce extravasación capilar de proteínas con la consiguiente formación de edema y un aumento de producción de líquido sinovial que puede afectar a la función articular.
- Pérdida de funcionalidad en diferentes grados.

Los procesos degenerativos que afectan a los tejidos del sistema musculoesquelético (tendones, ligamentos o articulaciones), tienen una vía patogénica común resultante de la alteración del equilibrio bioquímico/molecular entre citoquinas anabólicas y catabólicas [9].

#### **3.1.1 ANATOMÍA DE LA ARTICULACIÓN**

La articulación es el punto de unión de los huesos, En general, cada articulación es una unidad funcional compuesta por dos huesos confrontados, unos cartílagos que los recubren y una cápsula, con un revestimiento interior sinovial y otro externo conjuntivo-ligamentoso. Constituyen las juntas de los distintos huesos, permitiendo el movimiento de un segmento óseo con respecto al contiguo, además de transferir el peso del animal [10].

El cartílago articular es un tejido elástico carente de nervios, vasos sanguíneos o linfáticos que varía su grosor según las diferentes ubicaciones. El cartílago articular permite el movimiento y soporte del peso del animal ya que reduce la fricción, transfiere y distribuye las cargas que se producen en las distintas posiciones articulares y ofrece una superficie articular lubricada, que permite que los huesos se deslicen y giren unos sobre otros sin apenas

desgaste. El cartílago es un tejido duradero y resistente. Macroscópicamente es blanco, brillante y firme, compuesto principalmente por agua (70%), colágeno tipo II, proteoglicanos, glicoproteínas, condrocitos, minerales y lípidos. Se nutre del líquido sinovial, por un mecanismo de difusión que se realiza durante la carga articular.

La membrana sinovial del caballo tiene una coloración blanca, blanco-amarillento, pero se puede observar un cambio macroscópico de la coloración de rosado a marrón secundario a un trauma.

Es lisa y brillante en algunas regiones de la articulación y en algunas regiones presenta vellosidades, estas vellosidades aumentan cuando hay una lesión articular. Está formada por tejido conectivo vascular. Las tres funciones principales de la membrana sinovial son la fagocitosis, la síntesis y regulación del contenido de proteínas (principalmente colágeno) y hialuronato en el líquido sinovial y la regeneración del líquido sinovial.

El hueso subcondral y epifisario forman una parte integral de la estructura articular, dando soporte estructural al cartílago articular subyacente. La placa subcondral consiste en hueso cortical de espesor variable. Con el ejercicio se produce la remodelación y la cantidad de hueso cortical denso puede aumentar existiendo una marcada variabilidad entre individuos.

La cápsula articular es la envoltura periarticular en forma de saco que cierra la cavidad de una articulación sinovial, adhiriéndose a la circunferencia del extremo articular de cada hueso implicado. En su cara interna se encuentra la membrana sinovial.

Los tejidos periarticulares (músculos, tendones, ligamentos) y la cápsula articular proporcionan estabilidad a la articulación.

El líquido sinovial o sinovia es un ultrafiltrado del plasma viscoso y claro que se encuentra en las articulaciones. El líquido contiene pocas proteínas y células pero es rico en ácido hialurónico sintetizado por los sinoviocitos de tipo B. El líquido sinovial reduce la fricción entre los cartílagos y otros tejidos en las articulaciones para lubricarlas y acolcharlas durante el movimiento. En reacciones fuertes acompañadas de movimiento rápido el líquido sinovial tiene la capacidad de volverse menos viscoso. A dicha propiedad de tener un comportamiento en el que mayor presión o movimiento, mas adelgazamiento y menos viscosidad del líquido sinovial se llama tixotropía. Éste líquido debe ser viscoso, amarillo transparente con menos de 200- 500 células nucleadas/ $\mu$ l y un nivel de proteínas menor a 2.5 g/dl. En la citología el 90% de las células deberían ser mononucleares y el resto polimorfonucleares, con ausencia de microorganismos.

Los estímulos físicos que se producen en la articulación con el movimiento son los que mantiene la composición molecular de la misma, por ello una inmovilización prolongada predispone a procesos catabólicos que llevan a la debilidad de los tejidos articulares. Alteraciones en la marcha, crecimientos anómalos, distribución asimétrica de carga, deformidades ortopédicas, etc., pueden llevar a una lesión del cartílago articular, reacciones del hueso subcondral y sinovitis.

En el presente trabajo la investigación se realizará utilizando dos articulaciones sinoviales, el carpo y el tarso del caballo, por ello se describe a continuación un repaso de las dos articulaciones.

#### ARTICULACIÓN DEL CARPO

El carpo es el extremo más proximal del autopodo (mano), constituido por ocho huesos que presentan tres planos de articulación:

- Articulación antebraquiocarpiana, carporadial o radiocarpiana, entre los extremos distales del radio y el cúbito y la fila proximal del carpo.
- Articulaciones intercarpianas, entre las filas proximal y distal del carpo
- Articulación carpometacarpiana, entre la fila distal del carpo y el metacarpo.

La cavidad articular está dividida en tres compartimientos, uno entre los extremos distales del radio y el cúbito y la fila proximal del carpo; otro entre las filas proximal y distal del carpo, y el tercero entre la fila distal del carpo y el extremo proximal del metacarpo. El proximal es independiente, pero el medio y el distal suelen estar comunicados.

La membrana fibrosa de la cara dorsal o craneal del carpo es muy gruesa y resistente, y engloba los tendones de los músculos extensores del carpo y de los dedos constituyendo el retináculo extensor del carpo. La membrana fibrosa palmar se adapta a la cara palmar del carpo y forma la cara craneal del canal del carpo. El retináculo flexor es una banda fibrosa, independiente de la cápsula articular, que une el hueso accesorio con los huesos mediales del carpo (escafoides y trapezoide). El canal del carpo es el espacio delimitado lateralmente por el hueso accesorio, cranealmente por la membrana fibrosa de la cápsula articular del carpo, y caudal y medialmente por el retináculo flexor [11].

La articulación del carpo en posición normal se encuentra en extensión. Los movimientos son exclusivamente de extensión y de flexión. La amplitud del movimiento se realiza a expensas de la fila proximal y el radio y, un poco menos, entre las dos filas del carpo. El desplazamiento entre la fila distal y el metacarpo es prácticamente inexistente. En hiperextensiones de la mano, como ocurre en la marcha rápida, los bordes craneales de los huesos del carpo se aproximan entre sí y pueden fracturarse y quedar fragmentos dentro de la articulación (chips o ratones articulares) [10].

#### ARTICULACIÓN DEL TARSO

La articulación tarsocrural (tarsotibial), también conocida como corvejón, es una articulación sinovial y funcionalmente es una tróclea. Es la responsable de los movimientos de flexión y extensión del tarso [11].

Engloba también la articulación tibioperonea distal.

Las articulaciones intertarsianas y tarsometatarsiana son artrodias y permiten movimientos muy pequeños de desplazamiento.

Todas las articulaciones del tarso presentan una única cápsula articular y los ligamentos son comunes.

La cápsula fibrosa es muy resistente y gruesa en la parte plantar. En la cara dorsal es más débil y por ello presenta recesos sinoviales, sobre todo a uno y otro lado del astrágalo; existe otro en la parte plantar y medial de la tuberosidad del calcáneo.

La membrana sinovial forma cuatro sacos sinoviales; el mayor de ellos se encuentra entre el astrágalo y la tibia (tarsocrural), y el segundo, el intertarsiano proximal, se halla entre los huesos de la fila proximal (calcáneo y astrágalo) y el hueso central del tarso. El intertarsiano distal se encuentra entre el hueso central y la fila distal, y el tarsometatarsiano entre la fila distal y los metatarsianos. El tarsocrural y el intertarsiano proximal están comunicados; el intertarsiano distal y el tarsometatarsiano a veces están comunicados [11], [12].

Los movimientos del tarso son fundamentalmente la flexión y la extensión, y éstas se realizan en la articulación tarsotibial.

En la posición anatómica, el tarso está en extensión. La hiperextensión está limitada por los ligamentos colaterales. La flexión es muy amplia, y el pie se dirige lateralmente porque los labios de la tróclea del astrágalo miran oblicuamente hacia afuera (forman un ángulo de 15-18° con el plano sagital).

### 3.1.2 PATOLOGÍAS ARTICULARES MAS FRECUENTES

El caballo es una animal que sufre, debido a diferentes causas, numerosas enfermedades o lesiones localizadas en sus articulaciones, varía desde un curso agudo a crónico y algunas de ellas le ocasionan importantes secuelas que lo marginan de las actividades que realizan [13].

La artritis puede ser definida, simplemente, como la inflamación de la articulación. Este término es inespecífico y contribuye poco para describir la naturaleza de varias entidades específicas que afectan a las articulaciones del caballo. El papel de la inflamación varía considerablemente entre las diferentes alteraciones [14].

La enfermedad articular más frecuente en el caballo es la osteoartritis (OA) [9]. Este trastorno es un proceso crónico degenerativo caracterizado por el deterioro progresivo del cartílago, acompañado por cambios irreversibles en las demás estructuras articulares, tejidos blandos y hueso subcondral. La esclerosis ósea subcondral y la formación de osteofitos marginales son rasgos frecuentes en la enfermedad. La sinovitis es un rasgo típico de la OA equina. Debido a su componente inflamatorio, la OA también puede estar acompañada por impotencia funcional y dolor

La osteocondrosis (OCD) es una enfermedad de las articulaciones del caballo, reconocida desde hace 50 años, que produce importantes repercusiones económicas en la industria equina mundial. Las estimaciones más realistas, sobre la OCD, establecen una prevalencia que oscila entre el 5-20%. No obstante la valoración de los resultados estadísticos resulta difícil de interpretar, ya que no en todos los trabajos se han considerado las mismas formas de la enfermedad. Esto se debe a que algunas formas, reconocidas claramente como OCD hasta hace pocos años, hoy no se consideran como

tales. La enfermedad afecta a todas las principales raza de caballos. En diversas partes del mundo se están realizando estudios para conocer cómo afecta a cada raza en particular [15].

En la clínica se siguen empleando los términos de *osteochondrosis*, *osteocondritis* y *osteocondritis disecante*, indistintamente. Podemos decir que la osteochondrosis define la enfermedad, *la osteocondritis* la respuesta inflamatoria de la misma y que se emplea el término de *osteocondritis disecante (OCD)* a los casos en los que hay un fragmento de cartílago articular que se separa (diseca) del resto hueso [15].

La sinovitis, es el término que se utiliza para describir la inflamación de las estructuras cartilaginosas que envuelven las articulaciones y cómo se ha explicado anteriormente los metabolitos inflamatorios promueven la neovascularización y la hiperplasia sinovial, esto desencadena un aumento del riego sanguíneo que produce extravasación capilar de proteínas con la consiguiente formación de edema y un aumento de producción de líquido sinovial que puede afectar a la función articular [9].

Cuando se determina una patología articular el objetivo clínico ideal debería ser no sólo frenar la progresión de las lesiones, sino, además reparar los daños producidos. Desgraciadamente los tratamientos convencionales sólo pueden aspirar a intentar enlentecer la progresión de las lesiones y así evitar que se produzcan cambios degenerativos en la articulación y consecuentemente la cojera y/o un defecto estético como es el caso de la sinovitis. Los tratamientos articulares mas usados en clínica equina hasta la actualidad son, básicamente, el uso de corticoesteroides intraarticulares, ácido hialurónico, glucosaminoglicanos polisulfatados, además de otros tratamientos quirúrgicos como son los lavados articulares y la artroscopia [16].

El tratamiento de la patología articular es complejo debido a que las estructuras que normalmente resultan afectadas, la membrana sinovial, el cartílago articular o el hueso subcondral, poseen una vascularización muy deficiente. Además en los tratamientos actuales existen limitaciones como por ejemplo, la inhibición de todos los mediadores de la respuesta inflamatoria que se produce por ejemplo en el uso de los corticoesteroides, inhibe también los procesos normales de síntesis de matriz cartilaginosa. La inhibición parcial de la cascada inflamatoria, como ocurre con el uso de AINEs que inhiben la producción de prostaglandinas, provoca el aumento en la síntesis y/o liberación de otros mediadores (IL-1) con poder catabólico sobre la matriz cartilaginosa, por lo que su utilización es beneficiosa por periodos cortos sólo como analgésicos parcialmente como antiinflamatorios. La terapia intraarticular con ácido hialurónico es beneficiosa por su efecto analgésico y antiinflamatorio, pero solo tiene efecto sobre la membrana sinovial y sobre la lubricación del cartílago pero no es útil en la enfermedad degenerativa articular avanzada o cuando el origen del dolor es el hueso subcondral. El efecto clínico del grupo nuevo de drogas que enlentecen el curso de la artritis (glucosaminoglicanos) es difícil de evaluar, y aun cuando puedan mejorar el curso de la artritis, tiene como limitación que tiene que existir un cartílago que responda al tratamiento, es decir, con una cantidad de condrocitos capaz de generar matriz, hecho que no ocurre en la enfermedad degenerativa articular [16, 17].



Por todo esto se plantea la necesidad de disponer de tratamientos que busquen la reparación eficaz de los defectos que se puedan producir y de este modo regenerar las alteraciones provocadas por los procesos patológicos; estos tratamientos son englobados dentro de la medicina regenerativa.

Hoy en día, existe una gran confusión en lo referente a los “materiales” que se pueden usar en medicina regenerativa. Debido a su uso en algunos afamados deportistas de elite y la divulgación científica, es habitual encontrar propietarios que confunden, por ejemplo, MSC con PRPs; este fenómeno se ve aumentado si incluimos algunos enfoques terapéuticos más recientes, a los cuales denominamos casi siempre con complicados acrónimos desde el inglés: IRAP, PRF, AD-SVF...

Tratando de aclarar este confuso conjunto de siglas, podemos tratar de diferenciar en función de si el producto utilizado contiene o no células progenitoras:

- “Productos” que SI que contienen células progenitoras.

Este grupo, a su vez puede subdividirse en:

A. **Células progenitoras aisladas y expandidas (cultivadas)** = son las **MSC** que ya hemos conocido, inoculamos altas cantidades de células progenitoras. La literatura científica comienza a reservar el término de expanded regenerative medicine para estas terapias, reservando el de non-expanded regenerative medicine para el resto:[18]

B. **Fracciones celulares no expandidas** (sin cultivo tras su obtención): se inoculan células progenitoras pero en cantidades muy reducidas

#### CELULAS MADRE MESENQUIMALES

Ver apartado 3.2 Células Madre.

#### FRACCIONES CELULARES NO EXPANDIDAS

Se trata de materiales autólogos, obtenidos directamente del propio caballo, en los que existe una cierta cantidad de células progenitoras, pero que no han sido cultivadas y expandidas. Su disponibilidad es prácticamente inmediata, sin necesidad de esperar al menos 3 semanas para obtener millones de células, lo cual significa un coste de obtención muchísimo menor. En contrapartida, con estas terapias, la cantidad de células troncales que inoculamos es muy escasa, tal vez sub-terapéutica [19].

### 1.-Aspirado de médula ósea sin cultivar

Uno de los trabajos que más contribuyó a impulsar el interés por la medicina regenerativa en clínica equina fue una comunicación de Herthel y colaboradores presentada en la convención anual de la AAEP en 2001 en el que, precisamente, utilizaba este material para tratar caballos con desmitis del LSM, obteniendo mejores resultados que los descritos en la bibliografía [20].

La médula esternebral se obtiene de manera sencilla, en condiciones de campo, con una aguja de Jameshdi. Como ya se ha comentado, este producto tiene una cantidad muy reducida de células progenitoras, pero además parece ser que hay una alta cantidad de moléculas activas y factores de crecimiento, aunque, desgraciadamente, no se suelen cuantificar ni caracterizar, por lo que los resultados son difícilmente extrapolables. No obstante la sencillez de su obtención y bajo coste hace que algunos cirujanos lo utilicen como coadyuvante en osteosíntesis, artrodesis, maxilofacial... y que los clínicos equinos lo estén utilizando en algunas lesiones tendinológicas.

## **2.- Fracción vascular estromal derivada de grasa (AD-SVF)**

En 2001 el equipo de Zuk y colaboradores publicó los resultados de sus trabajos en los que había conseguido aislar del tejido adiposo humano unas células de aspecto similar a las células madre mesenquimales y que habían podido diferenciarse a diferentes linajes celulares [21].

La empresa norteamericana Vet-stem comenzó a comercializar un preparado autólogo, obtenido de tejido adiposo de caballo, al que se denominó Fracción Vascular Estromal (SVF en inglés) el cual contiene, entre otras células mononucleadas, MSC sin expandir. Se trata por lo tanto, de nuevo, de un preparado relativamente rápido de obtener (no necesita cultivo), pero con un escaso número de células progenitoras.

La empresa comercializadora y diferentes trabajos reportan el uso de este preparado en numerosas lesiones tanto naturales como inducidas [22] de tendones y ligamentos del caballo, sin ningún efecto adverso. Desde entonces las sensaciones clínicas de numerosos veterinarios parecen corroborar estos resultados.

En 2009 Frisbie y su equipo trataron carpos de caballos con un modelo de osteoartritis inducida, comparando placebo, AD-SVF y MSC obtenidas de médula ósea. No se encontraron efectos adversos, pero no hubo diferencias significativas entre los animales control y los tratados con células no cultivadas provenientes de grasa; sin embargo, el nivel de PGE2 fue menor en las articulaciones tratadas con MSC provenientes de médula [23].

### **Productos” que NO que contienen células progenitoras**

A. **“Productos” que sólo contienen moléculas activas** (SIN células progenitoras) = generalmente los denominamos **factores de crecimiento**

## **FACTORES DE CRECIMIENTO**

Los factores de crecimiento (growth factors) son sustancias naturales producidas por el organismo, capaces de estimular el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación celular. Normalmente son proteínas u hormonas. Estos factores de crecimiento son unas moléculas activas sumamente importantes para la regulación de una gran variedad de procesos

celulares. Los factores de crecimiento normalmente actúan como moléculas de señalización entre células uniéndose a receptores específicos en la superficie de sus células diana. Los efectos sobre la diferenciación y la maduración celular, varían entre los diferentes tipos de factores de crecimiento, por ejemplo: las proteínas morfogénicas óseas estimulan la diferenciación celular de hueso, mientras que los factores de crecimiento de fibroblastos y factores de crecimiento endoteliales vasculares estimulan la diferenciación y neoformación de vasos sanguíneos (angiogénesis).

La cantidad de factores de crecimiento conocidos es muy grande y su número se amplía constantemente con las nuevas investigaciones. Algunos ejemplos son: Angiopoietin (Ang), Bone morphogenetic proteins (BMPs), Epidermal growth factor (EGF), Erythropoietin (EPO), Fibroblast growth factor (FGF), Growth differentiation factor-9 (GDF9), Insulin-like growth factor (IGF), Interleukines (IL), Migration-stimulating factor, Myostatin (GDF-8), Nerve growth factor (NGF) and other neurotrophins, Placental growth factor (PIGF), Platelet-derived growth factor (PDGF), Transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ), Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), Tumor-necrosis-factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Vascular endothelial growth factor (VEGF)...

El uso de estos factores en medicina regenerativa equina se ha visto incrementado en los últimos años gracias a nuevos métodos de obtención y concentración de estas moléculas a partir de la propia sangre de los caballos, abaratando enormemente su uso con respecto a algunos factores comerciales exógenos (como el IGF-1).

### **1.- Sobrenadante de médula ósea esternal**

Tras el trabajo de Herthel en 2001, muchos clínicos consideraron que el principal efecto beneficioso de la médula ósea esternal era debido, no a sus escasas células progenitoras de la fracción celular, sino a la gran concentración de factores de crecimiento de la fracción acelular que se obtiene tras la centrifugación de la médula. Existen numerosas experiencias clínicas que sugieren que el uso de este sobrenadante es beneficioso aplicado intralesionalmente o de manera periligamentaria o peritendinosa, pero, desgraciadamente, no existen demasiados ensayos clínicos controlados que demuestren estos efectos y que caractericen el verdadero contenido en factores de crecimiento de este sobrenadante.

No obstante la sencillez y el bajo coste de su obtención, hace que sigan siendo muchos los veterinarios de caballos que lo utilizan sobre todo en lesiones de ligamentos, sobre todo después de conocer los resultados del trabajo de Schnabel y colaboradores en 2008, en el que se obtenían mejores resultados in vitro sobre explantes de LSM con la fracción acelular de médula ósea que con los PRPs [24].

### **2- Fracción de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)**

Los trabajos del odontólogo vasco E. Anitua de finales de los 90 y principios de los 2000 fueron algunos de los que más contribuyeron al enorme interés de la medicina regenerativa por este tipo de factores de crecimiento

derivados del sistema de coagulación y obtenidos de la propia sangre del paciente. Muchos de estos factores son liberados por las plaquetas. Esta metodología se basa, por lo tanto, en aumentar la concentración en plaquetas del plasma (mediante centrifugación), incrementando así su concentración en diversas moléculas activas derivadas de estas células sanguíneas.

Las plaquetas son una fuente vital de factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas, que son liberados durante los procesos reparativos que ocurren en las primeras fases de la reparación de la lesión. Se cree que la liberación de factores de crecimiento desde los concentrados de plaquetas imita (e incluso mejora) los procesos fisiológicos de la coagulación y reparación de la herida, estimulando así la regeneración intrínseca de los tejidos en la que plaquetas endógenas son esenciales. Estos factores plaquetarios también pueden estimular la quimiotaxis de macrófagos, la angiogénesis, la proliferación y la migración de fibroblastos y la síntesis de colágeno. Tras la activación de las plaquetas, los gránulos alfa contenidos en su citoplasma inician un proceso de degranulación y liberan una serie de factores de crecimiento. Algunos de estos son conocidos por participar en la curación de tejidos blandos e incluyen PDGF, IGF-I y IGF-II, TGF- $\beta$ 1, VEGF, FGF y PDEGF. Otros factores de crecimiento presentes en las plaquetas parece que son más importantes para la reparación del hueso y el cartílago: Oc, On), Fn, y TSP-1.

Existen diferentes métodos de obtener Plasma rico en Plaquetas o Fracción de Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Todos ellos se basan en la centrifugación de sangre obtenida de la yugular del caballo en tubos citratados. Algunos métodos pueden realizarse con equipamiento “básico” de laboratorio (centrífuga, cámara de flujo laminar), como el “método de la doble centrifugación” desarrollado por el equipo de M. Prades (Argüelles et al, 2006). Otros, en cambio utilizan sistemas comerciales para separar la fracción rica en plaquetas (inmediatamente por encima de la capa de glóbulos blancos tras la centrifugación) [25].

Existe una enorme variabilidad entre la concentración de plaquetas (y por tanto de factores de crecimiento) obtenidos entre los diferentes métodos. Esta es una de las causas por la que es complicado estandarizar los métodos y hacer estudios comparativos de los resultados. Además muchos de los sistemas comerciales existentes no sólo no garantizan una concentración adecuada de plaquetas (de 4 a 5 veces) sino que incluso permiten que en el concentrado resultante se incluyan leucocitos, responsables de marcados efectos adversos en algunos usos de los PRPs.

En función del uso que vaya a darse al PRP, puede utilizarse como líquido o como gel (añadiendo calcio o trombina).

En medicina humana los PRPs se están utilizando en implantología dental y en lesiones de ligamentos y tendones de deportistas. Precisamente este último es el uso más habitual en clínica equina, existiendo multitud de trabajos tanto in vitro como in vivo (lesiones naturales e inducidas mediante cirugía o colagenasa) que evidencian su utilidad en el tratamiento de lesiones en el TFSD, LSM y otros tendones y ligamentos. Estos trabajos demuestran no sólo una recuperación ecográfica más rápida, sino también una mejor reparación funcional con una menor tasa de recidiva de las lesiones.

Los PRPs se inyectan intralesionalmente (si es preciso guiándose por ecografía) una o varias veces, aunque trabajos recientes (Bosch y colaboradores, 2010 y 2011) [26-28] demuestran un marcado efecto de angiogénesis y reparación de lesiones tendinosas creadas de manera quirúrgica. En estos estudios el efecto tiene una duración prolongada pese a administrarse un único tratamiento con PRPs, lo cual parece sugerir que podría ser suficiente con una única administración.

Pese a que está mucho menos extendido su uso, los PRPs también se están utilizando en el tratamiento de la enfermedad degenerativa articular equina. Diferentes trabajos en medicina humana muestran un marcado efecto beneficioso de los PRP en articulaciones con osteoartritis. Parece ser que los beneficios de este tratamiento se deben a una marcada actividad antiinflamatoria. Uno de los pocos trabajos existentes en clínica equina fue publicado por el grupo de M. Prades [29] que trataron 5 caballos con DJD con inyecciones intraarticulares seriadas, obteniendo mejoría clínica hasta 8 meses tras el tratamiento.

### **3.- Suero autólogo condicionado (IRAP)**

La erosión del cartílago y los efectos catabólicos de la enfermedad degenerativa articular son iniciados y activados por citoquinas proinflamatorias, entre las que juega un papel destacado la Interleuquina 1 (IL-1). Este mediador es especialmente activo en la especie equina; en los caballos con osteoartritis los receptores de IL-1 aumentan significativamente. Existe una proteína denominada IL-1ra o IRAP (Interleukine Receptor Antagonist Protein) que ejerce como antagonista de la IL-1, ocupando sus receptores.

Algunos componentes sanguíneos, como los monocitos, son capaces de producir esta IRAP. El suero sanguíneo enriquecido con la producción endógena de esta proteína se denomina Suero Autólogo Condicionado (ACS) y puede obtenerse en laboratorio por medios bioquímicos (inmunoglobulinas, LPS, IL-1, TNF- $\alpha$ ...) o de manera mucho más sencilla por fenómenos físico-químicos.

Este método consiste en incubar sangre completa con diminutas esferas de vidrio recubiertas de sulfato de cromo. La sencillez del método posibilita que existan kits comerciales con los que los clínicos equinos pueden preparar ACS con un equipamiento laboratorial mínimo (Orthokine®). Estos preparados no sólo contienen elevados niveles de IRAP, sino que también presentan otros factores de crecimiento y citoquinas.

Esta metodología se desarrolló para su uso en medicina humana, en pacientes con artritis, reuma y problemas de columna y existen diferentes publicaciones in vitro e in vivo que justifican su uso.

Pese a los relativamente escasos trabajos que han testado esta terapia en caballos, en los últimos años su uso se está extendiendo ampliamente en clínica equina, fundamentalmente para caballos con sinovitis, artritis aguda y en fases iniciales de osteoartritis, aunque también hay veterinarios que lo están usando en lesiones de tejidos blandos.

#### **4.- Fibrina Rica en Plaquetas (PRF)**

Uno de los “puntos débiles” de la biología del PRP es que la liberación de factores de crecimiento es sumamente rápida. En efecto, la secreción de moléculas activas comienza pocos minutos después de la introducción de PRP en la lesión, cuando se inicia la activación de las plaquetas y más del 95% de los factores de crecimiento son degranulados en menos de 1 hora.

En 2006 el equipo de Choukroun y colaboradores [30] describen lo que denominan “segunda generación de los concentrados plaquetarios” y a la que nombran como Fibrina Rica en Plaquetas (PRF).

Con esta metodología, las plaquetas autólogas son atrapadas en la red de fibrina que se forma de manera natural al coagular la sangre y la liberación de los factores de crecimiento es mucho más lenta y sostenida.

Hasta el momento existen muy pocas comunicaciones de su uso en clínica equina [18] aunque ya hay grupos de investigación trabajando con el posible uso de estas “mallas biológicas activas” en situaciones clínicas de pérdida de sustancia, ósea, cutánea...

#### **3.1.3. SINOVIOCENTESIS- ARTROCENTESIS**

Las sinoviocentesis o artrocentesis se realizan comúnmente para evaluar el estado de articulaciones, vainas tendinosas o bursas, así como para administrar medicaciones intratecales en las mismas. Este procedimiento se debe realizar en animales que presenten una cojera moderada o severa localizada en la articulación basándose en la presencia de efusión sinovial, edema periarticular o celulitis, calor, enrojecimiento y dolor a la palpación o flexión. Además esta indicada en caballos que presente algún tipo de lesión o herida cerca de la articulación, bursa o vaina tendinosa. Previo a la artrocentesis esta indicado la realización de un estudio radiográfico y/o ecográfico para evaluar la presencia de gas intraarticular, alteraciones óseas o cambios en la ecogenicidad del líquido sinovial [31].

La sinoviocentesis se debe realizar de un modo totalmente aséptico (para evitar contaminaciones iatrogénicas), la zona a puncionar debe estar limpia y desinfectada, preferiblemente sin pelo y de un modo atraumático, es decir, debemos acceder a la articulación mediante la punción de los recesos y no puncionando la capsula articular, además es aconsejable realizar este procedimiento en un sitio donde el animal este tranquilo pero que se trate a su vez de un lugar lo mas limpio posible, a modo de contención podemos utilizar un acial o torcedor o si se dispone, un potro de contención. Si esto no fuese suficiente, se deberá realizar una sedación leve al animal utilizando alpha- 2 agonistas en combinación con butorfanol [32].

Cuando exista una herida en la proximidad articular, es conveniente realizar una distensión de la articulación con suero salino fisiológico desde el punto mas lejano a la herida y ver si el líquido sale por la misma, en caso afirmativo existe comunicación entre la lesión y la articulación por lo que será conveniente realizar un lavado articular y evaluar el estado articular del caballo [33].

Se deben realizar las artrocentesis con agujas de 18G y no menos de 3.75cm porque un tamaño menor no permitirá el paso del líquido sinovial y menos si éste presenta una alta concentración de células blancas o fibrina [31].

### 3.1.3.1. ARTROCENTESIS DEL CARPO Y TARSO.

#### **CARPO (articulación carporadial)**

La artrocentesis de la articulación del carpo es relativamente fácil de realizar. El acceso a la articulación radiocarpiana o carporadial, que comunica con la articulación carpo-metacarpiana, se realiza con el carpo flexionado (la flexión puede no ser necesaria si hay mucho líquido articular), la aguja se debe introducirse en una pequeña depresión que existe entre el hueso carpal tanto medial como lateral y el *tendón extensor carpo radialis*. El acceso medial debería ser más sencillo ya que el *tendón extensor digital común* deja un espacio menor en su lado lateral [32].

Existe además la posibilidad de acceder de dos diferentes modos a la articulación radiocarpal, con el caballo en estación, una desde la parte caudal lateral donde se encuentra una depresión palpable entre el extremo distal del cúbito vestigial (cara lateral distal del radio) y el hueso carpocubital. La aguja en este acceso debe insertarse perpendicular a la piel y otro abordaje caudolateral por la parte proximal del hueso carpocubital y distal al cuarto hueso carpal [11]. (Figura 1)

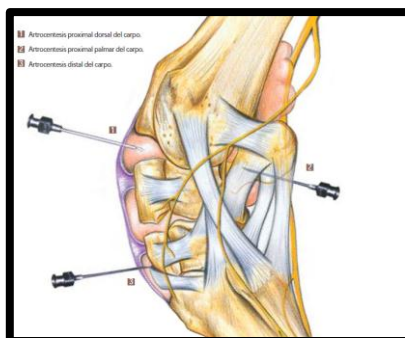


Figura 1: Imagen de la articulación del carpo

#### **TARSO (articulación tibio-tarsal)**

La articulación del tarso si presenta distensión su abordaje es sencillo. La sinoviocentesis se realiza con el caballo en estación insertando la aguja al lado de la vena safena en el lado medial del receso dorsal [11].

El receso dorsal de la articulación tibiotarsal también puede ser abordado por la cara lateral. La artrocentesis de los recesos plantares lateral y media son de fácil acceso si existe distensión articular. (Figura 2)

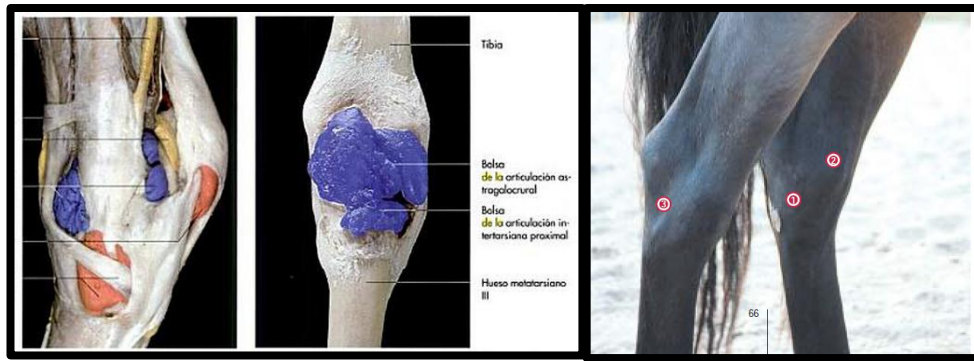


Figura2 Recesos sinoviales articulación corvejón. (Imagen de la izquierda) puntos anatómicos de posible artrocentesis en el corvejón (Imagen derecha).

### 3.1.4 ANÁLISIS DE LÍQUIDO SINOVIOL.

El líquido articular normal o sinovia, es de color amarillo pálido, claro y viscoso. Un gran volumen de líquido turbio con baja viscosidad es el primer indicativo de que algo en esa articulación no va bien [9].

El recuento de células nucleadas en un líquido sinovial normal debe ser menor a  $0.5 \times 10^9$  células /L ( $< 500$  células/ $\mu$ l) y con un número de neutrófilos menor del 10% y un recuento de proteínas menor a 2g/dl [31].

	NORMAL	OSTEOARTRITIS	SEPSIS	POST ARTROCENTESIS
Viscosidad	Viscoso y filante (2.5-5cm)	Se reduce la viscosidad	Se reduce la viscosidad	
Proteínas totales (g/dl)	$<2$	0.8 – 3.5	$>4.0$	1.5 – 2.5
Células nucleadas (cels/ $\mu$ l)	$<500$	$\leq 1000$	$>30000$ sugestivo $>100000$ patognomónico	1000 - 4000
Neutrófilos (%)	$<10$	$< 15$	$>90$	50
Células mononucleares (%)	$>90$	$>85$	$<10$	50

Tabla 1. : Datos de parámetros de viscosidad. Proteínas totales, y conteo celular en diferentes estados articulares (normal, séptico, osteoartritis sepsis y post artrocentesis)

En la tabla 1 se puede observar los valores normales de sinovia en condiciones normales, y los cambios que se pueden ver en el líquido sinovial en diferentes condiciones como puede ser una patología articular (osteoartritis y artritis séptica), y tras una artrocentesis [31].



### 3.2 CÉLULAS MADRE

Actualmente la medicina regenerativa se presenta como una de las grandes alternativas para la recuperación de las funciones perdidas por tejidos dañados, bien por enfermedades hereditarias o bien por lesiones sufridas a lo largo de la vida del individuo [34].

La herramienta principal de la medicina regenerativa es la terapia celular, es decir, la introducción de células dentro del propio tejido. En la actualidad las células más empleadas en la terapia celular son las células madre [35].

El término célula madre fue acuñado por primera vez en el siglo XIX, por el Doctor Edmun Beecher Wilson, quien la describió como una célula germinal primordial mitóticamente en reposo [36].

En general, una célula madre se define como una célula que tiene la capacidad de dividirse (autoreplicarse) por periodos indefinidos durante toda la vida del individuo, permaneciendo indiferenciada y que bajo las condiciones apropiadas o señales correctas del microambiente celular pueda dar origen (diferenciarse) a diferentes linajes con características y funciones especializadas [37].

Las células madre pueden clasificarse de tres maneras:

1. Según su potencial de diferenciación .De acuerdo al tipo de tejido que originan existen cuatro tipos de células madre:

a. **Células totipotentes** :Estas células tienen el poder de generar un embrión completo ya que son capaces de diferenciarse a todos los tipos celulares existentes, tanto a estructuras embrionarias(como placenta o cordón umbilical) como a extraembrionarias(resto de células que formaran parte del individuo)

b. **Células pluripotentes**: Células que puedan dar origen a progenitores que forman cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo, y ectodermo. Para que una célula madre sea considerada pluripotente tiene que ser capaz de diferenciarse a progenitores especializados procedentes de cualquier capa embrionaria; demostrar su funcionalidad *in vivo* e *in vitro* de las células en las que se ha diferenciado y que se produzca un asentamiento claro y persistente de éstas en el tejido, tanto en presencia como en ausencia de daño de los tejidos en los que se injerta.

c. **Células multipotentes**: Son aquellas que pueden dar origen a precursores relacionados únicamente con una de las tres capas embrionarias.

d. **Unipotentes**: este tipo celular sólo pueden generar células hijas que se diferencian a lo largo de una sola línea celular, que es el del tejido donde residen.

## 2. Según el tejido de origen

- a. **Células madre embrionarias**, obtenidas a partir de las primeras etapas de formación del embrión (mórula o blastocisto)
- b. **Células madre germinales**, aisladas a partir de la línea embrionaria de producción de espermatozoides y óvulos.
- c. **Células madre fetales**, aparecen en tejidos y órganos fetales pero presentan características similares a las células madre presentes en los tejidos adultos.
- d. **Células madre adultas**, se encuentran en la mayoría de los tejidos de un individuo

En 2006, Yamanaka y colaboradores, crearon, in vitro, a partir de células adultas de ratón un nuevo tipo de células madre, las **células IPS** (células madre pluripotentes inducidas), Este tipo celular fueron generadas mediante la introducción de 4 factores retrovirales de transcripción en embriones de ratón y fibroblastos adultos. La expresión de estos genes exógenos lograba rediferenciar a la célula diana logrando que se transformase en una célula que compartía con las células embrionarias propiedades muy similares incluyendo el potencial de desarrollo. Este estudio de referencia también se realizó en 2007 por Takahashi, y colaboradores logrando al igual que ocurrió en ratón, células IPS capaces de diferenciarse a células de tejidos pertenecientes a las tres capas germinales de un embrión (endodermo, mesodermo y ectodermo)

Aunque estos estudios todavía están en sus etapas iniciales, y queda mucho por comprender y estudiar en lo relativo a las células IPS, este tipo de células madre se muestran como una muestra una gran promesa para el tratamiento de múltiples enfermedades [38].

### 3.2 1 CELULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales (MSC: *mesenchymal stem cells* ) son células madre adultas que derivan de la capa embrionaria del mesodermo, por lo que van a ser capaces de diferenciarse a células que conforman los tejidos derivados de esa misma capa, como son hueso, cartílago, músculo, estroma medular, tendones, ligamentos, grasa y otros tejidos conectivos . La capacidad de diferenciación de estas células no parece limitarse a estos tejidos, ya que también se ha demostrado capacidad de diferenciación a células de otras capas, como por ejemplo tejido neurogénico, células pancreáticas o células hepáticas.[39, 40].

Las células mesenquimales fueron descritas por primera vez por A.J. Friedenstein y colaboradores en 1970 [41, 42]. Partiendo de la médula ósea de ratones y cobayas consiguieron aislar una población de células que podían adherirse al plástico de las placas de cultivo y mostraban la capacidad de formar colonias con una morfología de fibroblasto. Por esta razón, en primera instancia, a estas células se les denominó CFU-F (Colony-Forming Unit like Fibroblast).

Durante los años 70 y 80 estas CFU-F aisladas de la médula ósea se fueron analizando y caracterizando su proliferación, autorrenovación y

diferenciación a los distintos linajes posibles [43] En los 90 se desarrollaron protocolos de aislamiento y expansión, además del inicio de las aplicaciones clínicas por el equipo de Caplan. En 2002 Zuk y sus colaboradores comenzaron los estudios en humanos sobre las MSC con origen en el tejido adiposo: definiendo su aislamiento y caracterización (proliferación, potencial de diferenciación [21].

Con lo obtenido en estos estudios llegaron a la conclusión de que las MSC del tejido adiposo presentan un fenotipo y características similares que no idénticas a las procedentes de la médula ósea que previamente habían sido caracterizadas

La medula ósea es la principal fuente de aislamiento de MSC aunque se han conseguido obtener de numerosos tejidos como son el tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, cartílago, hueso trabecular, sangre de cordón umbilical, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal.

La facilidad de aislamiento y otras características como la tasa de proliferación, el potencial de diferenciación y fenotipo van a variar dependiendo de las fuentes de origen de las que se obtengan las células.

A pesar de que haya más de 30 años de estudio de las células mesenquimales todavía existe una gran controversia sobre su nomenclatura, pueden recibir el nombre originario de CFU-F, células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells* MSC), células madre estromales (*mesenchymal stromal cells* MSC) o células mesenquimales progenitoras (*mesenchymal progenitor cells* MPC). [37, 44]

Además la falta de ensayos especializados y marcadores concretos hace complicada la selección positiva de estas células respecto a otros tipos celulares adherentes que pueden encontrarse en el tejido de origen del que se extraen.

Por ello la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) en 2006 determinó una serie de criterios para caracterizar y definir a las MSC humanas [45]:

- 1 Capacidad de adherencia al plástico del material de cultivo.
- 2 Expresión de ciertos de superficie (analizados por citometría de flujo): más de un 95% de CD105 (endoglina), CD73 (SH2 y SH3) y CD90 (Thy-1); y menos de un 2% de CD45 (antígeno común de leucocitos), CD34 (marcador de células precursoras de células hematopoyéticas), CD14 o CD11b y CD79α o CD19 o HLA-DR.
- 3 Multipotencialidad de diferenciación a osteoblasto, adipocito y condrocito.

En general, para las MSC de todas las especies estos criterios también deberían de ser válidos para poder afirmar que el tipo celular con el que se está trabajando corresponde con el de célula mesenquimal. Pero el criterio de los antígenos de superficie que definen el fenotipo puede no ser del todo válido debido a la falta de especificidad de los anticuerpos utilizados en citometría, ya

que la mayoría de ellos están desarrollados para la detección en la especie humana o murina y por tanto pueden dar un falso negativo por esta falta de reactividad [46].

### 3.2.1.1 CARACTERIZACION DE LAS CÉLULAS MADRE

Para caracterizar las MSC equinas se van a describir a continuación una serie de parámetros relacionados con sus diferentes capacidades.

- **PROLIFERACION**

Debido a la facilidad de establecer cultivos in vitro y su proliferación en los mismos, las células madre mesenquimales son un interesante modelo de estudio [47]. Estas células son capaces de expandirse en cultivo a un ritmo de 20 a 50 doblajes en 10 semanas.[48] en el caso de la especie humana este ritmo es de un doblaje a los 4 días [49], en las células de nuestro estudio este tiempo de crecimiento es mayor al igual que se ha podido comprobar en otras especies [50, 51].

- **FENOTIPO**

Para reconocer e identificar MSC es importante el conocimiento de su fenotipo específico para así poder aislarlas de otras células que las acompañan y que pueden contaminar el cultivo. Aunque las MSC fueron descritas como células similares a fibroblastos, la morfología puede variar según la fuente de obtención, por ejemplo, cuando se aíslan a partir de sangre de cordón umbilical el 93% de la población celular tiene un aspecto ovoide, con respecto al 7% similar a fibroblastos, pero cuando son aisladas a partir de medula ósea la relación de células fibroblastoides es mayor con respecto a las ovoides [44].

En el caso de las MSC no existe un marcador que lleve a la identificación inequívoca de esta población celular en los diferentes tejidos donde la podemos encontrar, por ello la forma de caracterizarla es a través de la presencia o ausencia de determinados antígenos de superficie [52].

- **DIFERENCIACIÓN CELULAR**

Las células madre mesenquimales al derivar de la capa mesodérmica embrionaria poseen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos, condrocitos, tenocitos y mioblastos. [44, 53]

En el nicho natural de las MSC, éstas permanecen en quiescencia en un estado G0/G1 a la espera de estímulos que indican que deben comenzar a multiplicarse, in vitro esto se puede lograr mediante la adición de diferentes medios de cultivo específicos con inductores adecuados [54].

### 3.2.1.2 RELACIÓN CON EL SISTEMA INMUNE Y LA INFLAMACIÓN

Una característica de las MSC que está siendo estudiada actualmente con gran interés es la relación de las MSC con el sistema inmune [4].

Los procesos inflamatorios son, en numerosas ocasiones, el inicio de enfermedades o problemas más graves cuya evolución, tratamiento y diagnóstico dependen en gran medida del desarrollo de los mismos. Este es el caso, por ejemplo, de las lesiones en el ámbito deportivo, los procesos autoinmunes o la enfermedad injerto contra huésped.

Las MSC ejercen un efecto inhibitorio profundo tanto *in vivo* como *in vitro* sobre la proliferación de los linfocitos T y muestran efectos similares sobre las células B, las células dendríticas y las células naturalkiller pero en ninguno de los casos hay indicios de que las MSC induzcan apoptosis. Además, parece que la capacidad inmunomoduladora de las MSC es más efectiva cuando entran en contacto con las células inmunológicas que a su vez secretan factores solubles entre los que se encuentran la interleuquina (IL)-10, IL-6 e IL-2 o el interferón (IFN)- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  [55].

Además se considera que las MSC son “inmunoprivilegiadas” ya que no expresan en su superficie el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) [56] que está implicado en el rechazo a los trasplantes. Gracias a la ausencia del MHC-II, el tratamiento *in vivo* con MSC no parece provocar respuestas inflamatorias ni rechazos aunque todavía se están llevando a cabo muchas investigaciones al respecto de forma que recientes estudios han mostrado evidencias de que las MSC humanas tienen capacidad de presentar antígenos exógenos en asociación con el MHC-II en presencia de interferón (IFN)- $\gamma$  [57]. Esto sólo sucedería en el momento en el cual las MSC entraran en contacto con las células inmunes en el seno de un proceso inflamatorio ya que las MSC no expresan en condiciones normales el MHC-II, ni otras moléculas coestimuladoras que son esenciales en la presentación antigénica como son CD80 o CD86 [58].

### 3.2.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EQUINAS

El caballo, además de ser paciente dada su relevante importancia económica en los países desarrollados es un buen modelo animal para el desarrollo de tratamientos de lesiones en tendones y ligamentos en la especie humana debido a que la naturaleza de las lesiones en los tendones flexores en caballo es similar a las del tendón de Aquiles en los atletas humanos

Además también es considerado como animal modelo para el estudio de problemas en cartílago articular debido a que la composición molecular y el grosor del tejido es similar al de la especie humana [59]

Finalmente, hay que destacar que el caballo puede ser sometido a un proceso de entrenamiento y rehabilitación tras la aplicación de la terapia, al igual que se hace en los tratamientos humanos, seguimiento que es imposible de aplicar en otros animales modelo.

Las MSC equinas, de igual forma que las humanas, pueden obtenerse de diferentes tejidos, siendo la principal fuente de obtención la medula ósea [60], el tejido adiposo y la sangre del cordón umbilical son dos lugares de obtención también muy utilizados [44].

En todos los casos el criterio de aislamiento de las células se ha realizado por medio de la capacidad de adherencia al plástico que poseen. Una vez en cultivo la morfología que adquieren las MSC equinas es la típica de forma de huso extendiendo procesos y mostrando un crecimiento en monocapa [36] Además, las MSC equinas son capaces de formar colonias cuando se siembran a densidades bajas confirmando así su capacidad de autorrenovación

A diferencia de las MSC humanas para las cuales la ISCT ha propuesto criterios mínimos en cuanto al fenotipo, hasta la fecha, no existen criterios universales para la caracterización de las MSC de todas las especies. El principal problema que presenta la caracterización del fenotipo de las MSC equinas es el de la falta de anticuerpos comerciales que muestren reactividad con los epítomos de las moléculas de superficie de esta especie Durante los últimos años se han descrito anticuerpos contra antígenos equinos de los descritos por la ISCT como marcadores de las MSC [61].

Tipo de marcador	Antígeno	Detección
SH2 y SH3	CD73	Negativa
Endoglina	CD105	Positiva
STRO-1		Positiva
HCAM	CD44	Positiva
Cadena LFA- $\alpha$ 1	CD11a	Negativa
Antígeno común leucocitario	CD45	Negativa
Thy- 1	CD90	Positiva
ITGB1	CD29	Positiva
ANPEP	CD13	Positiva
MHC-I		Positiva
MHC-II		Negativa
	CD14	Negativa
	CD164	Negativa

**Tabla 2.** Marcadores de superficie analizados por citometría de flujo en MSC equinas.

En la Tabla 2 Se muestran los marcadores de superficie para los cuales se ha estudiado reactividad con anticuerpos comerciales

En cuanto al potencial de diferenciación, las MSC equinas pueden ser inducidas hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, requisito de la ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) para definir las MSC humanas. El potencial de diferenciación de las MSC equinas varía en función del origen del cual proceden las células [62].

Por último, la capacidad inmunomoduladora de las MSC equinas no ha sido muy estudiada a pesar de que un mejor conocimiento de la misma podría

suponer una mejora en el tratamiento de enfermedades muy comunes en el caballo, sobre todo de competición, en las cuales la inflamación juega un papel esencial [63].

### **3.3 TERAPIA CELULAR**

En la actualidad la medicina regenerativa o ingeniería de tejidos se presenta como una de las grandes promesas para la regeneración y renovación de las funciones perdidas por tejidos dañados, bien por enfermedades hereditarias o bien por lesiones sufridas a lo largo de la vida del individuo [3].

La herramienta principal de la medicina regenerativa es la terapia celular, es decir, la introducción de células dentro del propio tejido. Las células que se utilizan en terapia suelen ser células madre.

Las células mesenquimales constituyen un instrumento atractivo para el tratamiento de diversas enfermedades y dolencias a través de la terapia celular. Las cualidades que las hacen valiosas son su elevada tasa de proliferación, su potencial de diferenciación y su capacidad de modulación de la respuesta inmune [3].

Aunque la terapia celular con células mesenquimales lleva tiempo siendo aplicada todavía se desconoce cuál es el mecanismo de acción de las células infiltradas en el tejido. Existe gran controversia sobre si son las células inyectadas las que se encargan de regenerar el tejido a través de su propia diferenciación, o contribuyen a crear un microambiente en el que a través de la producción y secreción de factores solubles (citoquinas, factores de crecimiento) hace que las células del individuo sean las que reparen el tejido dañado [64].

#### **3.3.1. APLICACIONES DE LA TERAPIA CELULAR EN EL CABALLO**

El caballo es un animal que se utiliza como modelo para la investigación en terapia celular, especialmente para aquellos tratamientos orientados hacia la regeneración de lesiones de los tejidos musculoesqueléticos. Este animal es considerado como modelo animal para el estudio de defectos en las articulaciones debido a que el grosor del cartílago articular y la composición molecular es similar al del cartílago humano [65].

Otra de las razones para considerar el caballo como modelo animal es que el caballo puede ser sometido a periodos de rehabilitación posteriores a la terapia, procedimiento realizado en humanos después de que se les sea aplicada la terapia.

Además, pensando en el équido como paciente, las lesiones articulares son la causa de un 60% del total de las cojeras en caballo. La terapia celular aplicada al campo de las lesiones del aparato locomotor de caballos es esperanzadora. Durante la pasada década, varios ensayos con células madre

han dado resultados positivos en el tratamiento de este tipo de lesiones en caballos [66].

La figura 3 muestra un esquema del proceso completo del tratamiento que recibe un caballo cuando es tratado con terapia celular de MSC. En primer lugar se toma una muestra de los tejidos que contienen MSC del caballo lesionado, generalmente de médula ósea o tejido adiposo. Después, las MSC se aíslan de los tejidos, se expanden durante varios pases en un medio de cultivo adecuado, se reimplantan en la lesión del animal por ecografía y finalmente, el animal sigue un programa de ejercicios de recuperación en el que la intensidad se incrementa gradualmente con los meses.

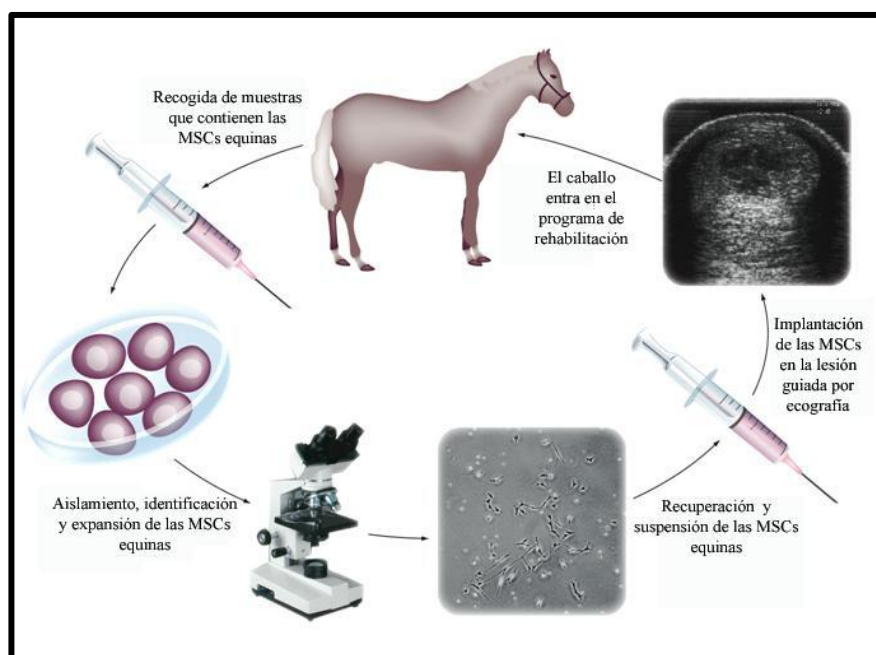


Figura 3 Esquema del tratamiento con MSC a caballos con lesiones relacionadas con el sistema locomotor. Adaptado de VetCell MS-EQ™.

### 3.3.2 TRATAMIENTO DE LESIONES DE CARTÍLAGO EN CABALLOS

La etiología de las lesiones en el cartílago articular en caballo incluye el padecimiento de enfermedades (como la osteoartritis) y los traumatismos. La consecuencia en ambos casos es la aparición de cojera en el animal y por tanto un pobre desarrollo de su actividad, que puede terminar obligando al animal a retirarse de la competición[9]. Los tratamientos agresivos como la microfractura, consistente en la perforación del hueso subcondral para atraer a células y factores de crecimiento hasta la lesión, no han dado buenos resultados [67].

Por el contrario, la utilización de la terapia celular para el tratamiento de articulaciones con condrocitos sanos ha demostrado que estimula la producción de matriz extracelular y preserva el fenotipo de los condrocitos en el tejido [68].

Sin embargo, la terapia celular basada en el implante de condrocitos autólogos presenta limitaciones, como la obtención de las células y el número



limitado de pases que pueden estar estas células en cultivo antes de desdiferenciarse. La utilización de MSC se plantea como la terapia celular con grandes posibilidad de éxito en caballos. Hasta el momento se han utilizado MSC procedentes de distintas fuentes. Wilke y colaboradores, [69] realizaron inyecciones intraarticulares de BM-MSC junto con fibrina en lesiones inducidas obteniendo una mejora de las características de la articulación a corto plazo frente a los controles de fibrina sola. Sin embargo, a largo plazo no se observaba esta diferencia, posiblemente debido a la muerte de las MSC inyectadas

La seguridad de la terapia con MSC en el tratamiento de estas patologías también ha sido objeto de estudio en la especie equina.

Carrade y colaboradores [56] realizaron uno de los primeros experimentos para estudiar la respuesta inmune en articulaciones sanas tras el tratamiento con MSC autólogas y alogénicas derivadas de placenta. El estudio citológico y clínico de este experimento no reveló signos ni de infección ni de rechazo en las articulaciones tratadas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se ha llevado a cabo un estudio cruzado prospectivo con 6 caballos de experimentación sanos, para conocer el efecto del uso intraarticular de células madre mesenquimales autólogas y alogénicas obtenidas de la médula ósea (BM-MS).C).

El estudio está dividido en 5 fases:

- Extracción, aislamiento, cultivo y criopreservación de las BM-MS
- Diferenciación y caracterización de las células obtenidas
- Experimento 1: inoculación articular de 20-25 millones de BM-MS AUTOLOGAS resuspendidas en 3 ml de RL en la articulación tarso crural de los 6 caballos y evaluación de la respuesta inflamatoria local. La articulación tarso crural contralateral se emplea como control, inyectando el mismo volumen de RL.
- Experimento 2: inoculación articular de un *pool* de 20-25 millones BM-MS ALOGÉNICAS en la articulación carporadial y evaluación de la respuesta inflamatoria local. Este experimento se realiza con los mismos 6 caballos. La inoculación se lleva a cabo 10 días después de la del experimento 1, o cuando los parámetros estudiados en el experimento anterior se han normalizado. La articulación carpo radial contralateral se emplea como control, inyectando el mismo volumen de RL.
- Experimento 3: reinoculación de un *pool* de 20-25 millones de BM-MS ALOGÉNICAS del mismo origen que la en la Experimento 2 y en la misma articulación, evaluando la respuesta inflamatoria local. La reinoculación se lleva a cabo 10 días después de la del experimento 2, o cuando los parámetros estudiados en el experimento anterior se han normalizado. La articulación carpo radial contralateral se emplea como control, inyectando el mismo volumen de RL.

En los dos primeros experimentos la elección de en qué articulación (izquierda o derecha) se inocula el RL (control o las MS) se toma de forma aleatoria. En el experimento 3 las MS y el RL se inocularon respectivamente en las mismas articulaciones que en el experimento 2.

Los experimentos fueron de doble ciego, es decir el operador que realiza las inyecciones desconoce que es lo que se está inoculando (MS o RL). El mismo operador es quien evalúa la magnitud de respuesta inflamatoria de cada articulación sin conocer qué es lo que se ha inyectado. En veterinaria el paciente tampoco sabe que es lo que se le ha inyectado, por lo que realmente es un ensayo de “triple ciego”.

En todas los experimentos, el grado de inflamación articular se valoró a los tiempos 0h, 24h, 48h, 72h, 5días y 10 días, tomando el valor 0h obtenido previo a la inoculación como valor basal. Si el día 10 post inoculación los

valores alcanzados no se asemejan a los valores basales no se consideran normalizados y se seguirán tomando muestras cada 10 días hasta alcanzar la normalidad.

Ningún animal recibió tratamiento antiinflamatorio, antibiótico o analgésico durante los experimentos.

## **4.2. ANIMALES**

Para la realización de este estudio se contó con 6 animales de razas de silla o sus cruces, tres machos y tres hembras, de diferentes capas y con edades comprendidas entre los 3 y 7 años. Ningún animal previo al estudio presentaba signos de enfermedad articular ni cojera.

Todos procedimientos llevados a cabo con los animales fueron realizados respetando la Normativa sobre el bienestar animal de la Universidad de Zaragoza.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo licencia del proyecto PI 09/12 (TERAPIA CELULAR EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS INDUCIDA EN CABALLOS: CAPACIDAD INMUNOMODULADORA Y ANTIINFLAMATORIA "IN VITRO" E "IN VIVO" DE LAS MSCS DE MÉDULA ÓSEA), aprobado por La Comisión Ética Asesora para Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El cuidado y uso de animales se realizaron en consecuencia con la política española de protección de Animal RD1201/05, que cumple con la Unión Europea Directiva 86/609 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

## **4.3. EXTRACCIÓN DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES**

### **4.3.1. ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA**

El aspirado de la médula ósea se realizó en un potro de contención con los animales en estación previa sedación con romifidina (0.04 mg/kg) y butorfanol (0.02 mg/kg).

El procedimiento se llevó a cabo en la zona del esternón concretamente a la altura de la 5ª esternebra tal y como se ha descrito en trabajos previos [70]. El área a incidir se preparó asépticamente mediante el rasurado y desinfección de la zona y se inyectó anestésico local (1-3 ml de lidocaína + adrenalina).

A continuación y todo de manera estéril, se procedió a la obtención de la médula para ello se utilizó una aguja de biopsia, Jamshidi de 11G y 10 cm, se puncionó hasta llegar a la parte medular de la esternebra y se obtuvieron de cada animal 60 ml de médula recogidos en 3 jeringuillas de 20 ml precargadas con 2 ml de heparina sódica (10.00 UI/jeringuilla). (Figura 4)

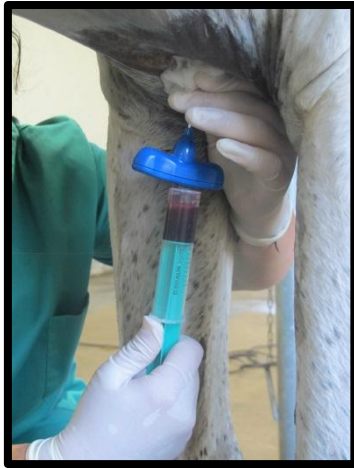


Figura 4. Extracción de médula ósea.

#### 4.4. AISLAMIENTO EXPANSIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN.

Las muestras obtenida con heparina, se diluyeron en PBS pH 7,4 (Gibco) en una proporción 1:3 (aspirado: PBS) y homogeneizaron. A continuación la dilución se depositó sobre un gradiente de Ficoll (Lymphoprep, densidad: 1,077 g/mL), con cuidado de no mezclar las dos fases, en una proporción 2:1 (dilución de médula: gradiente de Ficoll) en un tubo de 50 mL (BD Falcon). Los tubos se centrifugaron a una velocidad de 1800 r.p.m. durante 20 minutos sin freno en la centrífuga.

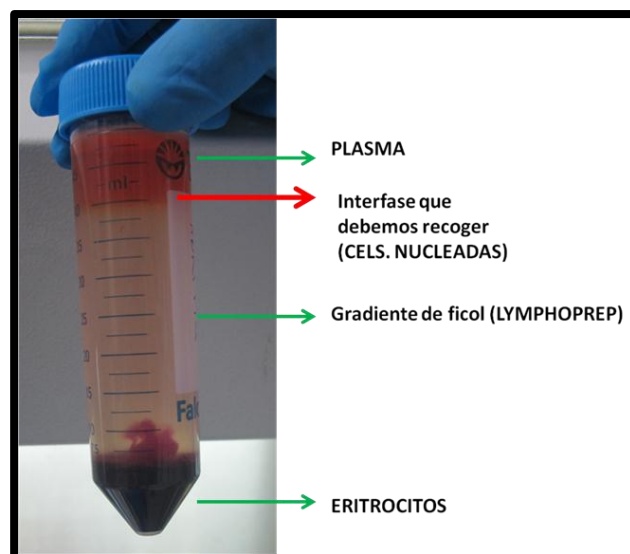


Figura 5. Distribución de las capas de células tras el gradiente de Ficoll

Las células presentes en el aspirado se fraccionaron en diferentes capas (Figura 5) según su densidad: en la parte inferior quedaron los eritrocitos, en medio el gradiente de Ficoll, sobre él las células nucleadas, encima el plasma y en la parte superior grasa.

Se recogieron las fracciones de las células nucleadas, ya que son las que están enriquecidas con MSC y se traspasaron a un nuevo tubo de 50 mL.

Se lavaron con el mismo volumen de PBS y centrifugaron 5 minutos a 1700 r.p.m., dos veces.

El pellet generado se resuspendió en 10 mL de medio basal de crecimiento, que estaba formado por DMEM Low Glucose (Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino) (Gibco), 1% de estreptomicina y penicilina (Sigma-Aldrich) y 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich).

Del resuspendido se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L, que se centrifugó 5 minutos a 2000 r.p.m. El pellet se resuspendió en 50  $\mu$ L de Red cell lysis buffer (Sigma-Aldrich) y se dejó incubar 15 minutos para eliminar los eritrocitos de la alícuota. Las células nucleadas se contaron en una cámara de Neu Bauer con azul trypan colorante vital, que nos permite diferenciar células muertas o que poseen una falta de integridad de la membrana de células viables, ya que las primeras adquieren una tonalidad azul.

Las células nucleadas fueron sembradas finalmente a una concentración de 2.000.000 células/cm<sup>2</sup> en *flask* (o botellas) de diferentes tamaños ajustándonos al número de células por centímetro cuadrado. .

Se realizaron lavados, a las 24 horas, 48 horas y 72 horas con PBS, dos veces, y se les cambió el medio con el objetivo de dejar en cultivo sólo a las células adherentes. Posteriormente, se cambió el medio cada 3 ó 4 días.

Cuando las células se hallaron cercanas a un 80%-90% de confluencia, es decir, cuando el 80% -90% de la superficie de la placa de cultivo estaba ocupada por células, se trataron las células, con 25% de Tripsina 0,25% EDTA (Sigma), se lavaron, se contaron (manualmente, con una cámara de NeuBauer o electrónicamente, con un contador Coulter Z series) y se resembraron a una densidad de 5000 c/cm<sup>2</sup>, en Flask de T25 (4 mL de medio), T75 (10 mL de medio) o T175 (20 mL de medio) (Sigma-Aldrich) según el número células obtenidas. En este punto las células se encontraban en Pase 1. Se realizaron cambios de medio 2 veces por semana. Este proceso se repitió sucesivamente hasta que las células llegaron a Pase 3. (Figura 6)

Cuando las células se encontraron en un pase dos en el momento de ser tripsinizadas y llevadas a un pase tres, parte de ellas se criopreservaron para utilizarlas con posterioridad como células alogénicas en los otros individuos del experimento.

Estas células se alicuotaron en criotubos (Nalgene) a razón de 10<sup>6</sup> de células por mililitro en un medio de congelación formado por 90% FBS y 10% del crioprotector DMSO (Dimetilsulfóxido) y se congelaron dentro de un *criobox* con isopropanol durante las primeras 24 horas a -80°C. y posteriormente en nitrógeno líquido.

En cada pase una alícuota de las células obtenidas se criopreservó con el fin de obtener un pequeño banco de células de cada animal y de cada pase por si en algún momento existiese algún problema de contaminación

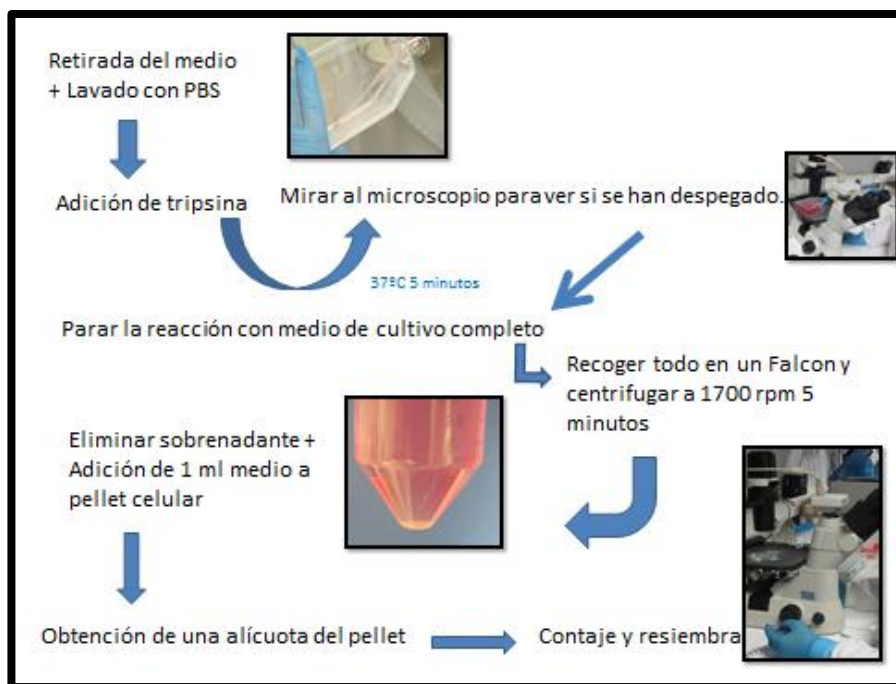


Figura 6.. Esquema de realización de pase celular.

#### 4.5. DIFERENCIACION Y CARACTERIZACION DE LAS MSC

En colaboración con el laboratorio de genética bioquímica (LAGENBIO) de la Universidad de Zaragoza, se llevó a cabo la inducción de las MSC hacia los linajes mesodérmicos, en diferentes condiciones de cultivo en función de los requerimientos de cada una de ellas. La valoración de las diferenciaciones se llevó a cabo por medio de tinciones específicas. Tanto la inducción como la valoración de la misma se realizaron mediante la metodología de Ranera y cols 2011 [71].

#### 4.6. DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS BM-MSCS

Posteriormente y así mismo en colaboración con LAGENBIO se determinó el fenotipo de las BM-MSC utilizando PCR en tiempo real. Se analizó la expresión génica de *CD13*, *CD49d*, *CD73*, *CD105*, *CD106*, *CD146*, *CD166*, *CD29*, *CD34*, *CD45* y *CD31*. La metodología específica utilizada es la descrita en Ranera y cols 2012 [72].

#### 4.7. VALORACIÓN DEL GRADO DE INFLAMACIÓN DE LA ARTICULACIÓN

A continuación se describen las diferentes determinaciones clínicas y laboratoriales que se llevaron a cabo para cuantificar el grado de inflamación de las articulaciones. Estas valoraciones se realizaron, como ya se ha indicado, inmediatamente antes de comenzar cada experimento y a los tiempos 24, 48, 72 horas, 5 y 10 días.

Se evaluaron, según el experimento, las articulaciones carporadial y tarsocrural, mediante examen del aparato locomotor, estudio ecográfico de las articulaciones y determinación laboratorial del líquido articular.

**Examen visual** de la articulación, prestando especial atención a la presencia o no de sinovitis.

#### **Medición del perímetro articular** con una cinta métrica.

En el caso de la articulación carporadial, como ayuda al examen visual, se empleó una cinta métrica que se colocó siempre en la misma posición, pasándola por la parte media del hueso pisiforme, rodeando la articulación. Estas valoraciones fueron siempre realizadas por el mismo operario

#### **Examen del aparato locomotor**

Se realizó un estudio estático y dinámico de las los animales incluidos en este experimento, clasificando los grados de cojera de 0-5, antes y después de los test de flexión de las articulaciones a estudio, según los parámetros establecidos por la AAEP [73], así como mediciones del perímetro articular mediante el uso de una cinta métrica, de las articulaciones que iban a ser tratadas posteriormente.

#### **Estudio ecográfico**

El estudio ecográfico se realizó con un equipo modelo HDI-3500 de la marca ATL, con una sonda lineal de 7.5 MHz en el que se evaluó la superficie articular, el espesor entre la piel y la superficie articular, y la distensión de los recesos sinoviales.

Las medidas ultrasonográficas fueron realizadas siempre en el mismo punto anatómico de referencia y por el mismo ecografista. Así en el caso de los corvejones el punto de referencia era el receso dorsomedial inmediatamente por debajo del maléolo medial de la tibia y en el receso lateral justo por debajo del maléolo lateral de la tibia. Y en el caso de los carpos, en el receso proximal dorsal de la articulación radiocarpiana.

De cada animal se realizan 3 mediciones de cada receso a estudiar y se hace la media de estas mediciones para su examen.

#### **Examen de la temperatura articular,**

Mediante termometría láser de superficie (GIM 530 MS Intelligent Multi Purpose Infrared Thermometer) se midió la temperatura de la piel sobre los recesos sinoviales siempre realizarlo en el mismo punto anatómico y realizado por el mismo clínico. Las mediciones se llevaron a cabo en un punto cercano a los recesos lateral y medial de la articulación tarsocrural y del receso proximal dorsal en el caso de la articulación radiocarpiana. Se comparó la diferencia de temperatura existente entre las articulaciones a estudio y las articulaciones control.



### Determinación laboratorial del líquido articular

Se obtuvo una muestra de líquido sinovial de cada una de las articulaciones a estudiar para determinar los valores de proteínas totales y recuento leucocitario. El recuento de proteínas, se realizó nada más ser extraída la sinovia de un tubo sin anticoagulante

Una parte de la muestra obtenida en tubo con anticoagulante fue enviada a un laboratorio externo para la realización de un recuento leucocitario y una citología (Laboratorio de análisis veterinarios del Dr. Barba, C/Puerto Linera, 14. 28935. Móstoles (Madrid) en el que se realizó un recuento leucocitario, y una citología

Otra de las partes obtenidas en tubo con anticoagulante, se centrifugó (veterinary centrifuge, StatSpin An IRIS Company) con el fin de concentrar las células presentes y del *pellet* formado se realizó un frotis para su posterior conteo manual y observación de la tipología y morfología celular.

Sólo se incluyeron en los experimentos animales cuyas articulaciones presentaban valores normales tanto en la exploración clínica como laboratorial, considerando como valores normales PT  $\leq$  a 2 gr/dl y valores leucocitarios  $\leq$  a 1500 células/  $\mu$ l.

### 4.8. INOCULACIÓN ARTICULAR

Las infiltraciones y la toma de muestras se realizaron de manera totalmente estéril, con los caballos en la estación previa sedación con romifidina y butorfanol.

Se obtuvo una cantidad máxima de 3 ml de sinovia de cada extracción articular y ésta fue recogida en tubos con anticoagulante (EDTA) y sin anticoagulante

En el caso de la articulación tarsocrural, las artrocentesis se realizaron siempre accediendo por el receso lateral, justo debajo del maléolo lateral de la tibia en la concavidad que se forma entre el astrágalo y la tibia. (Figura 7)

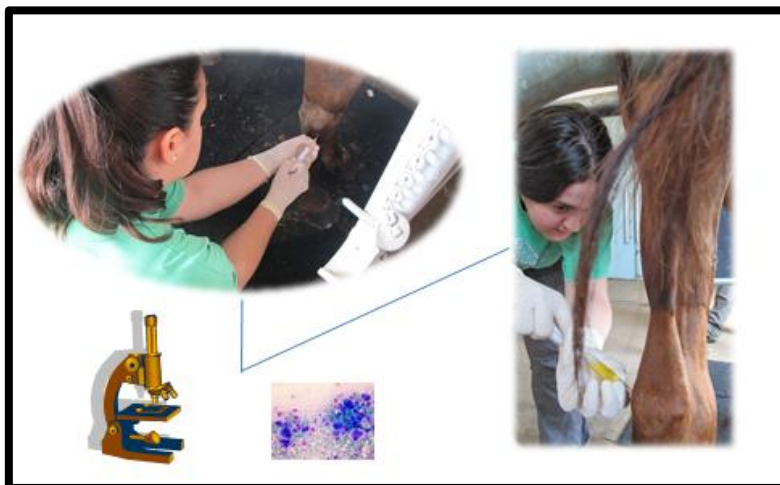


Figura 7. .Extracción de líquido sinovial en la articulación tarsocrural.

En lo referente a la articulación carporadial, la extracción del líquido sinovial se realizó a través del receso dorso proximal.

#### 4.9. PREPARACIÓN DEL *POOL* DE MSC ALOGENICAS

El objeto de estudio de la inoculación de MSC en articulaciones carpales era ver la respuesta inflamatoria de las células alogénicas

Para ello se implantaron en la articulación radiocarpiana un *pool* de MSC alogénicas diluidas en 3 ml y en la misma articulación contralateral, como control, el mismo volumen de RL

El pool consistía en una mezcla de 25 millones de MSC resuspendidas en RL, pertenecientes a 5 animales del estudio, sin incluir el individuo que iba a ser inoculado. Es decir, cada caballo recibió una mezcal de 25 millones de MSC provenientes del resto de los animales del estudio, pero sin contener las suyas propias. Figura 8

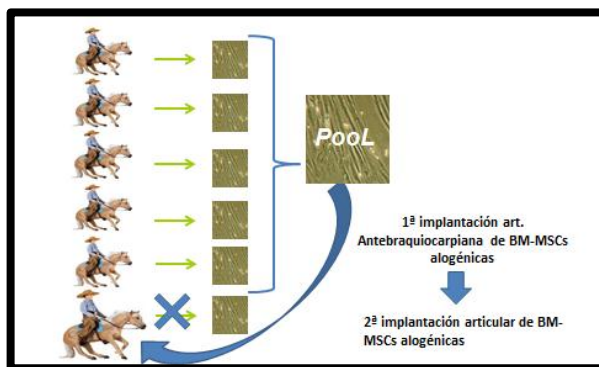


Figura 8. Esquema de realización del *pool* células madre alogénicas.

Todos estos datos fueron recogidos en una hoja Excel para su posterior análisis junto con los exámenes clínicos.

#### 4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros de proteínas totales, recuento de glóbulos blancos así como de la cantidad de neutrófilos fueron analizados estadísticamente con el programa SPSS 15.0. Las pruebas estadísticas realizadas son, el Test de t de Student, para evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos llevados a cabo y para identificar el efecto del tiempo sobre los parámetros estudiados se llevó a cabo el test estadístico ANOVA. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

## **RESULTADOS**

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 EXTRACCIÓN DE MÉDULA ÓSEA.**

En el procedimiento de extracción de médula ósea para la obtención de BM-MSc se obtuvieron aproximadamente 60 ml de médula de cada animal y ninguno de ellos sufrió ninguna lesión asociada al procedimiento ni en los días posteriores a su realización.

### **5.2 AISLAMIENTO, EXPANSION Y CRIOCONSERVACIÓN**

Se pudieron aislar BM-MSc equinas de todos los caballos incluidos en el estudio alcanzando una cantidad de al menos 75 millones de MSC de cada uno de los 6 caballos.

Las células llegaban a una confluencia del 80-90% en 7 -10 días. La velocidad de proliferación en todos ellos estaba dentro de los márgenes normales a pesar de que existieran diferencias individuales significativas siendo más rápida en el caso de los animales más jóvenes. Se pudo alcanzar el número necesario de células para la realización de los experimentos (25 millones en cada uno) en el tercer pase de cultivo.

Las células criopreservadas respondieron adecuadamente al proceso de descongelación, suponiendo éste una pérdida del 30% de las células conservadas. A pesar de esta pequeña pérdida, el 70 % de células restantes se volvieron a someter a cultivo y siguieron un crecimiento normal hasta alcanzar los 25 millones por animal, necesarias para la realización de las fases 2 y 3.

### **5.3 DIFERENCIACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS BM-MSCS**

Las BM-MSc aisladas en el presente trabajo han mostrado capacidad de diferenciación a los tres linajes mesodérmicos: adipogénico, osteogénico y condrogénico en todos los animales utilizados para el ensayo.

En cuanto a los marcadores de superficie, las BM-MSc expresan *CD13*, *CD49d*, *CD73*, *CD105*, *CD106*, *CD146*, *CD166*, *CD29*, *CD34*. La expresión fue negativa para *CD45* y *CD31*.

### **5.4. ARTROCENTESIS**

A pesar del riesgo de artritis séptica que entrañan las artrocentesis seriadas en un periodo relativamente corto de tiempo de una misma articulación, en ninguno de los animales, se desarrolló dicha patología.

El abordaje a la articulación tarsocrural, debido a su amplitud resultó sencillo y no hubo en ningún caso dificultad para la extracción y posterior análisis de la muestra sinovial.

El abordaje a la articulación carporadial resultó más complicado que la realizada en los corvejones teniendo en alguna ocasión que puncionar varias

veces para acceder a la articulación. Este hecho se hacia mas dificultoso si cabe en los momentos en que se realizaban las artrocentesis en periodos de tiempo muy cortos (0h, 24h, 48,72h) hasta el punto en que resulto dificultoso obtener 3 ml en cada muestra. A pesar de ello se pudo realizar con normalidad de las mediciones laboratoriales del líquido sinovial.

### **5.5. EXPERIMENTO 1: VALORACIÓN DE LA INFILTRACIÓN DE MSC ALOGÉNICAS RESPECTO A LA DE RL EN LA ARTICULACIÓN CARPO-RADIAL.**

#### *Valoración clínica*

Ninguna de las articulaciones control, las infiltradas con RL, presentó ninguna anomalía clínica reseñable en toda esta fase del estudio.

En las articulaciones inyectadas con MSC autólogas se observó que:

- En el examen visual de la distensión articular observada fue variable en los diferentes animales, 2 de los 6 presentaron una marcada distensión de la articulación en la extremidad en la que se habían introducido las MSC, ésta alcanzó su grado máximo a las 72h post infiltración reduciéndose progresivamente sin ningún tipo de tratamiento antiinflamatorio local ni sistémico, no apreciándose ninguna inflamación en el día 10 post infiltración. Otros 2 animales del estudio, presentaron una inflamación articular leve que remitió antes de los 10 días post inoculación.
- En los exámenes ecográficos, que también pretenden medir el grado de distensión sinovial, se pudo observar que todos los animales presentaban una cierta distensión sinovial y una mayor proliferación de las vellosidades sinoviales compatible con una sinovitis. En el caso del animal que presentó mayor distensión articular y cojera (caballo 6) se pudo observar que parte de la inflamación que presentaba era pericapsular y que progresaba de manera distal llegando a la parte distal del corvejón.
- En cuanto al examen de temperatura, se observó que en la mayoría de mediciones se obtuvo un ligero aumento en las articulaciones que habían sido infiltradas con MSC en comparación con las articulaciones contralaterales control. La media del sumatorio de las temperaturas registradas durante el experimento fue de 0.5 a 3 °C superior en las articulaciones con MSC que en las control.
- En el examen de cojera dinámico realizado a los 6 animales del estudio sólo uno de ellos presentó un cierto grado de cojera al trote en línea recta (1/5 según clasificación AAEP), que se acentuó cuando se le sometió al caballo al test de flexión global de la extremidad afectada (2/5), el día 10 post infiltración el animal no mostraba ningún tipo de claudicación. Este caso, caballo 6, corresponde al animal que presentaba una mayor distensión sinovial en la inspección visual.

## Valoración laboratorial

### Proteínas Totales

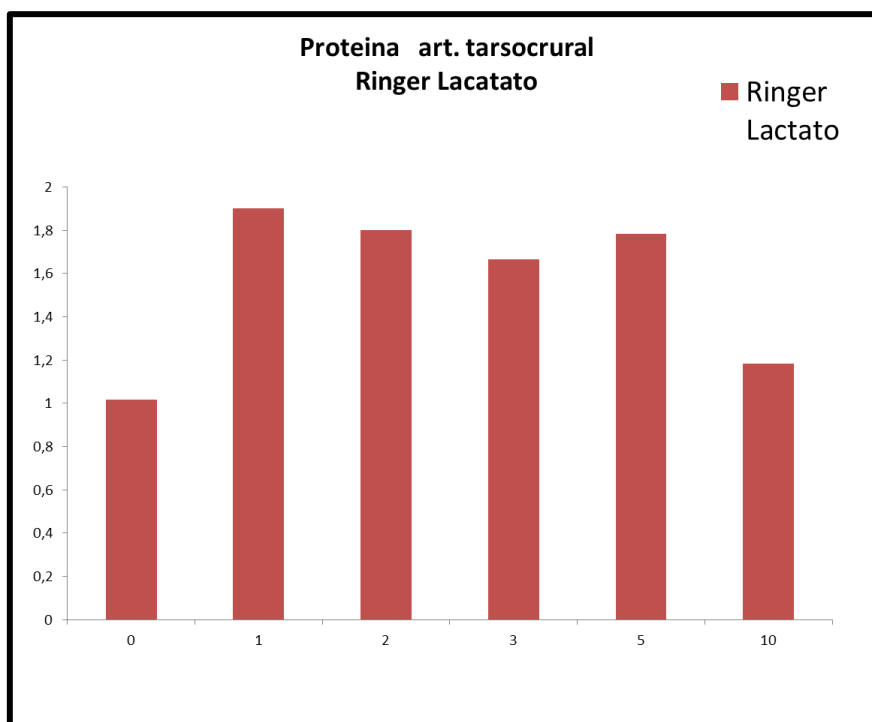
En las articulaciones control (RL), los valores proteicos aumentaron por encima del valor normal (2 g/dl) en 3 de los animales entre las 24 y las 72 horas, siendo el dato más alto recogido de 3.2 mg/dl a las 24 horas post inoculación en el caballo 4. (Tabla 3)

Todos los valores se normalizaron dentro de los 10 días post inoculación

	0h	24h	48h	72h	5d	10d
Caballo 1	1	1,4	2	2,2	2,2	1,2
Caballo 2	1,2	1,8	1,4	2,4	2,2	1,2
Caballo 3	1	2,8	2	1	0,8	0,8
Caballo 4	1,2	3,2	3	2,4	3,2	1,7
Caballo 5	0,8	1	1,2	1	0,9	1
Caballo 6	0,9	1,2	1,2	1	1,4	1,2
media	1,0	1,9	1,8	1,6	1,7	1,1

Tabla 3: Valores proteicos medidos en (gr/dl) obtenidos en el líquido sinovial en la fase 1 del estudio en la articulación tarsocrural control.

Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento en las articulaciones control, se puede determinar que no existen diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento. (Gráfica 1)



Gráfica 1: Valoración proteica (gr/dl) en las articulaciones tarsocrurales control. No se encuentran diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento ( $p < 0,005$ )

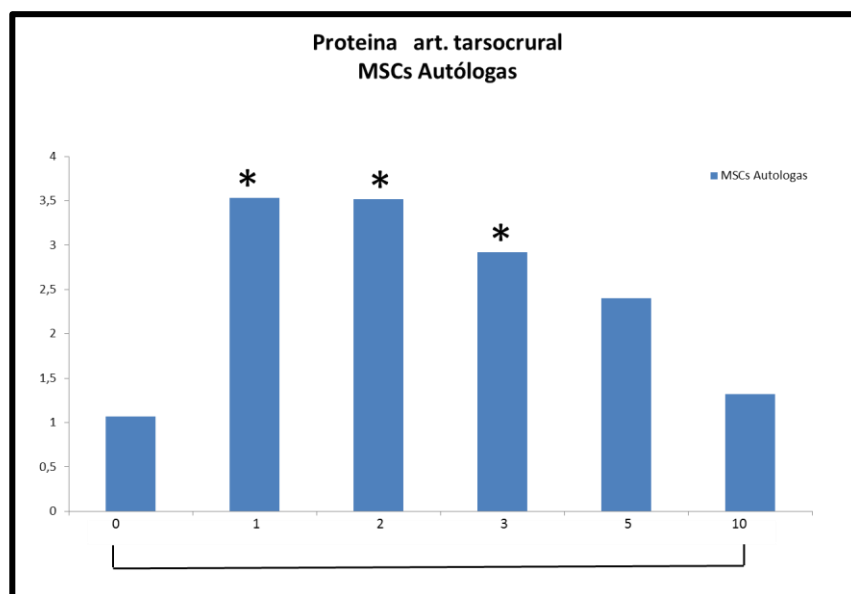
En las articulaciones inoculadas con MSC autólogas, a las 24 horas post inoculación todos los valores superan el umbral de 2g/dl. Tres de los 6 animales del estudio presentaron unos valores proteicos > 4 gr/dl, entre las 24 – 72 horas. Estos valores van disminuyendo lentamente, los días 4 y 5 post inyección sólo 1 de las articulaciones presenta valores dentro de la normalidad (caballo 3). A pesar de esto, el día 10 todos los valores están por debajo del valor umbral. (Tabla 4)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d	30d
Caballo 1	1	3	3,8	3,1	2,2	1,2		
Caballo 2	1	3,2	3,5	3	2,5	1,1		
Caballo 3	1	2,4	1,8	0,8	0,8	0,8		
Caballo 4	1,8	3,8	4,4	3,4	3,4	1,8		
Caballo 5	0,8	4,4	3,6	2,8	2,1	1,8		0,8
Caballo 6	0,8	4,4	4	4,4	3,4	1,2	1	
Media	1,0	3,5	3,5	2,9	2,4	1,3	0,1	0,1

Tabla 4: Valores proteicos medidos en (gr/dl) obtenidos en el líquido sinovial en la fase 1 del estudio en la articulación tarsocrural tratada con MSC autólogas, en los diferentes animales del estudio

En un único caso, el índice de proteínas totales alcanzó un valor más elevado en la articulación infiltrada con RL, que en la contralateral que se inyectaron las MSC. (Caballo 3)

Cómo se muestra en la figura 2, se observan diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) en los valores de proteínas totales entre el día 0 y los días 1, 2 y 3, pero no entre los valores preinyección (0 h) y los días 5 y 10.



Gráfica 2. Valoración proteica a lo largo del tiempo de tratamiento. Existe significación de los días 1, 2 y 3 respecto al día 0. No se encuentran diferencias significativas entre los día 0 y 10, ( $p < 0,005$ ).

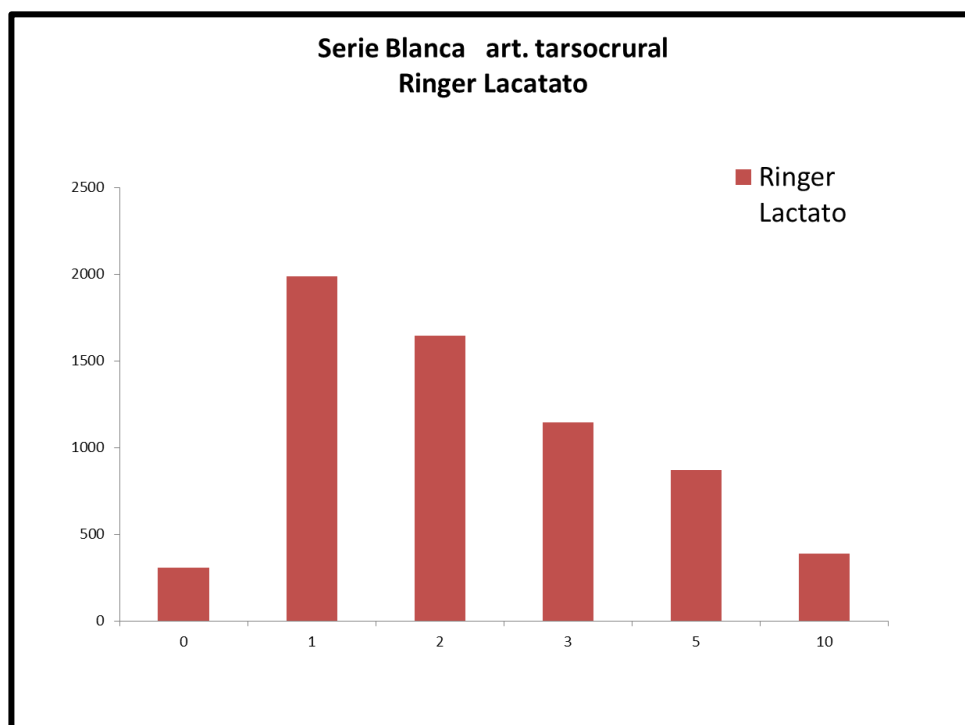
### Recuento leucocitario

En las articulaciones infiltradas con RL, el recuento de leucocitos no sobrepasó en ningún caso las 30000 células/  $\mu\text{l}$ , siendo el valor mas alto recogido de 5833 células / $\mu\text{l}$  a las 48 horas post inoculación (caballo 2) En todos los casos, el recuento de glóbulos blancos se normalizó (suponiendo como normal un valor de 1500 células/ $\mu\text{l}$ ) dentro de los 10 días post infiltración de RL (Tabla 5)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d
Caballo 1	240	2100	625	1250	333	250
Caballo 2	280	3100	5833	556	625	115
Caballo 3	570	230	416	1250	1500	625
Caballo 4	525	5250	1250	1125	1375	520
Caballo 5	120	130	1000	190	140	170
Caballo 6	110	1125	750	2500	1250	645
media	307,5	1989,16	1645,66	1145,16	870,5	387,5

Tabla 5: Valores de células nucleadas medidos en (células/ $\mu\text{l}$ ) obtenidos en el liquido sinovial en la fase 1 del estudio en la articulación tarsocrural control

Tras el estudio estadístico, se pudo determinar que no existen diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento en las articulaciones control en lo relativo al recuento leucocitario (Gráfica 3)



Gráfica 3: Recuento leucocitario (células/ $\mu\text{l}$ ) en las articulaciones tarsocrurales control. No se encuentran diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento ( $p < 0,005$ ).

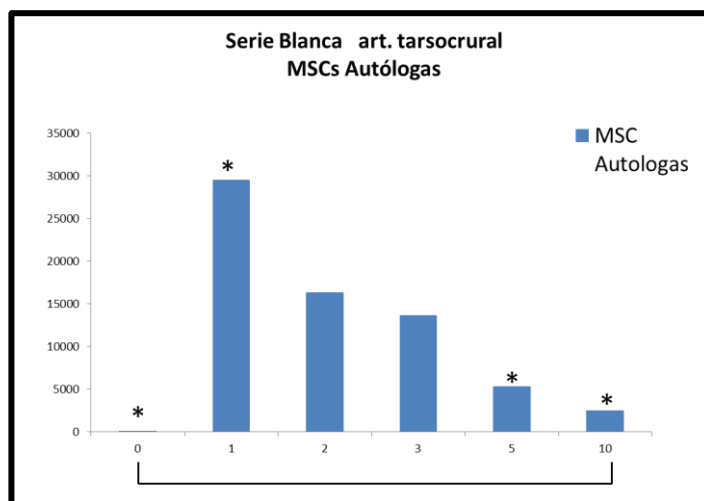


En cuanto al recuento de células nucleadas, en las articulaciones infiltradas con MSC autólogas, al igual que lo ocurrido con las proteínas, en 4 de los animales alcanzaron valores > 30000 células / $\mu$ l, dentro de las 24-48 horas post inoculación. En todos los casos del estudio salvo en dos el recuento leucocitario se normalizó, dentro de los 10 días post infiltración, en los dos casos que no lo hicieron estos valores se normalizaron el día 20 post inoculación en un caso y 30 en otro.(tabla 6)

.	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d	30d
Caballo 1	90	57000	19000	12250	6625	648		
Caballo 2	90	2600	31000	27750	8375	875		
Caballo 3	150	9250	5125	4250	625	1030		
Caballo 4	70	49000	3500	2625	1750	1830		
Caballo 5	70	7110	18800	1740	3220	3910		1500
Caballo 6	120	52200	20875	33500	11625	6625	1150	
Media	98,33	29526,67	16383,33	13685,83	5370,00	2486,33	191,67	250,00

Tabla 6: Valores proteicos medidos en (gr/dl) obtenidos en el líquido sinovial en la fase 1 del estudio en la articulación tarsocrural tratada con MSC autólogas, en los diferentes animales del estudio

En cuanto al análisis laboratorial del líquido sinovial de las muestras recogidas, se pudo observar que sólo existen diferencias significativas entre el día 1post-tratamiento y los días 0,5 y 10 post inoculación. No se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en el día 0 del tratamiento y el día 10 post-tratamiento. (Gráfica 4)



Grafica 4. Recuento leucocitario obtenido en las articulaciones tarsocrurales tratadas con MSC autólogas. Se puede observar que existen diferencias significativas entre los valores del día 1 respecto a los del día 0,5 y 10. No encontrando se diferencias significativas entre el día 0 y el 5 y 10

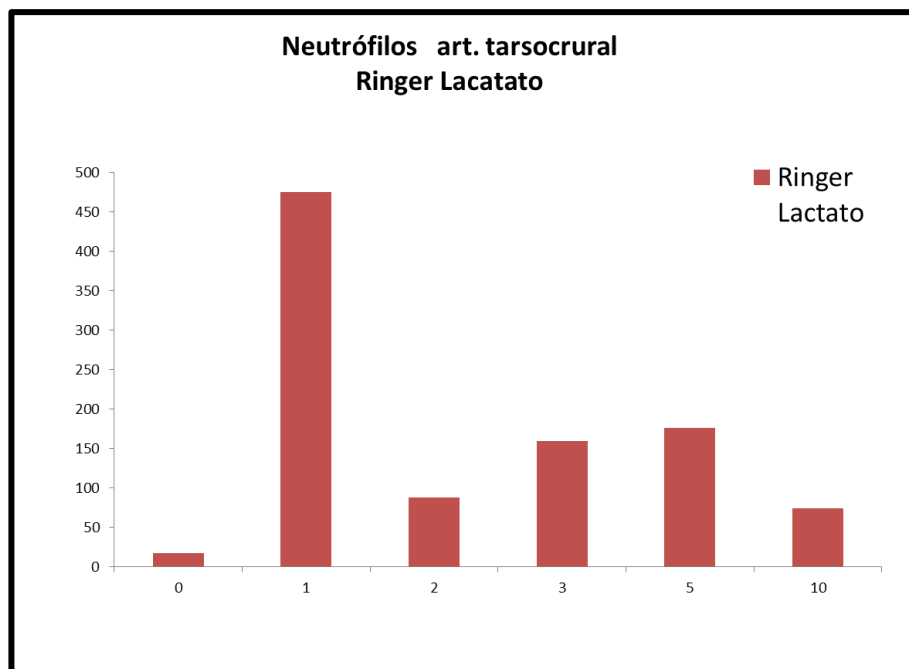
### Neutrófilos

En cuanto al recuento del numero de neutrófilos presentes en el líquido sinovial de la articulación tarsocrural control, se observa que el mayor recuento lo encontramos en la caballo 4 a las 24 horas post inoculación, siendo este de 2520 neutrófilos/  $\mu$ l, Todas las mediciones alcanzan su normalidad considerando un recuento normal de 250 neutrófilos/  $\mu$ l, a los 10 días post inoculación. (Tabla 7)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d
Caballo 1	0,00	84,00	81,25	87,50	6,66	10,00
Caballo 2	0,00	217,00	291,65	5,56	18,75	3,45
Caballo 3	51,30	6,90	8,32	25,00	600,00	168,75
Caballo 4	52,50	2520,00	37,50	56,25	233,75	10,40
Caballo 5	0,00	1,30	60,00	9,50	46,20	10,20
Caballo 6	1,10	22,50	45,00	775,00	150,00	238,65
Medía	17,48	475,28	87,29	159,80	175,89	73,58

Tabla 7: Valores de neutrófilos medidos en (neutrófilos/ $\mu$ l) obtenidos en el líquido sinovial en la fase 1 del estudio en la articulación tarsocrural control

Se pudo determinar que no existen diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento en las articulaciones control en lo relativo al recuento de neutrófilos. (Gráfica 5)



Gráfica 5: Valoración del recuento de neutrófilos (neutrófilos/ $\mu$ l) en las articulaciones tarsocrurales control. No se encuentran diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento ( $p < 0,005$ )

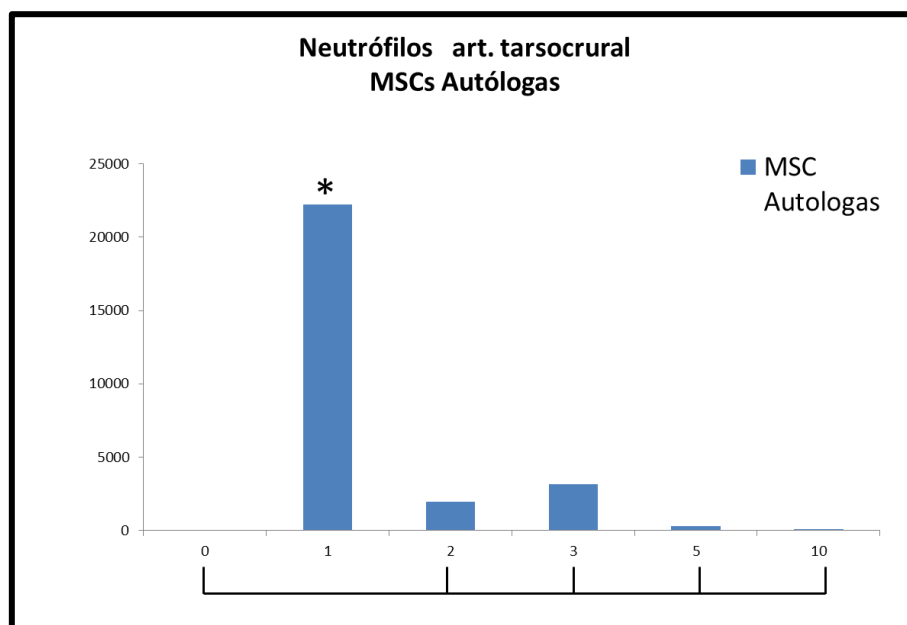
En el caso de las articulaciones tarsocrurales tratadas con MSC autólogas, se puede observar que el número de neutrófilos presentes en el líquido sinovial a las 24 h post inoculación es mucho mas elevado que el

encontrado en ese tiempo en las articulaciones control llegándose a alcanzar en 4 de los 6 animales valores superiores a 3500 neutrófilos/  $\mu$ l, estos valores van disminuyendo lentamente hasta alcanzar en 5 de los 6 casos valores normales (aprox 250 neutrófilos/  $\mu$ l) , el caballo que no se normalizó lo hizo el día 20 post inoculación.(Tabla 8)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d	30d
Caballo 1	2,7	49020	3800	2450	331,25	12,96	0	0
Caballo 2	0	1612	1860	7215	753,75	26,25	0	0
Caballo 3	13,5	3792,5	1076,25	340	50	10,3	0	0
Caballo 4	4,9	39690	1365	52,5	52,5	36,6	0	0
Caballo 5	0	497,7	1504	87	64,4	39,1	0	45
Caballo 6	73,2	38628	2087,5	8710	465	397,5	23	0
Media	15,71	22206,7	1948,79	3142,41	286,15	87,12	3,83	7,5

Tabla 8: Valores de neutrófilos medidos en (neutrófilos/ $\mu$ l) obtenidos en el liquido sinovial en

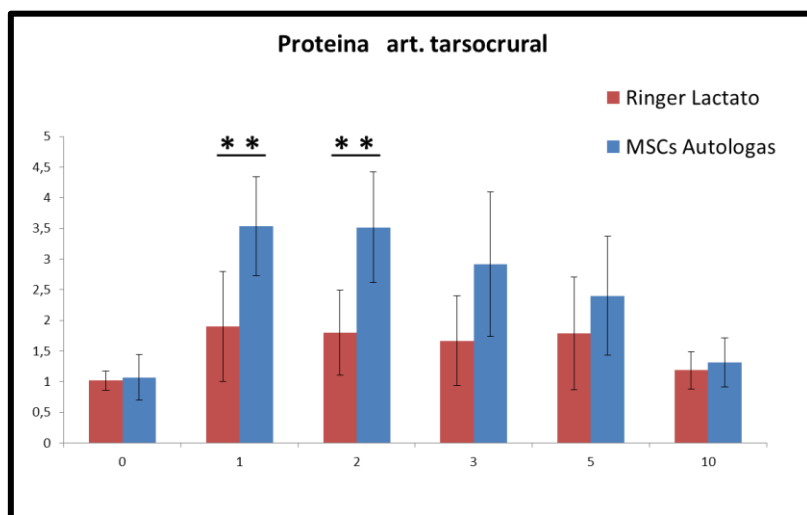
En esta fase del estudio, solo existen diferencias significativas entre el día 1 del estudio y los restantes días post-tratamiento. Tampoco en este parámetro se ha encontrado diferencias significativas entre el día 0 y los días 2, 3. 5 y 10 post-tratamiento. (Gráfica 6)



Gráfica 6. Estudio estadístico del recuento de neutrófilos obtenido en las articulaciones tarsocrurales tratadas con MSC autólogas .Se puede observar que existen diferencias significativas entre el día 1 y los demás días de la fase 1. No encontrándose estas diferencias entre el día 0 y los días 2, 3. 5 y 10 post-tratamiento ( $p < 0.05$ ).

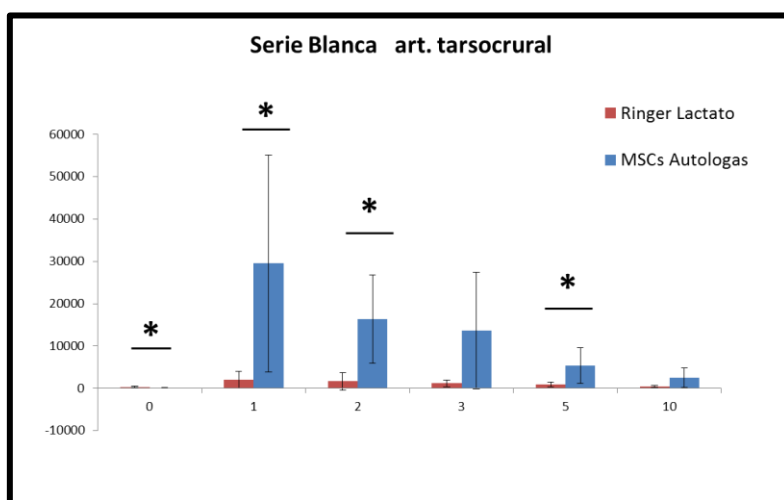
Al realizar una comparativa del efecto del tratamiento en las articulaciones infiltradas con BM- MSC autólogas con las articulaciones control, estadísticamente, observamos que:

- Respecto a la valoración proteica, existe una diferencia significativa en las primeras 48 horas post-tratamiento en las articulaciones inoculadas con MSC autólogas y la extremidad control, no encontrándose esa diferencia significativa entre ambas a partir de las 72 horas. (Gráfica 7)



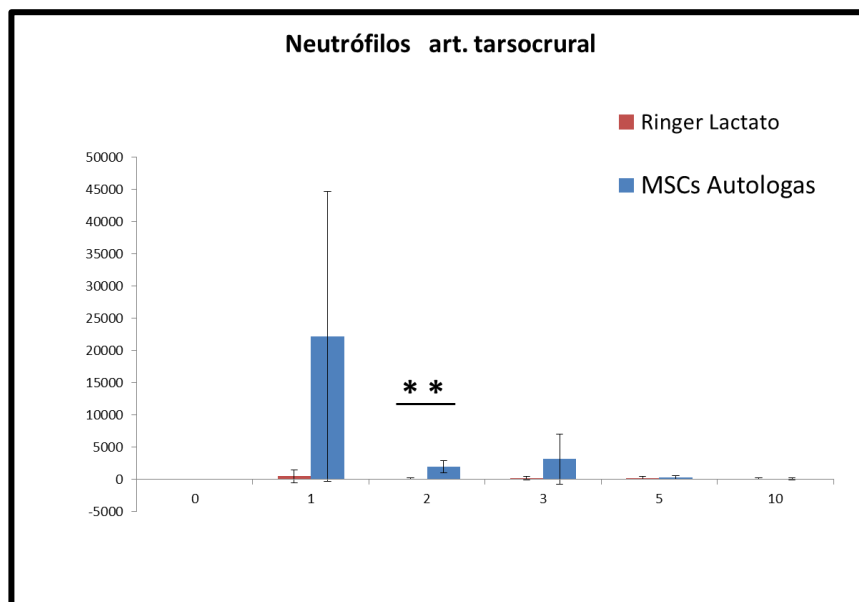
Gráfica 7 Comparación del valor proteico (gr/dl) entre las articulaciones inoculadas con MSC autólogas y las control, con RL a lo largo del tratamiento. Existe diferencia significativa en las primeras 48 horas post-tratamiento en las articulaciones inoculadas con MSC autólogas y la extremidad control, no encontrándose esa diferencia significativa entre ambas a partir de las 72 horas. . ( $p < 0.05$ )

- En el caso del recuento de glóbulos blancos se pudo observar que existen diferencias significativas en los días 0,1,2 y 5 post inoculación entre las articulaciones tratadas con MSC autólogas y las control, no encontrando esa diferencia en el día 10 post tratamiento (Gráfica 8).



Gráfica 8 .Comparación del recuento leucocitario entre las articulaciones inoculadas con MSC autólogas y las control, con RL a lo largo del tratamiento. Existen diferencias significativas en los días 0, 1, 2 y 5 post inoculación entre las articulaciones tratadas con MSC autólogas y las control, no encontrando esa diferencia en el día 10 post-tratamiento. ( $p < 0.05$ )

- En lo relativo a los neutrófilos, solo se encuentran diferencias significativas entre la articulación control y la articulación tratada con MSC autólogas a las 48h post inoculación, no existiendo diferencias significativas entre ambas articulaciones en ninguno otro momento del tratamiento. (Gráfica 9)



Gráfica 9. .Comparación del recuento de neutrófilos entre las articulaciones inoculadas con MSC autólogas y las control, con RL a lo largo del tratamiento. Existen únicamente diferencias significativas a las 48h post inoculación. . ( $p < 0.05$ )

## 5.6 EXPERIMENTO 2 VALORACIÓN DE LA INFITRACIÓN DE MSC ALOGÉNICAS RESPECTO A LA DE RL EN LA ARTICULACIÓN CARPO-RADIAL.

### *Valoración clínica*

En el caso de la valoración de las articulaciones carpales, como apoyo del examen visual, se decidió utilizar la cinta métrica para valorar si existía un aumento del perímetro externo de la rodilla del caballo, observándose que en los carpos tratadas con MSC se produjo un aumento medio de dos centímetros del perímetro carpal mientras que en los carpos control se produjo solamente un aumento medio de un centímetro.

De los resultados obtenidos respecto a las mediciones de temperatura, se observó que en 5 de los 6 animales la diferencia media entre las articulaciones tratadas y controles fue menor a  $1^{\circ}\text{C}$ ,

El examen ecográfico realizado reveló que todos los animales presentaban una leve sinovitis, dentro de las 48-72h post inoculación, ya que se producía un aumento del espesor del receso sinovial medido de entre 0.5-1cm con respecto a las mediciones previas a la inoculación de las células. Estos valores se normalizaron en todos los animales dentro de los 10 días post inoculación.

Ningún animal presentó claudicación en toda esta parte del estudio, ni al paso, ni al trote ni tras la flexión de los carpos.

## Valoración laboratorial

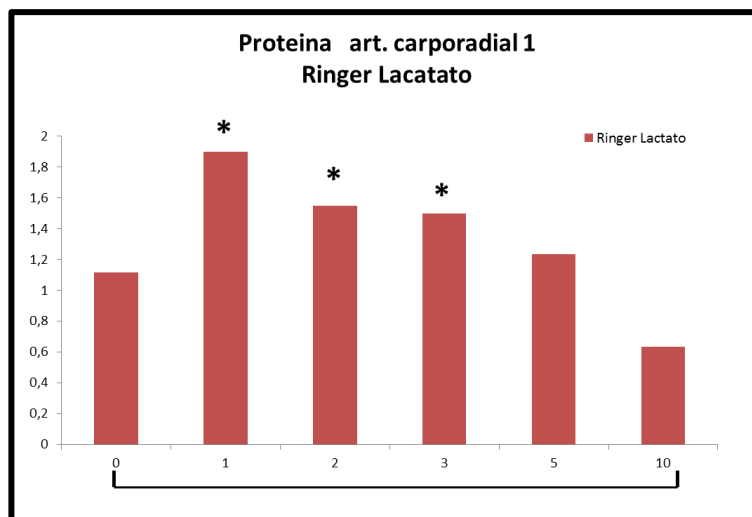
### Proteínas totales

En las articulaciones control, se pudo observar que dentro de las primeras 48 horas, los valores proteicos obtenidos eran los mas altos, aunque únicamente dos animales superaban en este tiempo el valor umbral (2 gr/dl). Estos valores disminuyeron progresivamente hasta alcanzar la normalidad a las 72h post inoculación (tabla 9).

	0h	24h	48h	72h	5d	10d
Caballo 1	1,2	2	2,2	1,8	0,8	0,6
Caballo 2	1,4	3	1,8	0,8	1,4	0,2
Caballo 3	1,2	1,8	1,5	1,4	1,2	1,2
Caballo 4	1,3	1,8	2	1,8	1,4	0,6
Caballo 5	0,8	2	0,8	1,4	1,4	0,6
Caballo 6	0,8	0,8	1	1,8	1,2	0,6
medía	1,12	1,90	1,55	1,50	1,23	0,63

Tabla 9: Valores de proteínas totales (medidas en gr/dl) obtenidos en el liquido sinovial en la fase 2 del estudio en la articulación carporadial control.

Aplicando la prueba estadística ANOVA  $p < 0.05$ , se puede determinar que existen diferencias significativas entre el día 1 y los días 0 y 10 así como entre los días 1,2 y 3 y el día 10. No se ha encontrado esta diferencia entre el día de inicio del tratamiento (día 0) y el último (día 10). (Gráfica 10)



Gráfica 10: Estudio estadístico de los valores de proteínas totales (medidas en gr/dl) obtenidos en el liquido sinovial en la fase 2 del estudio en la articulación carporadial control. Existen diferencias significativas entre el día 1 y los días 0 y 10 así como entre los días 1,2 y 3 y el día 10. No se ha encontrado esta diferencia entre el día 0 y el día 10. ( $p < 0.05$ )

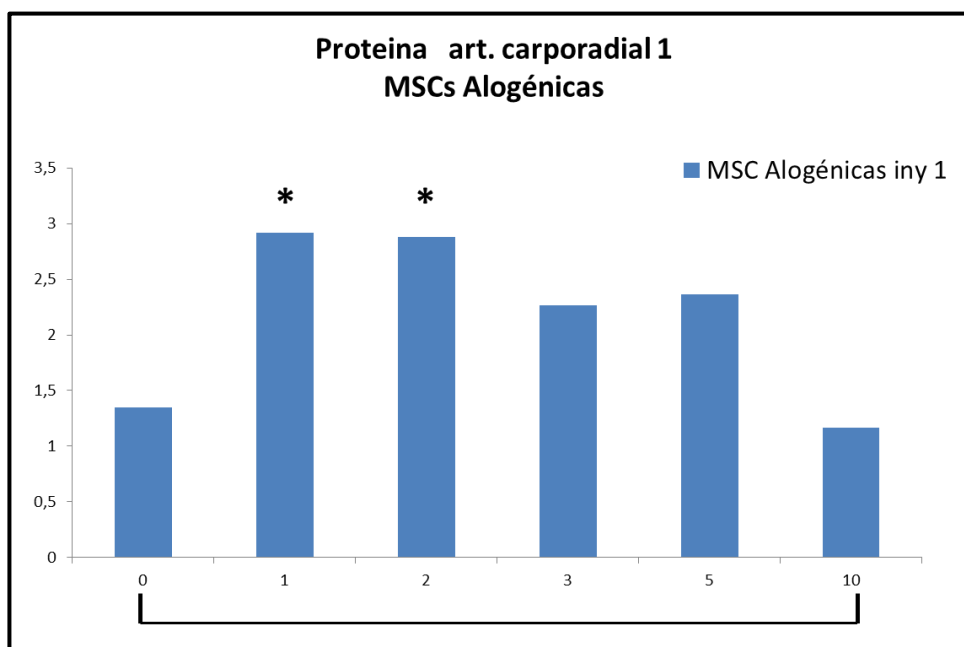
En cuanto a los resultados de la valoración del líquido sinovial, tras la primera infiltración del *pool* de células madre alogénicas, se observó que, todos los animales mostraron dentro de las primeras 48 horas, los valores proteicos mas elevados, siendo en 5 animales este valor por encima del valor umbral (2gr/dl). Todos los valores se normalizaron dentro de los 10 días post inoculación. (Tabla 10)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d	30d
Caballo. 1	1,2	5,8	4,2	2,2	2,2	1,6	1	
Caballo 2	1,9	2,3	2	1	3	0,2		
Caballo 3	2	4	3	2,6	2,6	1,2		
Caballo 4	1,2	2,2	4	2	2	1,2		
Caballo 5	1	2	2,5	3,2	3	1,8	1,2	1
Caballo 6	0,8	1,2	1,6	2	1,4	1		
Media	1,35	2,92	2,88	2,17	2,37	1,17	0,37	0,17

Tabla 10: Valores de proteínas totales (medidas en gr/dl) obtenidos en el líquido sinovial en la fase 2 del estudio en la articulación carporadial inoculada con MSC alogénicas.

En un único caso, (caballo 2), el valor proteico más elevado lo encontramos en la articulación control alcanzando a las 24h post infiltración (3 mg/dl), mientras que la tratadas en el mismo momento era de 2.3 mg/dl.

En estudio estadístico se ha podido observar que en lo referente a la valoración proteica, se encuentran únicamente diferencias significativas entre el primer día post-tratamiento y el 10º día, así como entre el 2º día y el 10º. No se han encontrado diferencias significativas entre el día del inicio del tratamiento (día 0) con el último (día 10). (Gráfica 11)



Gráfica 11: valoración estadística del valor de proteínas totales medido en gr/dl en la articulación carporadial inoculada con MSC alogénicas. Se han encontrado diferencias significativas entre los días 1 y 10 y entre el día 2 y el día 10. No encontrándose esa significación entre los días 0 y 10. ( $p < 0.05$ )

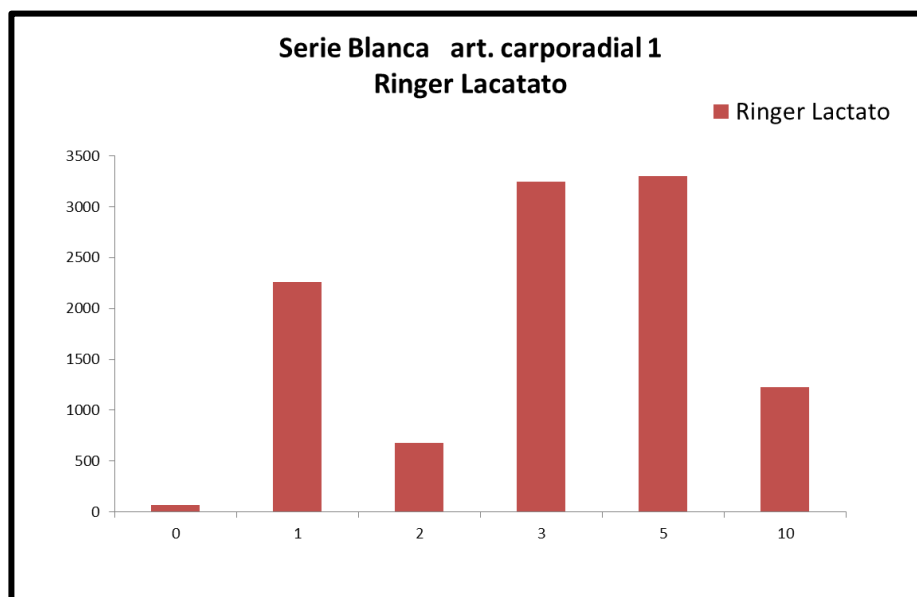
### Recuento leucocitario

En el caso de las articulaciones control, todos los animales obtuvieron un recuento leucocitario menor de 30.000 células/  $\mu\text{l}$ , siendo el dato mas alto recogido 11500 células/  $\mu\text{l}$ , en un único caballo a las 24 horas post inoculación. 5 de lo 6 animales normalizaron esta celularidad dentro de los 10 días post inoculación (considerando un valor normal de 1500 células/  $\mu\text{l}$ ), normalizándose el que no lo había echo el día 20 post inoculación. (Tabla 11)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d
Caballo 1	78	230	375	8500	312	875	
Caballo 2	60	11500	375	3625	2250	240	
Caballo 3	115	125	62	90	4500	750	
Caballo 4	32	125	2500	625	7110	5250	80
Caballo 5	33	1500	500	125	1125	110	
Caballo 6	60	60	250	6500	4500	125	
media	63	2256,66	677	3244,16	3299,5	1225	13,33

Tabla 11: Valores del recuento leucocitario (medido en células/  $\mu\text{l}$ ,) obtenidos en el liquido sinovial en la fase 2 del estudio en la articulación carporadial control

Aplicando la prueba estadística ANOVA, se pudo observar que no existen diferencias significativas en el valor del recuento leucocitario, a lo largo de todos los días del tratamiento. (Gráfica 12)



Gráfica 12: estudio estadístico del parámetro recuento leucocitario (medido en células/  $\mu\text{l}$ ,) obtenidos en el liquido sinovial en la fase 2 del estudio en la articulación carporadial control. No existen diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento. ( $p < 0.05$ )

En el caso de las articulaciones tratadas con MSC alogénicas en 3 de los animales no se alcanzaron niveles elevados de celularidad, (obteniéndose valores entre 5000-9000 células/  $\mu\text{l}$ ) dentro de las primeras 72h, mientras que por el contrario, en los otros 3 caballos restantes los valores alcanzan niveles más altos (aprox. 74000 células/  $\mu\text{l}$ ). En 4 de los 6 animales se alcanzó la

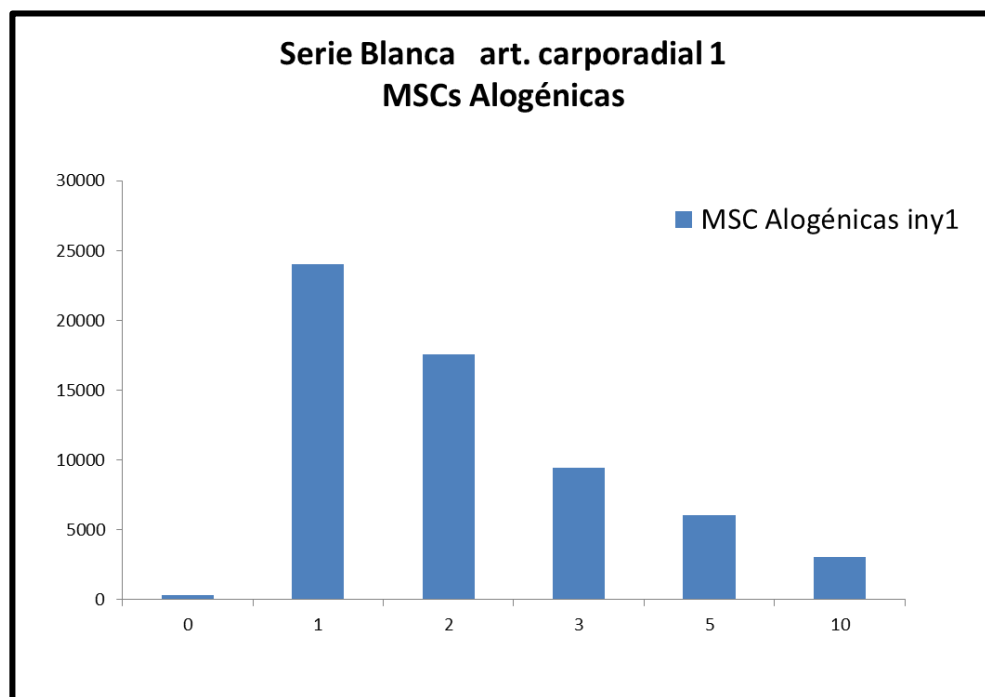


normalidad celular en las articulaciones tratadas dentro de los 10 días post inoculación, de los 2 que no alcanzaron la normalidad celular en este periodo de tiempo, uno de ellos se normalizó a los 20 días y el otro a los 30.(Tabla 12)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d	30d
Caballo 1	98	74000	48000	20500	16500	10500	1125	
Caballo 2	33	5500	9000	4000	625	375		
Caballo 3	1375	57500	4750	6000	2160	375		
Caballo 4	15	2640	5440	3250	5250	1250		
Caballo 5	75	4320	35000	15500	9750	5240	2250	950
Caballo 6	30	250	3000	7110	2000	390		
Media	271	24035	17531,66	9393,33	6047,5	3021,66	562,5	158,33

Tabla 12: Valores del recuento leucocitario, medido en células/μl obtenido a lo largo del tratamiento con MSC en las articulaciones corporadiales.

No obstante, aplicando la prueba estadística ANOVA, no se han encontrado diferencias significativas en la medición del recuento leucocitario a lo largo de los días del tratamiento (Gráfica 13)



Gráfica 13: Estudio estadístico de I parámetro recuento de leucocitos, medido en células/μl obtenido en la articulación corporal inoculada con MSC alogénicas a lo largo de toda la fase 2. No se han encontrado diferencias significativas.( $p < 0.05$ )

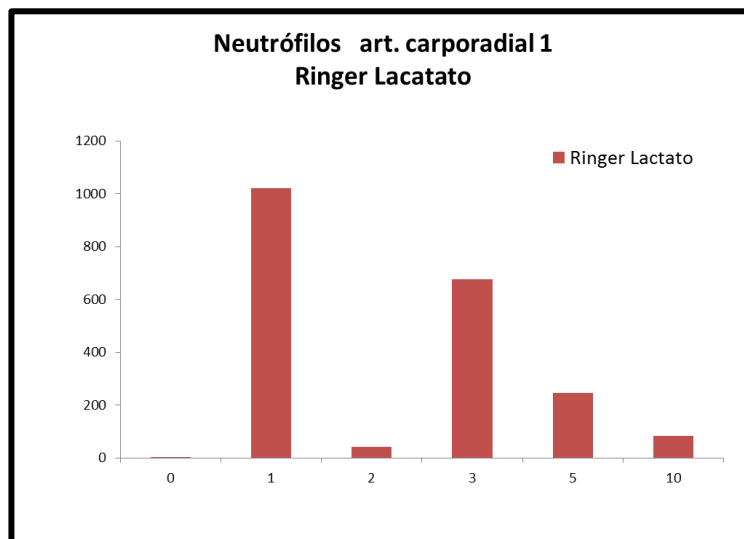
## Neutrófilos

En las articulaciones control, las infiltradas con RL, se puede observar que las mediciones mas elevadas las encontramos hasta el día 5 y que el valor mas alto registrado (5290 neutrófilos/ $\mu$ l) recogido fue a las 24 horas post inoculación, en un solo caballo (caballo 2). Todos los valores, se normalizaron (considerando dentro de la normalidad 250 neutrófilos/ $\mu$ l), en el día 10 post inoculación. (Tabla 13)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d
Caballo 1	0,78	2,3	3,75	2295	37,44	131,25	0
Caballo 2	4,8	5290	30	398,75	112,5	14,4	0
Caballo 3	1,15	38,75	40,3	8,1	360	7,5	0
Caballo 4	11,52	38,75	75	50	568,8	105	1,6
Caballo 5	0,33	765	5	1,25	123,75	2,2	0
Caballo 6	1,2	0	97,5	1300	270	5	0
media	3,29	1022,46	41,92	675,52	245,41	44,22	0,26

Tabla 13. : Valores del recuento de neutrófilos (medido en neutrófilos/  $\mu$ l,) obtenidos en el liquido sinovial en la fase 2 del estudio en la articulación carporadial control

Tras la realización del estudio estadístico con la prueba ANOVA se pudo observar que no existen diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento en lo referente a los valores del recuento de neutrófilos. (Gráfica 14)



Gráfica 14: Estudio estadístico del parámetro recuento neutrófilos (medido en neutrófilos/  $\mu$ l,) obtenidos en el liquido sinovial en la fase 2 del estudio en la articulación carporadial control. ( $p < 0.05$ )

En cuanto a las articulaciones tratadas con MSC alogénicas, se pudo observar que en 5 de los 6 animales se encuentran los valores más elevados

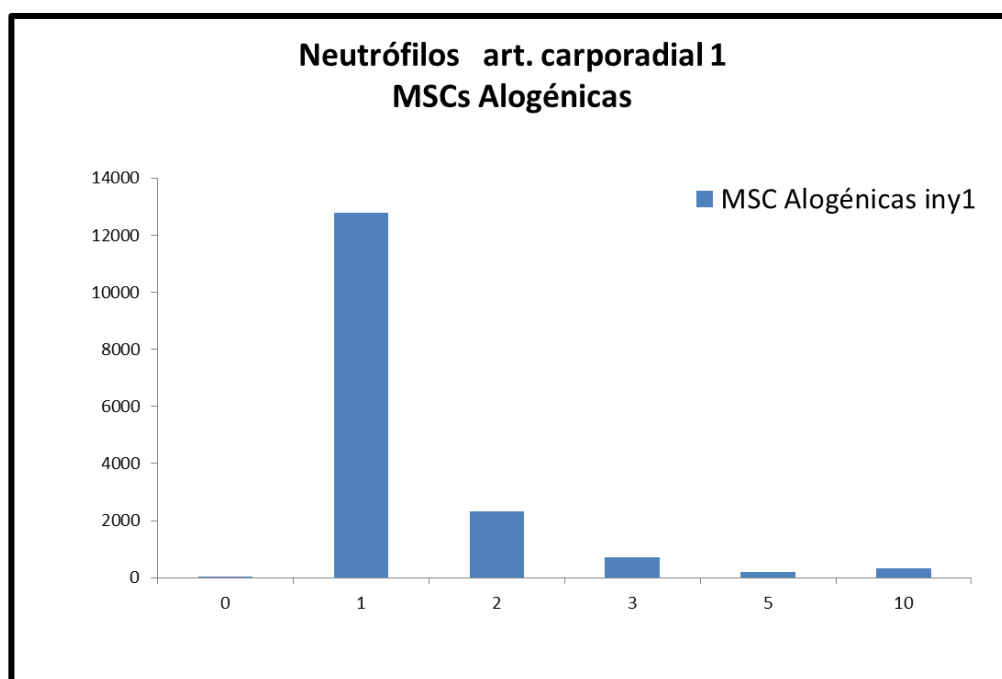
dentro de las primeras 72 horas, siendo en este caso el valor mas alto registrado de 55500 neutrófilos/ $\mu$ l , obtenido a las 24 horas post inoculación.

A los 10 días post inoculación 5 de los 6 animales habían normalizado sus valores de neutrófilos en el liquido sinovial, los valores del animal no normalizado estaban dentro del umbral a los 20 días post inoculación (Tabla 14)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d
Caballo 1	0	55500	10560	2665	330	1890	22,5
Caballo 2	0	330	360	80	25	22,5	0
Caballo 3	137,5	20700	427,5	120	64,8	3,75	0
Caballo 4	0	26,4	272	162,5	262,5	0	0
Caballo 5	0	172,8	2100	930	390	0	22,5
Caballo 6	0	5	150	284,4	60	11,7	0
Media	22,91	12789,03	2311,58	706,98	188,71	321,35	7,5

Tabla 14: Valores del recuento de neutrófilos (medido en neutrófilos/  $\mu$ l,) obtenidos en el liquido sinovial en la fase 2 del estudio en la articulación carporadial tratada con MSC alogénicas.

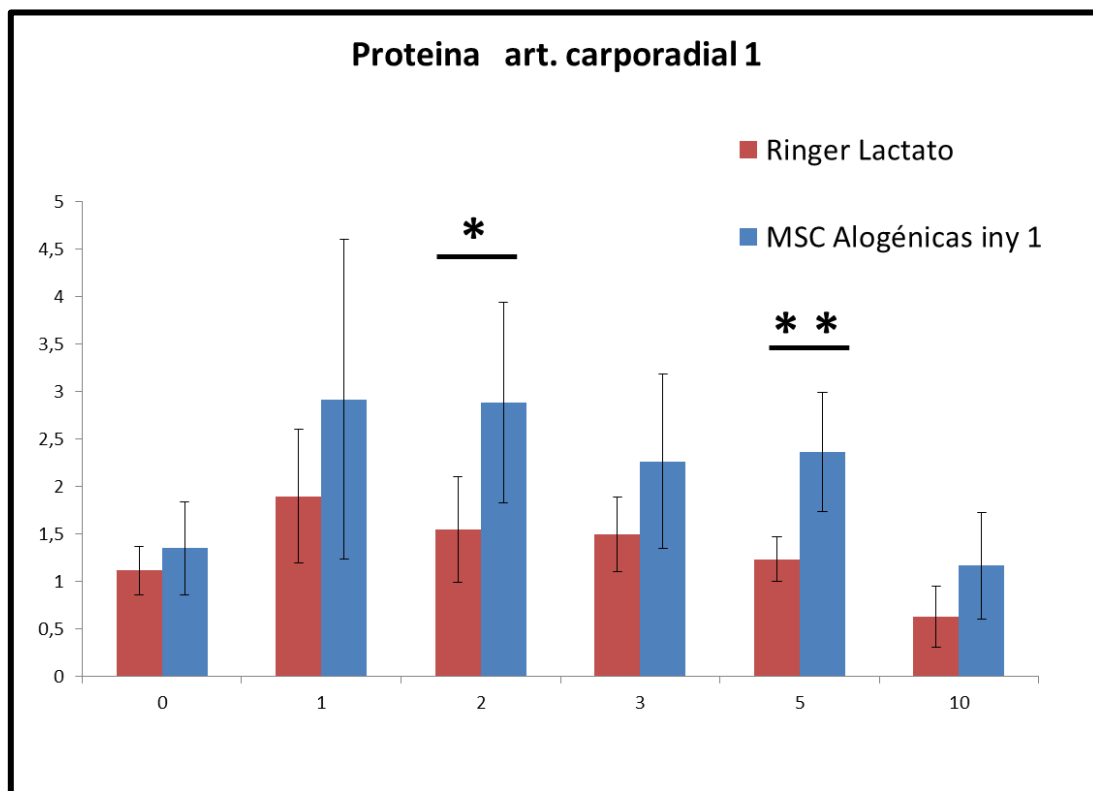
Tras la realización del estudio estadístico con la prueba ANOVA se pudo observar que no existen diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento en lo referente a los valores del recuento de neutrófilos, en las articulaciones tratadas con MSC alogénicas. (Gráfica 15)



Gráfica 15: Estudio estadístico del parámetro recuento neutrófilos (medido en neutrófilos/  $\mu$ l,) obtenidos en el liquido sinovial en la fase 2 del estudio en las articulaciones carporadiales tratadas con MSC alogénicas. (p<0.05)

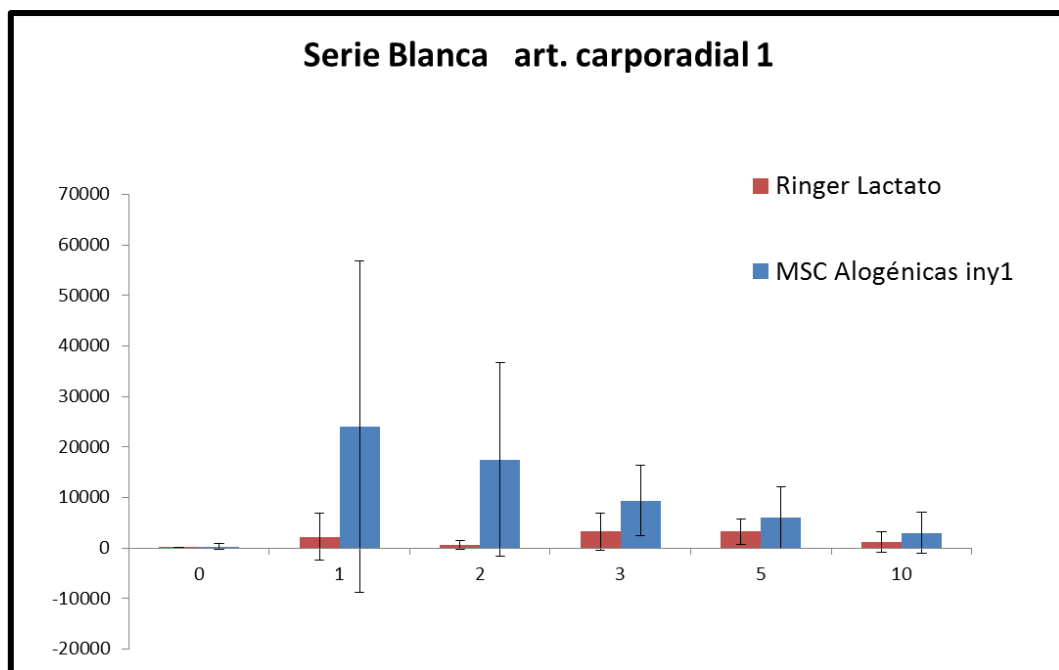
Al realizar una comparativa del efecto del tratamiento en las articulaciones con un *pool* MSC alogénicas frente a las articulaciones control, estadísticamente realizando la prueba T de Student se ha observado que:

- Los resultados estadísticos obtenidos del recuento proteico muestran que existen diferencias significativas entre las articulaciones tratados con un pool de MSC alogénicas y las articulaciones control los días 2 y 5 post inoculación, no encontrándose esa diferencia en ningún otro momento de esta fase del estudio. (Gráfica 16)

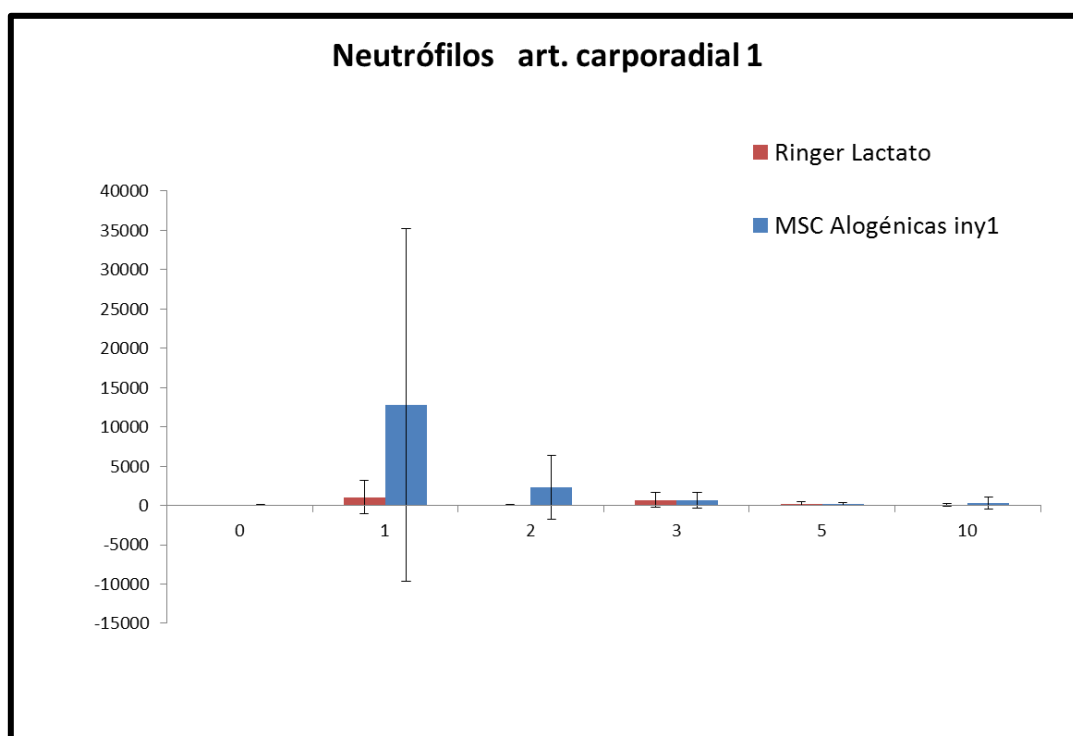


Gráfica 16: Estudio estadístico comparativo mediante la prueba T de Student de los valores obtenidos en relación al parámetro proteínas totales medido en gr/dl entre las articulaciones control y las articulaciones tratadas con MSC alogénicas. Se han encontrado diferencias significativas los días 2 y 5 entre ambas articulaciones. ( $p < 0.05$ )

- En lo relativo al recuento de los glóbulos blancos y el número de neutrófilos, no se han encontrado, en el estudio de ambos parámetros, diferencias significativas entre las articulaciones tratadas con MSC alogénicas y las controles (Graficas 17-18).



Gráfica 17: Estudio estadístico comparativo mediante la prueba t de Student de los valores obtenidos en relación al parámetro recuento leucocitario medido en células/ $\mu$ l entre las articulaciones control y las articulaciones tratadas con MSC alogénicas. No se han encontrado diferencias significativas a lo largo de la fase 2 entre ambas articulaciones. ( $p < 0.05$ )



Gráfica 18: Estudio estadístico comparativo mediante la prueba t de Student de los valores obtenidos en relación al parámetro neutrófilos medido en neutrófilos/ $\mu$ l entre las articulaciones control y las articulaciones tratadas con MSC alogénicas. No se han encontrado diferencias significativas a lo largo de la fase 2 entre ambas articulaciones. ( $p < 0.05$ )

### 5.7 EXPERIMENTO 3: VALORACIÓN DE LA REINFILTRACIÓN DE MSC ALOGÉNICAS RESPECTO A LA DE RL EN LA ARTICULACIÓN CARPO-RADIAL.

#### *Valoración clínica*

Ninguna de las articulaciones control, las infiltradas con RL, presentó ninguna anomalía clínica reseñable en toda esta fase del estudio.

Respecto a las articulaciones tratadas por segunda vez con MSC alogénicas en los resultados obtenidos en esta fase del estudio, en el examen visual, se puede decir que las mediciones del perímetro carpal externo aumentaron ligeramente con respecto a las mediciones basales siendo el mayor aumento medio detectado un centímetro, normalizándose dentro de los 10 días post inoculación.

Los resultados del examen ecográfico mostraron que había menor sinovitis ya que la medición del espesor del receso sinovial era menor en todos los casos con respecto a las mediciones obtenidas en el primer tratamiento de implantación de células madre alogénicas. Siendo este valor entre 1-2 cm en la 1º infiltración de MSC alogénicas y de 1-1.5cm, en el caso de la 2º infiltración.

Ningún animal en esta parte del estudio mostro cojera alguna, ni al paso, ni al trote ni tras la flexión del carpo

Los resultados obtenidos de las mediciones comparativas de la temperatura entre las articulaciones tratadas y las controles fue menor de 1°C de diferencia

#### *Valoración laboratorial*

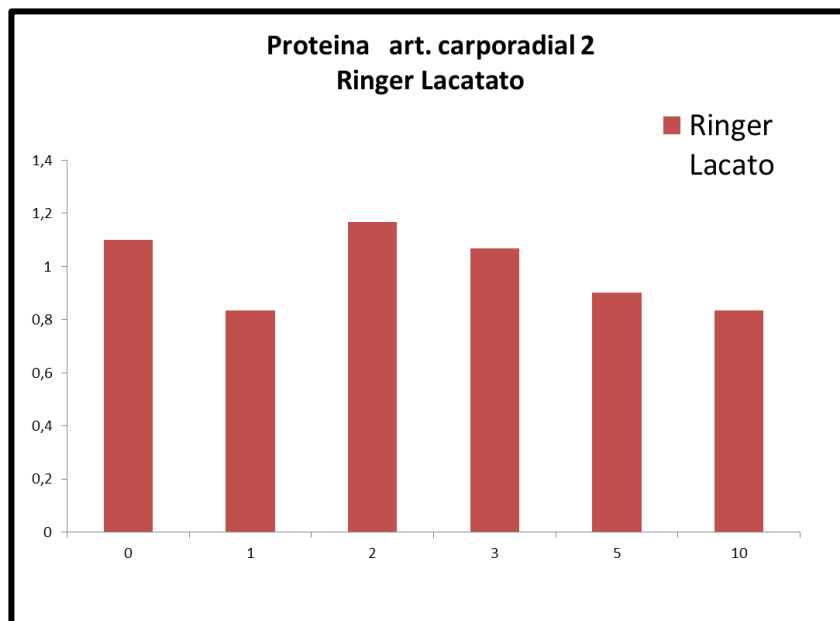
##### Proteínas totales

Los valores obtenidos en las articulaciones control, mostraron que las proteínas aumentaron dentro de las primeras 48 horas post inoculación de RL, siendo el valor mas lato registrado el de 2.2, únicamente en un solo animal a las 48horas. Todos los valores se encontraban dentro de la normalidad suponiendo un valor proteico umbral de 2 gr/dl, en las 72 horas posteriores al tratamiento. (Tabla 15)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d
Caballo 1	0,6	0,6	0,8	1	0.6	0.3
Caballo 2	1	0,8	0,4	1	1	1
Caballo 3	1,4	1	1,4	1,4	1,4	1,5
Caballo 4	1,4	0,8	1	1	0,6	0,6
Caballo 5	1,4	1,4	2,2	1	1	1,2
Caballo 6	0,8	0,4	1,2	1	0,8	0,4
media	1,1	0,83	1,16	1,06	0,8	0,78

Tabla 15: Valores proteicos medidos en (gr/dl) obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en la articulación carporadial control

Tras la realización del estudio estadístico con la prueba ANOVA se pudo observar que no existen diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento en lo referente a los valores de proteína total ( $p < 0.05$ ). (Gráfica 19)



Gráfica 19: Estudio estadístico del parámetro proteínas totales medidas en gr/dl obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en la articulación carporadial control. No se encuentran diferencias significativas a lo largo del tratamiento ( $p < 0.05$ )

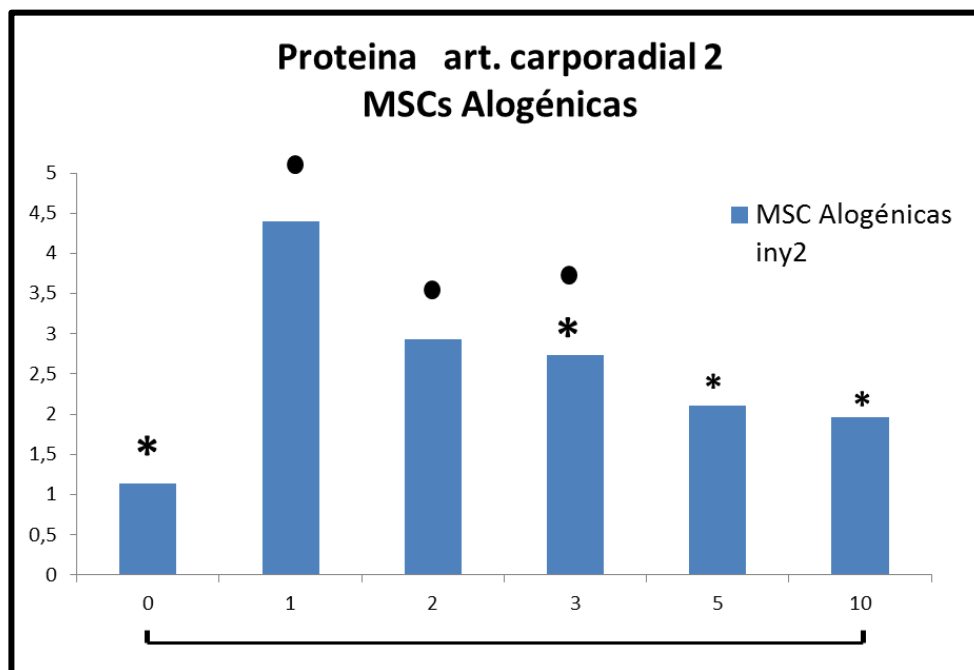
En todas las articulaciones tratadas por segunda vez con MSC alogénicas encontramos valores máximos a las 24h post inoculación alcanzando en 4 de las 6 articulaciones valores  $\geq 4$  gr/dl. Siendo el valor mas alto registrado de 5.8gr/dl, a las 24horas post-tratamiento. Los valores proteicos disminuyeron progresivamente a lo largo del estudio alcanzando en todos los casos valores normales a los 10 días post inoculación. (Tabla 16)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d
Caballo 1	0,6	3,2	2,4	1,9	1,8	1,3	0,8
Caballo 2	1,2	4,6	3,4	3,6	2	0,6	
Caballo 3	1,5	4,8	3,4	3,2	2,8	1,8	
Caballo 4	1,3	5	2,2	3,6	2,8	4,8	1,2
Caballo 5	1,4	5,8	3,4	2,2	2,2	2	0,8
Caballo 6	0,8	3	2,8	1,9	1	1,3	0,4
Media	1,13	4,4	2,9	2,73	2,1	1,96	0,53

Tabla 16: Valores proteicos medidos en (gr/dl) obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en la articulación carporadial tratada por segunda vez con MSC alogénicas

Tras la realización del estudio estadístico con la prueba ANOVA se pudo observar que existen diferencias significativas entre los valores del día 0 y los del día 1,2 y 3 post-tratamiento, así como 1 con los de los días 0, 3, 5 y 10. No

se han encontrado diferencias significativas entre los valores del día 0 y los del día 10. ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 20)



Gráfica 20: Gráfica 888: Estudio estadístico del parámetro proteínas totales medidas en gr/dl obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en la articulación carporadial infiltrada con MSC alogénicas.

Existen diferencias significativas entre los valores del día 0 y los del día 1, 2 y 3 (marcado con un punto negro en la tabla) post-tratamiento, así como 1 con los de los días 0, 3, 5 y 10 (Marcado con asterístico en la tabla). No se han encontrado diferencias significativas entre los valores del día 0 y los del día 10. ( $p < 0.05$ )

### Células

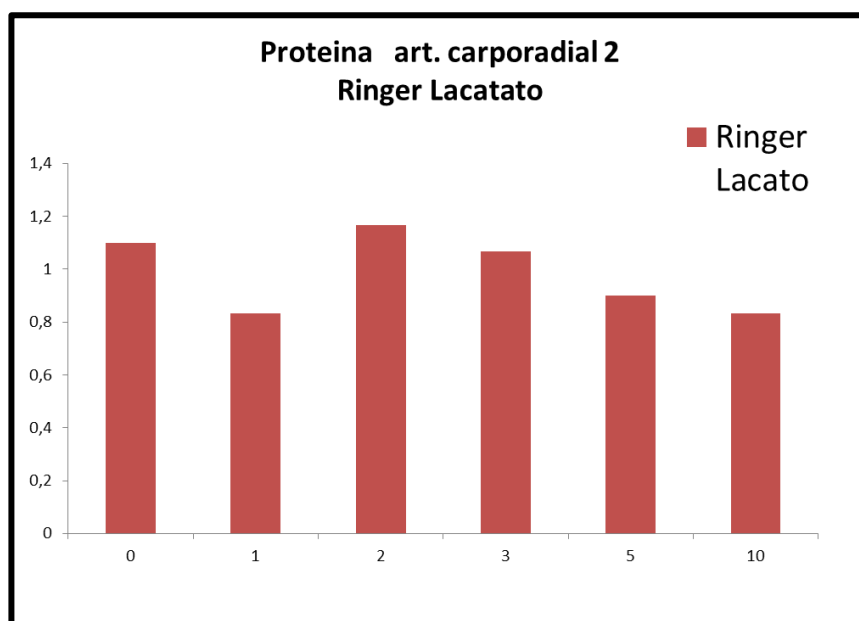
En el caso de las articulaciones control no se supero en ningún momento las 10000 células/ $\mu$ l, obteniéndose a las 72 horas en dos animales los recuentos más altos recogidos (caballo 5 y 6). Todos los valores se normalizaron dentro de los 10 días post infiltración. (Valor umbral normal 1500 células/ $\mu$ l). (Tabla 17)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d
Caballo 1	20	40	525	40	130	110
Caballo 2	30	60	40	30	30	130
Caballo 3	250	125	40	140	30	30
Caballo 4	70	110	20	110	45	130
Caballo 5	230	450	125	4000	110	875
Caballo 6	30	65	560	7110	40	230
media	105	141,66	218,33	1905	64,16	250,83

Tabla 17 Valores del recuento leucocitario, medido en células/ $\mu$ l obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en la articulación carporadial control.



Tras la realización del estudio estadístico con la prueba ANOVA se pudo observar que no existen diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento en lo referente a los valores de proteína total ( $p < 0.05$ ). (Gráfica 21)



Gráfica 21: Estudio estadístico del parámetro proteínas totales medidas en gr/dl obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en la articulación carporadial control. No se encuentran diferencias significativas a lo largo del tratamiento ( $p < 0.05$ )

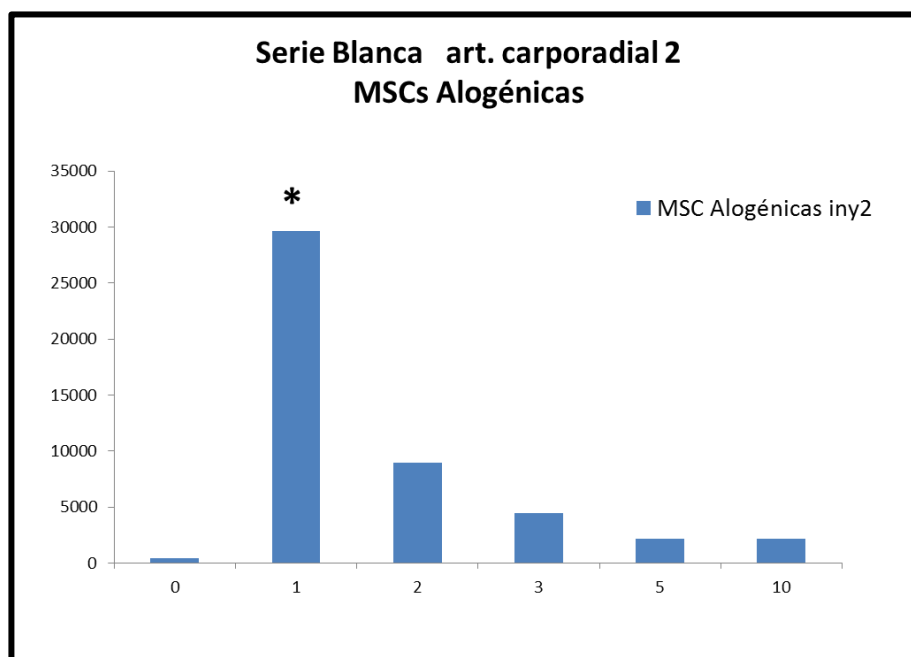
En 3 de las articulaciones tratadas se alcanzaron valores superiores a 30000 células/ $\mu$ l, a las 24 horas post infiltración, disminuyendo drásticamente en todos los casos a las 48 horas. A los 10 días del estudio únicamente 2 animales se habían normalizado, de los 4 restantes, 1 se normalizó a los 10 días post inoculación mientras que el resto se normalizó dentro de los 20 días post inoculación. (tabla 18)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d
Caballo 1	210	35500	13500	2000	2720	2240	230
Caballo 1	280	59000	7750	3320	3040	220	
Caballo 1	375	36000	4640	3000	920	375	
Caballo 1	560	14000	2500	5520	1170	2480	1210
Caballo 1	890	19680	15500	9500	2625	3875	280
Caballo 1	400	13500	9750	3240	2800	3650	60
Media	452,5	29613,33	8940	4430	2212,5	2140	296,66

Tabla 18 Valores del recuento leucocitario, medido en células/ $\mu$ l obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en las articulaciones carporadial tratadas por segunda vez con MSC alogénicas

Tras la realización del estudio estadístico con la prueba ANOVA se pudo observar que existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en el día 1 post-tratamiento y los demás días del examen. No existen diferencias

significativas entre los valores obtenidos para el día 0 y los días posteriores al 1. ( $p < 0.05$ ). (Gráfica 22)



Gráfica 22 Estudio estadístico del parámetro recuento leucocitario, medido en células/ $\mu$ l obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en la articulación carporadial infiltrada con MSC alogénicas. Existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en el día 1 post-tratamiento y los demás días del examen. No existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para el día 0 y los días posteriores al 1. ( $p < 0.05$ )

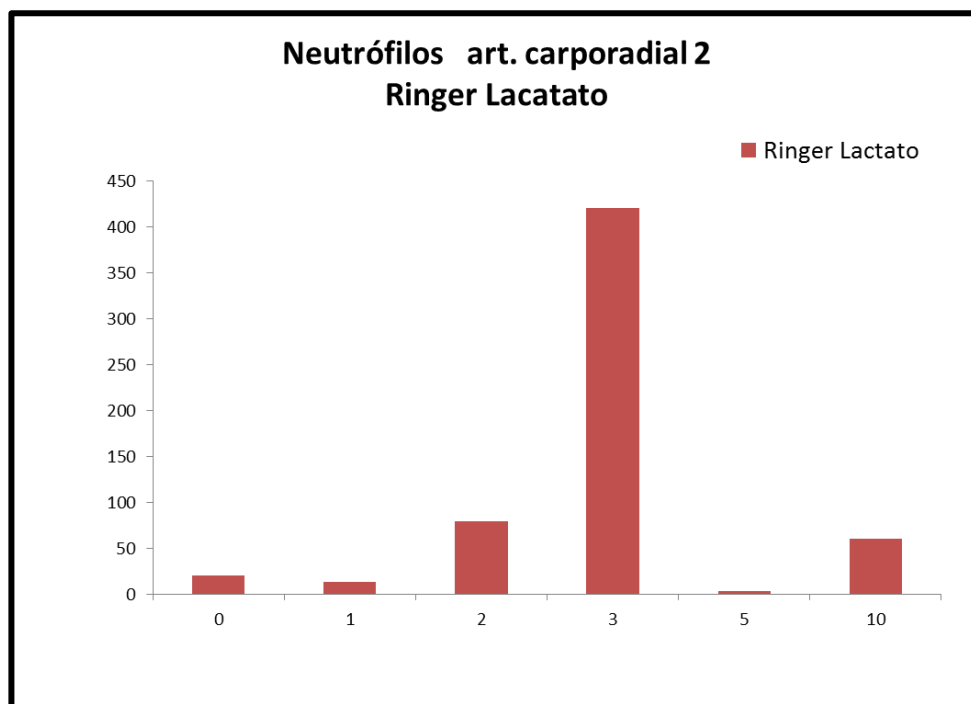
### Neutrófilos

En las articulaciones control podemos observar que únicamente en una ocasión el valor del recuento de neutrófilos supera el límite umbral (250 neutrófilos/ $\mu$ l) siendo ésta el día 3 post inoculación en el caballo 5. Todos los valores están normales durante todo el estudio a excepción del valor anteriormente comentado. (Tabla 19)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d
Caballo 1	0	2,4	236,25	0,4	15,6	2,2
Caballo 2	4,8	34,2	0	0	0	28,6
Caballo 3	110	3,75	0,4	12,6	3,9	9
Caballo 4	0,7	2,2	0	0	0	0
Caballo 5	4,6	4,5	0	2440	1,1	315
Caballo 6	1,8	31,2	240,8	71,1	0,4	4,6
Media	20,31	13,04	79,57	420,68	3,5	59,9

(Tabla 19) Valores del recuento de neutrófilos, medido en neutrófilos/ $\mu$ l obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en las articulaciones carporadial controles

Tras la realización del estudio estadístico con la prueba ANOVA se pudo observar que no existen diferencias significativas a lo largo de todo el tratamiento en lo referente a los valores de neutrófilos. ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 23)



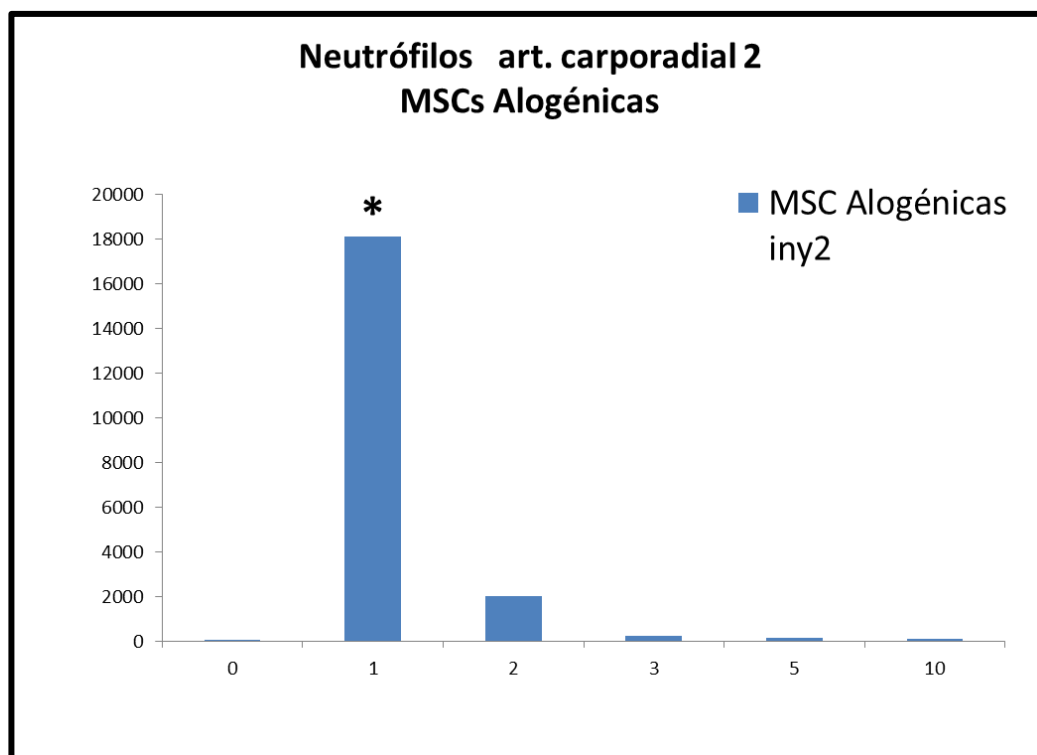
Gráfica 23: Estudio estadístico del parámetro proteínas totales medidas en gr/dl obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en la articulación carporadial control. No se encuentran diferencias significativas a lo largo del tratamiento ( $p < 0.05$ )

En el caso de las articulaciones tratadas por segunda vez con MSC alogénicas, se pudo observar que los valores obtenidos son mucho mas elevados que las obtenidas para las articulaciones control, registrándose los valores mas elevados a las 24 horas post inoculación. Todos los valores del recuento de neutrófilos estaban normalizados para el día 10 post inoculación. (Tabla 20)

	0h	24h	48h	72h	5d	10d	20d
Caballo 1	96,6	13845	2835	80	217,6	201,6	16,1
Caballo 2	2,8	35990	1395	132,8	182,4	11	0
Caballo 3	48,75	27360	139,2	30	36,8	41,25	0
Caballo 4	5,6	7420	325	110,4	93,6	74,4	0
Caballo 5	97,9	14563,2	3875	1045	105	232,5	5,6
Caballo 6	8	9585	3510	64,8	56	109,5	2,4
Media	43,27	18127,2	2013,2	243,83	115,23	111,70	4,02

(Tabla 20) Valores del recuento de neutrófilos, medido en neutrófilos/ $\mu$ l obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en las articulaciones carporadial tratadas por segunda vez con MSC alogénicas

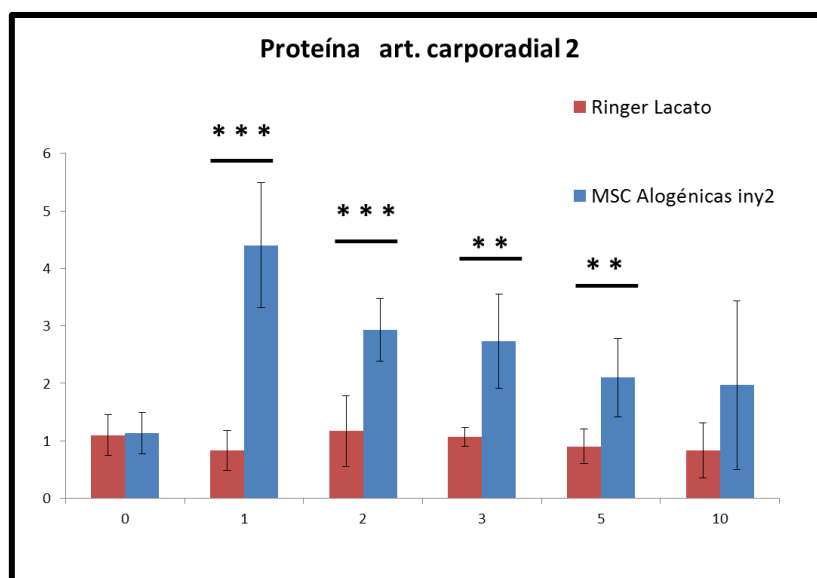
Tras la realización del estudio estadístico con la prueba ANOVA se pudo observar que existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en el día 1 post-tratamiento y los demás días del examen. No existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para el día 0 y los días posteriores al 1. ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 24)



Gráfica 24 Estudio estadístico del parámetro recuento neutrófilos, medido en neutrófilos/ $\mu$ l obtenidos en el líquido sinovial en la fase 3 del estudio en la articulación carporadial infiltrada con MSC alogénicas. Existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en el día 1 post-tratamiento y los demás días del examen. No existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para el día 0 y los días posteriores al 1. ( $p < 0.05$ )

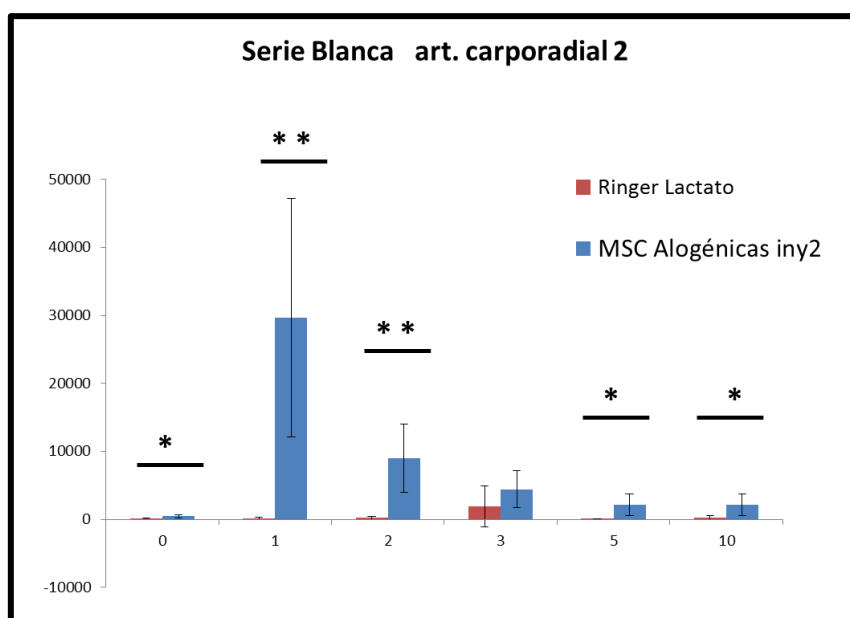
Al realizar una comparativa del efecto del tratamiento en las articulaciones reinfiltradas con un *pool* MSC alogénicas frente a las articulaciones control, estadísticamente, usando la prueba T de Student, observamos que:

- Los resultados de la valoración proteica mostraron que existen diferencias significativas entre las articulaciones tratadas por 2º vez con un *pool* de MSC alogénicas y las articulaciones controles en los 2 primeros días post-tratamiento. Esta diferencia se mantiene hasta el día 5 post inoculación, no encontrándose diferencias significativas el día 10 del estudio de esta fase (Gráfica 25 )



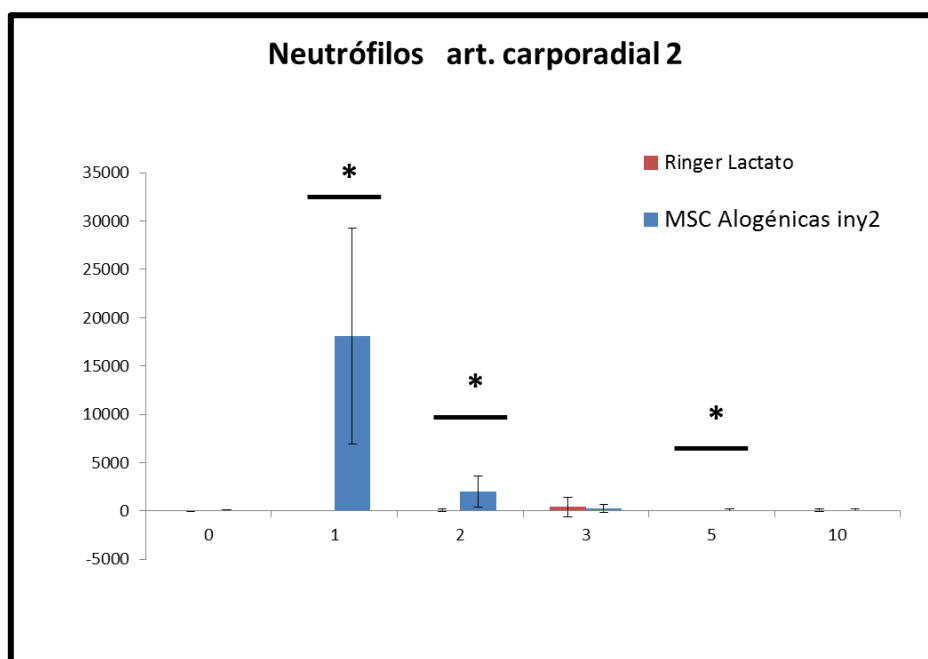
Gráfica 25 Estudio estadístico comparativo mediante la prueba T de Student de los valores obtenidos en relación al parámetro proteínas totales medido en gr/dl entre las articulaciones control y las articulaciones tratadas por segunda vez con MSC alogénicas. Se han encontrado diferencias significativas los días 1, 2, 3 y 5 entre ambas articulaciones. (p<0.05)

- Tras el análisis estadístico de los resultados relativos a la serie blanca, se puede observar que entre todos los días del estudio (0, 1, 2, 5 y 10) excepto el día 3 se encuentran diferencias significativas entre las articulaciones tratadas por 2º vez con MSC alogénicas y la articulación control.(Gráfica 26 ).



Gráfica 26: Estudio estadístico comparativo mediante la prueba T de Student de los valores obtenidos en relación al parámetro recuento leucocitario medido en células/µl entre las articulaciones control y las articulaciones tratadas con MSC alogénicas. Se han encontrado diferencias significativas a lo largo de la fase 2 en los días 0, 1, 2, 5, 10 entre ambas articulaciones. (p<0.05)

- El análisis estadístico del conteo de neutrófilos muestra que existen diferencias significativas entre las articulaciones tratada con MSC x 2 vez y los controles los días 1,2 y 5, no encontrándose estas diferencias los días 3 y 10 post inoculación.(Gráfica 27)



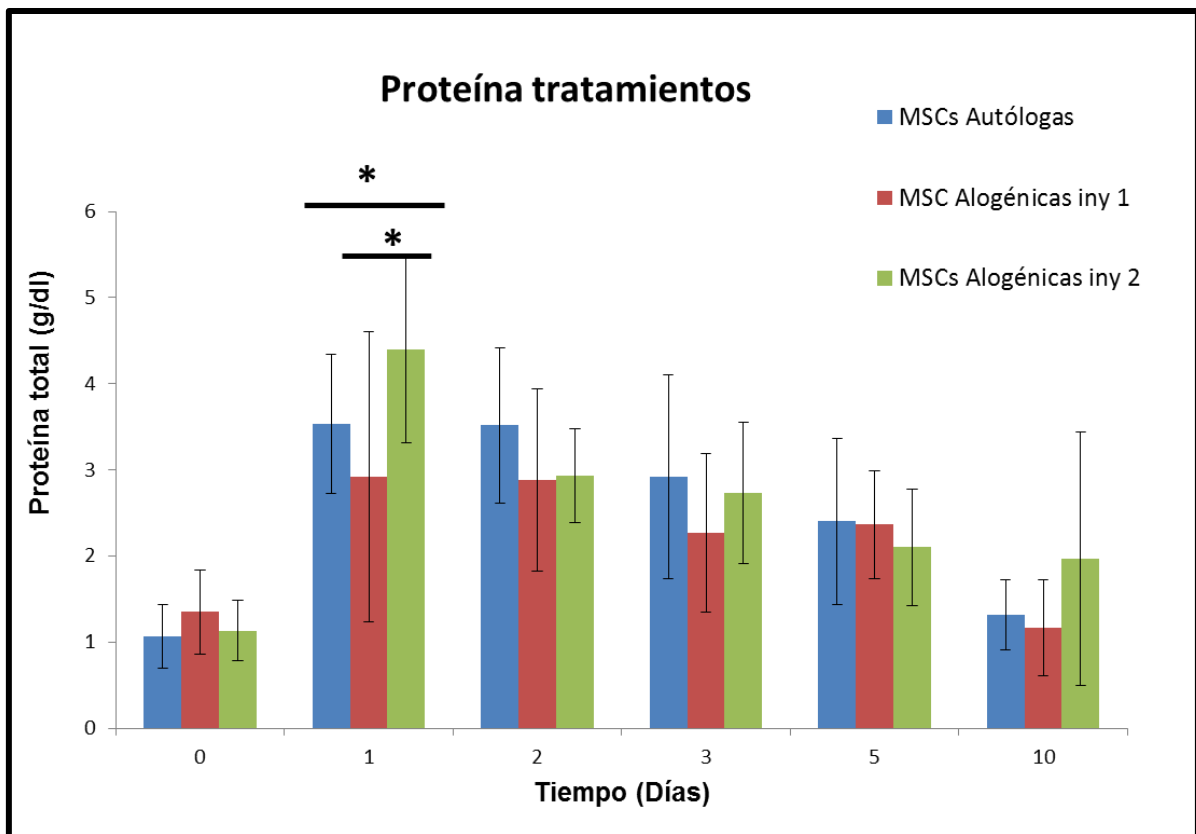
Gráfica 27: Estudio estadístico comparativo mediante la prueba T de Student de los valores obtenidos en relación al parámetro neutrófilos medido en neutrófilos/ µl entre las articulaciones control y las articulaciones tratadas con MSC alogénicas Se han encontrado diferencias significativas los días 1, 2 y 5 entre ambas articulaciones. (p<0.05)

## 5.8 COMPARACION ESTADISTICA DE LOS PARAMETROS LABORATORIALES DE LOS 3 EXPERIMENTOS.

Una vez realizada toda la valoración de los resultados por separado entre los diferentes parámetros estudiados en cada articulación a lo largo del tiempo en cada experimento, se realizó un estudio comparativo conjunto de todos los tratamientos celulares inoculados en cada uno de los experimentos, para cada uno de los parámetros evaluados.

### PROTEÍNAS TOTALES.

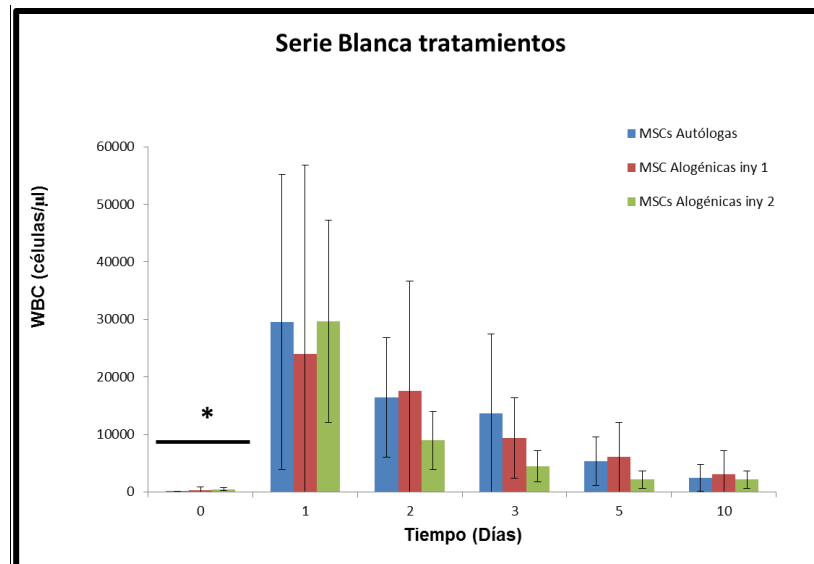
En el examen estadístico se ha podido observar que existen diferencias significativas en el día 1 post inoculación entre las articulaciones tratadas con MSC autólogas y las articulaciones tratadas por 2º vez con MSC alogénicas, así como también en el mismo día existen diferencias significativas entre las articulaciones infiltradas por primera vez con MSC alogénicas y las de la 2º inyección. (Gráfica 28)



Gráfica 28. Estudio estadístico comparativo respecto al valor de proteínas totales, medidas en gr/dl, en las articulaciones tratadas con MSC, de cada fase del estudio. Existen diferencias significativas en el día 1 post inoculación entre las articulaciones tratadas con MSC autólogas y las articulaciones tratadas por 2º vez con MSC alogénicas, así como también en el mismo día existen diferencias significativas entre las articulaciones infiltradas por primera vez con MSC alogénicas y las de la 2º inyección.

## RECuento LEUCOCITARIO

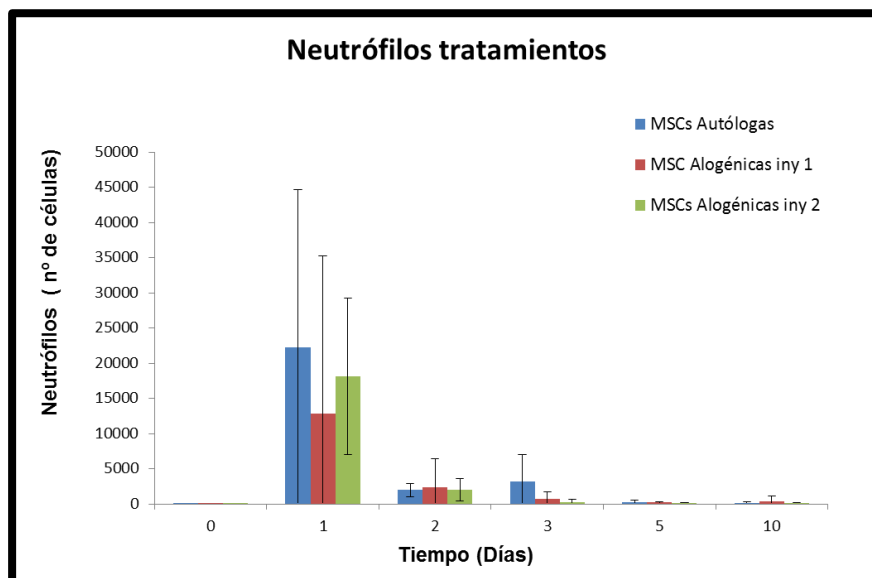
Respecto al estudio del recuento de la serie blanca se ha podido observar que existían diferencias significativas en el día 0 entre las articulaciones tratadas con MSC autólogas y las articulaciones tratadas con la 2º infiltración de MSC alogénicas. No se han encontrado mas diferencias significativas entre articulaciones tratadas (autólogas, alogénicas de 1º inyección y alogénicas de 2º inyección) en todas las fases del estudio (Gráfica 29)



Estudio estadístico comparativo respecto al recuento leucocitario, medidas en células/μl, en las articulaciones tratadas con MSC de cada fase del estudio. Se han encontrado únicamente diferencias significativas entre el tratamiento con MSC autólogas y la 2ª infiltración de MSC alogénicas el día 0 del estudio ( $p < 0.05$ )

#### RECuento DE NEutróFILOS EN LAS ARTICULACIONES TRATADAS.

Tras el análisis del recuento de neutrófilos entre las diferentes articulaciones tratadas en los diferentes días del estudio, se puede decir que no se han encontrado ninguna diferencia significativa en los datos obtenidos para este parámetro entre las articulaciones tratadas con MSC autólogas y las inoculadas con MSC alogénicas en ninguna de los 3 experimentos del estudio ( $p < 0.05$ ) (Gráfica30)



Gráfica 30 Estudio estadístico comparativo respecto al recuento de neutrófilos, medido en neutrófilos/μl, en las articulaciones tratadas de cada fase del estudio. No se han encontrado diferencias significativas para este parámetro a lo largo de todo el estudio. ( $p < 0.05$ )

A continuación se realizó un estudio comparativo entre la media de los resultados de todos los resultados obtenidos en cada experimento en las articulaciones infiltradas con RL y los diferentes tratamiento celulares

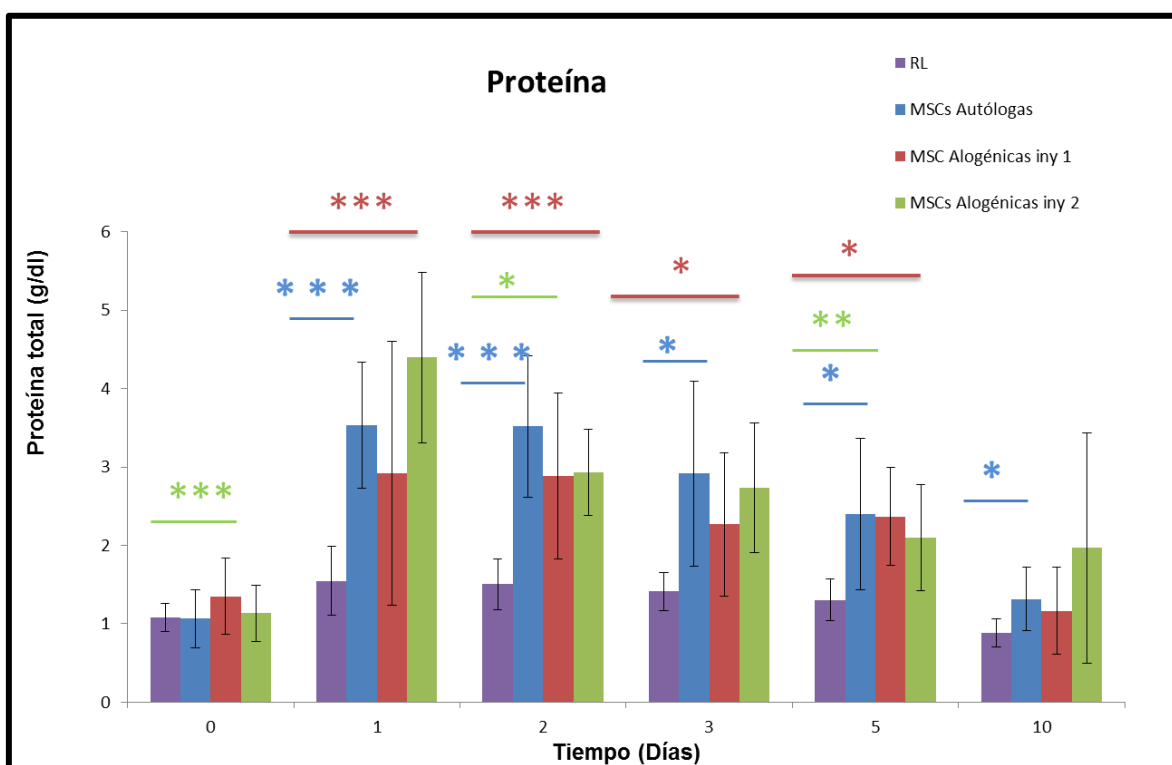


realizados (infiltración de MSC autólogas, MSC alogénicas y la 2º infiltración de MSC alogénicas).

## PROTEINAS TOTALES

Tras el análisis estadístico realizado, utilizando la prueba T de Student ( $p < 0.05$ ) se pudo observar que: (Gráfica 31 Si comparamos el RL con el tratamiento de MSC autólogas, encontramos diferencias significativas, entre ambas, durante todo el experimento a excepción del día de inoculación de las MSC o RL. Los valores registrados en el día 10 a pesar de existir diferencias significativas, están dentro del umbral de normalidad (2gr/dl).

- Cuando se realizó la comparación entre los valores promedios de RL y la primera inyección de MSC alogénicas, se pudo observar que existían diferencias significativas los días 0, 2 y 5 de tratamiento. No encontrándose esta diferencia el último día del estudio.
- En el caso de la comparación entre el promedio de los valores del RL y la 2º infiltración de MSC alogénicas, se pudieron encontrar diferencias significativas en los días intermedios del estudio (1, 2, 3, 5), no encontrándose esta diferencia el día 10 del estudio.



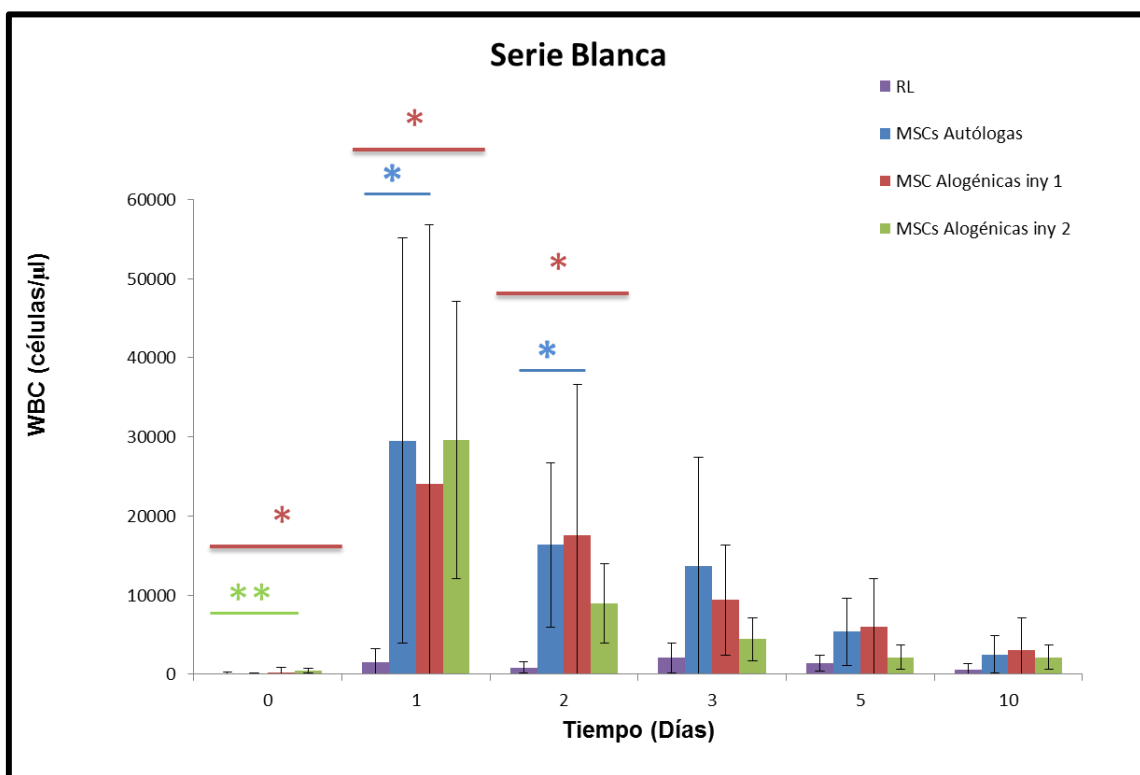
Gráfica 31 Comparación de los valores de proteínas totales de los diferentes tratamientos con MSC y un promedio de los RL obtenido a lo largo del estudio. Estadísticamente encontramos diferencias significativas, entre las articulaciones tratadas con MSC autólogas y el RL, durante todo el experimento a excepción del día 0. Los valores registrados en el día 10 a pesar de existir diferencias significativas, están dentro del umbral de normalidad (2gr/dl). (Véase asteriscos azules). En el caso de la comparación entre RL y 1ª infiltración de MSC alogénicas se vio que existían diferencias significativas los días 0, 2 y 5 de tratamiento. (Véase asteriscos verdes).

Entre el promedio de los valores del RL y la 2º infiltración de MSC alogénicas, se pudieron encontrar diferencias significativas en los días 1, 2, 3, 5. ). (Véase asteriscos rojos)

## SERIE BLANCA

Tras el análisis estadístico realizado, utilizando la prueba T de Student ( $p < 0.05$ ) se pudo observar que: (Gráfica 32)

- Si comparamos el RL con el tratamiento de MSC autólogas, encontramos diferencias significativas los días 1 y 2 del tratamiento. No encontrándose más diferencias en ningún otro momento.
- Cuando se realizó la comparación entre los valores promedios de RL y la primera inyección de MSC alogénicas, se pudo observar que únicamente existían diferencias significativas el día 0 No encontrándose esta diferencia durante todo el estudio.
- En el caso de la comparación entre el promedio de los valores del RL y la 2º infiltración de MSC alogénicas, se pudieron encontrar diferencias significativas en los días 0, 1 y 2.

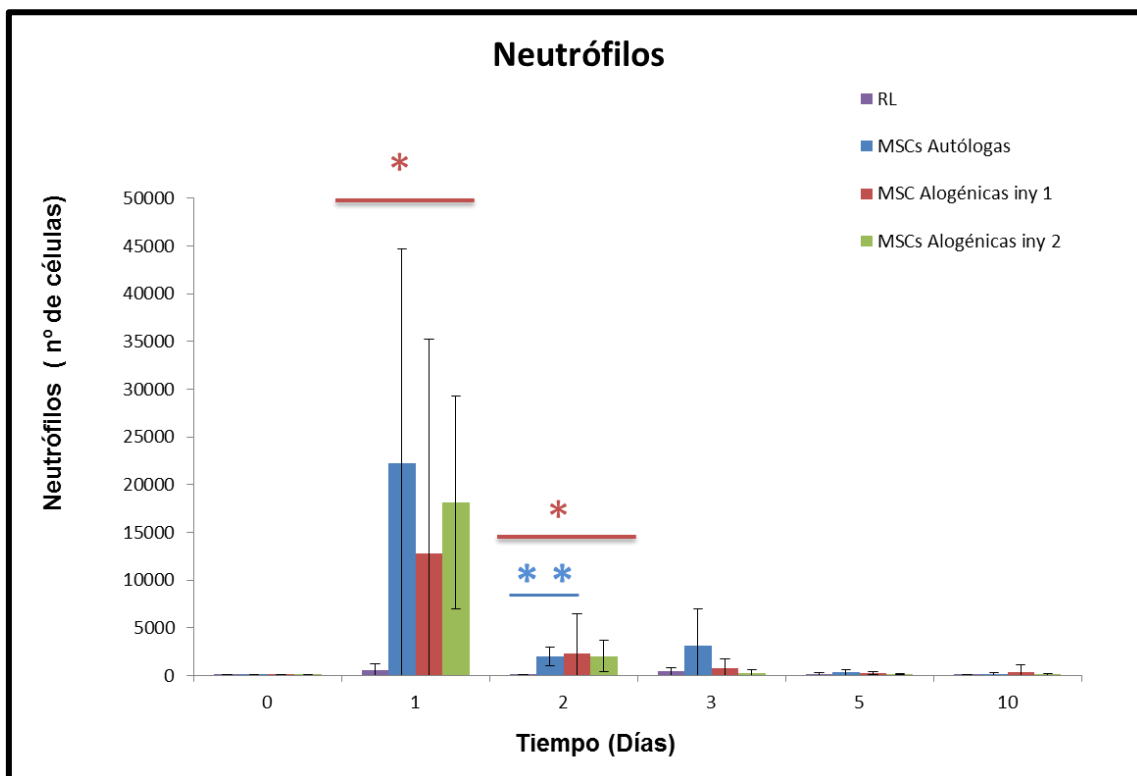


Gráfica 32 Estudio comparativo entre los valores de recuento leucocitario entre los tres tratamientos con células madre y el RL. Al comparar RL con el tratamiento de MSC autólogas, encontramos diferencias significativas los días 1 y 2 del tratamiento.(Véase asteriscos azules).en el estudio entre los valores promedios de RL y la primera inyección de MSC alogénicas, únicamente existían diferencias significativas el día 0 No encontrándose esta diferencia durante todo el estudio.( Véase asterisco verde)En el caso de la comparación entre el promedio de los valores del RL y la 2º infiltración de MSC alogénicas, se pudieron encontrar diferencias significativas en los días 0, 1 y 2.(Véase asterisco rojo)( $p < 0.05$ )

## NEUTRÓFILOS

Tras el análisis estadístico realizado, utilizando la prueba T de Student ( $p < 0.05$ ) se pudo observar que: (Gráfica 33)

- Si comparamos el RL con el tratamiento de MSC autólogas, únicamente encontramos diferencias significativas el 2º día del estudio. No encontrándose más diferencias en ningún otro momento.
- Cuando se realizó la comparación entre los valores promedios de RL y la primera inyección de MSC alogénicas, no se encontraron diferencia significativas a lo largo de todos el experimento.
- En el caso de la comparación entre el promedio de los valores del RL y la 2º infiltración de MSC alogénicas, se pudieron encontrar diferencias significativas en los días 1y 2 post inoculación. No existiendo esta diferencia los días posteriores del estudio.



Gráfica 33. Estudio comparativo entre los valores de recuento de neutrófilos entre los tres tratamientos con células madre y el RL. AL comparar el RL con el tratamiento de MSC autólogas, únicamente encontramos diferencias significativas el 2º día del estudio, (véase asterisco verde) Cuando se realizó la comparación entre los valores promedios de RL y la primera inyección de MSC alogénicas, no se encontraron diferencia significativas a lo largo de todos el experimento. En el caso de la comparación entre el promedio de los valores del RL y la 2º infiltración de MSC alogénicas, se pudieron encontrar diferencias significativas en los días 1y 2 post inoculación. No existiendo esta diferencia los días posteriores del estudio (véase asterisco rojo) ( $p < 0.05$ )

## **DISCUSIÓN**

Los problemas articulares en caballos son un problema patente en el mundo deportivo equino, como ya se sabe, la osteoartritis (OA) y la osteocondrosis (OCD), son dos patologías muy comunes en caballos de deporte y problema de difícil solución para muchos clínicos [74]. La terapia celular mediante el uso de células madre, esta abriendo, tanto en medicina humana como en veterinaria, un gran campo de investigación y desarrollo de tratamientos realmente efectivos para estas enfermedades [75].

Por esto se decidió realizar un estudio que valorase el efecto del uso de las células madre mesenquimales autólogas y alogénicas en las articulaciones del caballo. El hecho de estudiar ambos tipos celulares está fundamentado principalmente en la limitación de tiempo y disponibilidad que tiene el uso de células madre autólogas [6] ya que, cuando se diagnostica un problema articular lo conveniente sería tratarlo con la mayor rapidez posible. Si se aplica la terapia con MSC autólogas, son necesarios de 20 a 30 días hasta obtener un número adecuado de células madre en cultivo preparadas para usarse y en este tiempo de espera, la lesión se va cronificando y las posibilidades de éxito disminuyen. Debido a las razones que acabamos de exponer, el uso de las células madre alogénicas criopreservadas en un banco celular para el uso inmediato por parte del clínico, supondría una ventaja significativa.

Las dos fuentes principales de obtención de MSC son la médula ósea y tejido adiposo. Las células utilizadas en el presente estudio fueron obtenidas de médula ósea (BM-MSC)

La obtención de la médula ósea es un procedimiento que, pese a parecer sencillo, se debe de tener cuidado con la técnica de realización ya que, existe la posibilidad, debido a su proximidad anatómica, de lesionar el corazón a la hora de introducir la aguja de Jamshidi. Si no se dispone de la experiencia necesaria sería conveniente monitorizar el procedimiento con un ecógrafo para localizar el punto adecuado de punción como describe Kasashima y col. [70]. Las extracciones realizadas en el presente estudio se llevaron a cabo sin monitorización y en ningún caso se ha generado ninguna reacción adversa en el momento de su realización ni en días posteriores.

Las BM-MSC mostraron un patrón de crecimiento normal, y se consiguieron un número relativamente alto de células en un periodo corto de tiempo. La tasa de proliferación de los cultivos celulares realizados durante nuestro estudio es similar a los resultados mostrados en otros trabajos [50] [51].

Tras la criopreservación, se observó que las células y éstas siguieron un patrón de crecimiento normal al ser sometidas de nuevo a cultivo.

Las BM-MSC equinas mostraron un patrón de expresión de marcadores de superficie similar al mostrado por las células de otras especies como la humana o la murina, aunque según indican Ranera y cols en 2012, la expresión puede variar desde el punto de vista cuantitativo [72].

Una visión global de los resultados de este trabajo muestra que la inoculación intraarticular de MSC equinas, independientemente de su origen

(autólogas o alogénicas) produce una reacción inflamatoria transitoria que se normaliza en 10 días sin necesidad de tratamiento alguno. Esta inflamación pasajera es, en la mayoría de los animales, difícilmente detectable a nivel clínico, pero sí que es muy marcada en los parámetros laboratoriales analizados en el líquido sinovial (proteínas totales, recuento leucocitario total y de neutrófilos).

Estos resultados concuerdan con evidencias clínicas descritas y en las que se han inyectado MSC equinas autólogas, tanto en casos experimentales como en casos clínicos [76] [77].

Tras la realización de una revisión bibliográfica exhaustiva no se ha encontrado ningún ensayo en el que se valore el efecto intraarticular de las MSC provenientes de médula ósea. El único estudio que documenta el uso intraarticular de MSC alogénicas equinas [56], utiliza células de placenta y cordón umbilical. Las reacciones adversas que encontraron son de la misma índole que las registradas en nuestros Experimento 2.

También existen trabajos que documentan el uso de MSC alogénicas equina en tendón, mostrando que no se producen efectos adverso significativos tras la administración [78]. Otros estudios describen que el uso de una mezcla de células madre alogénicas derivadas de grasa, junto con PRP inyectados intralesionalmente en caballos con tendinitis clínicas no provoca reacciones adversas post-inyección excepto en algunos animales que tuvieron un leve edema y dolor en el sitio de inyección durante 2 días; los autores creen que esa inflamación local se debe a la reacción que produce la inyección en los tejidos blandos [79].

Habitualmente, estos estudios que utilizan MSC alogénicas equinas sólo administran una única dosis de este tipo de células. De hecho, no hemos encontrado, en la bibliografía consultada ningún estudio que documente la inyección intraarticular repetida de MSC alogénicas equinas. Destacadas figuras de este campo de investigación [7] han indicado la imperiosa necesidad de realizar protocolos de administración intraarticular repetida de células alogénicas para evaluar la respuesta.

En el Experimento 3 hemos estudiado la respuesta inflamatoria articular tras una segunda inoculación BM-MSC alogénicas y los resultados de este experimento muestran, de nuevo, que la reacción inflamatoria que se produce es similar, o incluso menor, a la provocada por la BM-MSC autólogas o por la primera inyección de BM-MSC alogénicas generando una respuesta inflamatoria transitoria, más marcada a nivel laboratorial que clínico y que se resuelve espontáneamente en 10 días o menos.

La causa exacta de esta inflamación se desconoce [56], pero se puede descartar un posible origen séptico, ya que, además de que todos los procesos de obtención, expansión e infiltración se realizaron respetando escrupulosamente las medidas asépticas, no hubo evidencias clínicas ni citológicas de una posible artritis séptica y, sobre todo, la inflamación fue auto-limitante y se resolvió sin necesidad de ningún tipo de tratamiento, lo cual es incompatible con la evolución de una sepsis articular iatrogénica [10].

Según autores como AL Bertone [80] o T Stashack [10] existe una “zona gris” entre las artritis traumáticas o inflamatorias asépticas con alta celularidad

(> 50.000) y las artritis reactivas con alta celularidad en las que incluso se pueden alcanzar valores superiores a 100,000 células nucleadas/ $\mu$ l.

Numerosos autores [10] [80] [81] hacen referencia a este fenómeno de artritis reactiva indicando que cualquier inyección articular provoca al menos una sinovitis leve, pero existe un tipo de sinovitis reactiva que puede ocurrir después de la inyección articular de cualquier tipo de producto [80]. Un fármaco activo o un producto químico en solución, puede producir una sinovitis reactiva. La contaminación con endotoxinas en el caso de viales de dosis múltiple o incluso en viales de un solo uso, puede también producir una sinovitis reactiva. En el caso de viales de dosis múltiple, la sospecha de contaminación por endotoxinas debe ser alta si más de un animal muestra signos clínicos dentro de un periodo corto de tiempo. Los caballos son muy sensibles a las endotoxinas; concentraciones por encima de 0.125 nanogramos por articulación provocan sinovitis. Después de la inyección de acetato de metilprednisolona, corticoide ampliamente usado en infiltraciones terapéuticas, se ha podido observar en líquido sinovial, presencia de células inflamatorias vehiculando cristales después de 6 semanas.

Algunos autores han señalado que esta respuesta inflamatoria tras la administración de MSC puede deberse a la sensibilidad exquisita de las articulaciones equinas sanas a la introducción de citoquinas proinflamatorias que podrían estar presentes en los cultivos celulares [56], o incluso a restos de sustancias químicas o biológicamente activas presente en los medios de cultivo utilizados, como el suero fetal bovino. Hay que destacar que el trabajo que propone esta posibilidad se realiza con MSC equinas obtenidas de placenta y cordón umbilical y que en él se argumenta que este tipo de reacciones no se han observado con MSC de otros orígenes en práctica clínica habitual, aunque ellos mismos reconocen que el seguimiento de estos casos es exclusivamente clínico, sin muestreo sinovial post-tratamiento y, tal y como muestra nuestros resultados, la inflamación obtenida puede ser difícil de detectar a nivel clínico y sólo es evidente en los parámetros sinoviales.

Estos mismos autores señalan que la respuesta inflamatoria no puede ser debida al efecto de las artrocentesis repetidas, ya que, en las condiciones de su estudio, no hay diferencias en los valores sinoviales del grupo control. Consideramos que esta apreciación puede ser incorrecta, como así lo demuestran diferentes trabajos [82, 83]. De hecho, en nuestros resultados sí que se observa en las articulaciones control un aumento de los valores de proteínas, recuento total de células blancas y neutrófilos durante los primeros días, con valores que llegan a ser estadísticamente significativos entre la muestra basal y los días 1 y 2 post-inoculación, lo cual coincide con los días de mayor frecuencia de artrocentesis. Este hecho podría hacer suponer que parte de la respuesta inflamatoria que observamos al administrar BM-MSC dentro de los primeros días post inoculación celular, fuera debida a las artrocentesis seriadas realizadas en un corto periodo de tiempo. Para evitar esta influencia de la artrocentesis se podrían evaluar marcadores sinoviales que no se ven alterados por la punción articular seriada, como, por ejemplo, el amiloide sérico A [82, 83]. Disponemos de muestras de sinovia recogidas durante nuestro trabajo, congeladas a  $-80^{\circ}$  C y adecuadamente identificadas, para poder realizar estas u otras determinaciones en un futuro próximo y completar así el estudio.

Otro hecho a tener en cuenta es que, tal y como se describe en la literatura, la respuesta inflamatoria a la inyección intraarticular de diferentes productos es diferente entre las diversas articulaciones. Así, se ha observado que las articulaciones interfalangiana distal y la tarsocrural, son más susceptibles a padecer artritis reactiva después de una inyección de glucosaminoglicanos polisulfatados [80], por lo que las diferencias en la respuesta inflamatoria inicial entre las articulaciones infiltradas con MSC autólogas y las inoculadas con BM-MSC alogénicas podría deberse a que las primeras se hicieron en la articulación tarsocrural y las segundas en la carporadial, la cual parece ser menos propensa a la reacción inflamatoria que la tarsocrural [80].

Por otro lado, en los resultados obtenidos hemos detectado una gran variabilidad individual, tanto en la inoculación de células autólogas como alogénicas. La fuerte disparidad en los parámetros inflamatorios medidos podría ser debida a la variabilidad en la respuesta inflamatoria de cada individuo o incluso a las diferencias que podrían darse, como ya se ha visto en el caso de la artritis reactiva, entre articulaciones (tarso o carpo, como es nuestro caso) dentro de un mismo animal [80].

Consideramos importante destacar que nuestros experimentos se han llevado a cabo con articulaciones sanas y que podría darse la circunstancia de que la respuesta de una articulación afectada (OA u OCD) sea distinta cuando se infiltra con MSC. Sería necesario desarrollar un nuevo protocolo experimental que evaluara esta posibilidad, que, de confirmarse, explicaría algunos hallazgos clínicos de inflamación clínica severa (pero autolimitante en pocos días o que se resolvieron con una única administración de antiinflamatorios) tras la inoculación de MSC autólogas en articulaciones tarsocrurales con osteoartritis que hemos podido observar en nuestra actividad clínico-asistencial (datos sin publicar) o de otros colegas (Prades, 2011, comunicación personal).

En nuestros resultados se observa una elevación más marcada del recuento de células blancas (y el número de neutrófilos) que en los valores de proteínas. Esta diferencia puede deberse a diferencias en la cinética de estos dos marcadores inflamatorios o al hecho de que el primero es causado por la fenestración capilar (concentración de proteína total) y el otro por quimiotaxis (recuento total de células nucleadas en líquido sinovial) [84]. Estos hallazgos sugieren que la inflamación provocada por la inyección de MSC aumenta la permeabilidad conjunta y flujo de fluido a través de la membrana sinovial en mayor medida que el efecto sobre la afluencia celular [56]. Esta tendencia ha sido también observada en otros trabajos que estudiaban la respuesta de líquido sinovial equino a la inyección intraarticular de diferentes sustancias y/o a diferentes estímulos inflamatorios [84] [85].

Estudios realizados por el grupo LAGENBIO (datos en proceso de publicación), han demostrado que existe un efecto inmunomodulador de las MSC *in vitro*. Utilizando células madre obtenidas a partir de grasa y de médula ósea de caballos experimentales han demostrado que el crecimiento de linfocitos T *in vitro* está notablemente disminuido en presencia de MSC y este efecto inhibitorio de crecimiento es más acusado con células madre mesenquimales obtenidas de la grasa. Estos estudios nos hacen plantear la posibilidad de realizar el mismo experimento utilizando un *pool* de células



madre obtenidas a partir de grasa y observar si el efecto inflamatorio sería menos marcado que el obtenido en nuestro análisis.

Diferentes estudios, demuestran que las MSC implantadas intraarticularmente, se integran preferentemente en los tejidos blandos articulares [86] [87] y que parece haber un mejor comportamiento regenerativo de las células madre obtenidas de la médula ósea que las obtenidas de la grasa.

Uniendo ambas circunstancias se plantearía la hipótesis de crear mezclas de células tanto de grasa como de médula obtenida de diferentes animales como el mejor tratamiento para lesiones articulares, ya que si ambos tipos celulares actuarían en sinergia, lograríamos con una sola infiltración obtener los beneficios de inmunomodulación por parte de las células de la grasa y el comportamiento regenerativo por parte de las BM-MSC.

Otra de las hipótesis de continuación en esta línea de trabajo es comprobar si las células madre alogénicas perduran en el sitio de inoculación el mismo tiempo que las autólogas o si por el contrario son destruidas por el sistema inmune o logran una inmunomodulación tal que hace que perduren más tiempo. Por todo ello sería conveniente realizar estudios de marcaje celular para comprobar qué es lo que sucede realmente con estas células.

Con los resultados en el presente estudio y todas las posibles hipótesis que se puedan barajar, consideramos que la línea de trabajo iniciada tiene un gran interés ya que creemos que la hipótesis de que sea viable la creación de un banco celular, en el que se conservasen células madre alogénicas criopreservadas, disponibles para su utilización en caso de lesiones del aparato locomotor agudas o patologías inmunomediadas (como puede ser el caso de obstrucción recurrente de vías altas o la uveítis recurrente equina), está cada vez más cerca y sería una herramienta clave en la terapia celular equina.

## **CONCLUSIONES**

## 7. CONCLUSIONES

De los resultado obtenidos a partir de las experiencia realizadas en el presente estudio, de su discusión y contraste con otras aportaciones pueden extraerse las siguientes conclusiones

1. Tras la inoculación intraarticular de BM-MS **autólogas**, los animales no presentan ningún tipo de cojera severa, ni dolor articular y los parámetros laboratoriales pese a aumentar en los primeros días post inoculación, se normalizan dentro de los 10 primeros días.
2. Tras la inoculación intraarticular de BM-MS **alogénicas**, los animales no presentan ningún tipo de cojera severa, ni dolor articular y los parámetros laboratoriales pese a aumentar en los primeros días post inoculación, se normalizan dentro de los 10 primeros días.
3. Tras una **segunda inoculación** intraarticular BM-MS **alogénicas**, idéntica a la administrada en la misma articulación en un tratamiento previo durante el mes anterior, los animales no presentan ningún tipo de cojera severa, ni dolor articular, y los parámetros laboratoriales pese a aumentar en los primeros días post inoculación, todos se normalizan dentro de los 10 primeros días.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. [www.horsecouncil.org](http://www.horsecouncil.org) : "National economic impact of the u.S. Horse industry,"
2. Porter M: **Equine rehabilitation therapy for joint disease.** *Vet Clin North Am Equine Pract* 2005, **21**(3):599-607, vi.
3. Phinney DGaDJP: **Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views.** *Stem Cells* 2007, **25**(11):p. 2896-2902
4. G Siegel. R, Schafer and F. Dazzi, : **The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells,**. *Transplantation* 87 2009, no. 9:Suppl, S45-49
5. Williams IF, A. Heaton and K. G. McCullagh, : **Cell morphology and collagen types in equine tendon scar.** *Res Vet Sci* 28 (1980), no 3, 302-310.
6. M.Conzemius: **Stem cells- fact or fiction?** In: *Proceedings of the 15th ESVOT CONGRESS Italy .2010.*; Italy .2010.
7. Fortier LA: **Making progress in the what, when and where of regenerative medicine for our equine patients.** *Equine Vet J*, **44**(5):511-512.
8. Hinchcliff K W KAJ, Geor R J, Bayly W. : **Medicina y cirugía en los equinos de deporte.**, vol. vol 1: .editorial Intermédica; 2007.
9. Ribera T PM: **Tratamientos intraarticulares.** *EQUINUS* 2007, **Segundo cuatrimestre Nº 18.**
10. Stashak T: **Adams: claudicacion en el caballo**, 5 edn: intermedica; 2005.
11. Dominguez Gimeno M. Laborda Val J GGJ, Nuviala Ortin J. : **Guía práctica de artrocentesis en el caballo.** *Ed Laboratorios Dr Esteve SA* 2002.
12. Hinchcliff KWK, A J. Geor, R J. Bayly, W.: **Medicina y cirugía en los equinos de deporte.**, vol. vol 1: .editorial Intermédica; 2007.
13. McIlwraith CW: **Current concepts in equine degenerative joint disease.** *J Am Vet Med Assoc* 1982, **180**(3):239-250.
14. Palmer JL, Bertone AL: **Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease.** *Equine Vet J* 1994, **26**(4):263-277.
15. Novales MD: **La osteocondrosis en el caballo de pura raza española.** In: *CICADE.* 2007.
16. Fortier LA: **Current Concepts in Joint Therapy.** *Proceedings of the 11 th Congress of WEVA* 2009.
17. **Colegio médico veterinario de la provincia de Córdoba Etiopatogenia de artritis en equinos.** In: *XXVII Jornadas de actualizacion en ciencias veterinarias* Argentina 2008.
18. Vazquez F: **Medicina regenerativa: aplicacion en la clínica equina.** In: *I Congreso solidario de clínica equina: 2012; Madrid; 2012.*
19. Frisbie DD SR: **Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics.** *Equine Vet J* 2010, Jan;**42**(1):pp 86-89.
20. Herthel DJ: **Enhanced Suspensory Ligament Healing in 100 Horses by Stem Cells and Other Bone Marrow Components.** AAEP Proceedings 2001

21. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**(12):4279-4295.
22. Nixon AJ DL, 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.
23. Frisbie DD, Kisiday JD, KC, Werpy NM, McIlwraith CW.: **Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis.** *J Orthop Res.* 2009 Dec;27(12):1675-80.
24. Schnabel LV, SH, Jacobson MS, Fortier LA.: **Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures.** *Equine Vet J.* 2008 May;40(3):260-5.
25. Argüelles D, Carmona JU, PJ, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M: **Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets.** *Res Vet Sci.* 2006 Oct;81(2):237-45.
26. Bosch G, RvWP, Barneveld A, van Schie HT. : **Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo.** *Vet J.* 2011 Jan;187(1):92-8. Epub 2009
27. Bosch G, vSH, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR. : **Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study.** *J Orthop Res.* 2010 Feb;28(2):211-7.
28. Bosch G, Moleman M, BA, van Weeren PR, van Schie HT. : **The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions.** *Scand J Med Sci Sports.* 2011 Aug;21(4):554-61.
29. Argüelles D, Carmona JU, CF, Muñoz E, Prades M.: **Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses.** *Vet Rec.* 2008 Feb 16;162(7):208-11.
30. Dohan DM, Choukroun J, DA, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. : **Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates?** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):e51-5.
31. Kevin Corley JS (ed.): **The Equine Hospital Manual:** Blackwell publishing; 2008.
32. Andrades A: **Anestesis intra-articulares en el miembro torácico del caballo y sus aplicaciones.** PV Albeitar 2011.
33. Auer A, Stick J.: **Equine Surgery. third edition** ed Saunders Elseiver 2006.

34. Crovace A, Staffeieri F, Rossi G.: **Implantation of autologous bone marrow mononuclear cells as a minimal invasive therapy of Legg-Calve-Perthes disease in the dog.** *15th Annual European ESVOT Congress* 2010.
35. Baksh D, Song L, Tuan RS.: **Adult Mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy.** *J Cell: Mol Med Vol 8, No 3, 2004 pp 301-316* 2004.
36. Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD: **Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction?** *Equine Vet J* 2007, **39**(2):172-180.
37. Rodríguez Pardo V: **Células Madre: Conceptos generales y perspectivas de investigación.** *Revista de la Facultad de ciencias PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA* 2005, **Vol 10, Nº1 5-14.**
38. Jpuoperi T: **Stem cells and cáncer.** *Proceedings of the ACVP/ASVCP Annual Meetings - Monterey, California, USA - 2009.*
39. Y. B. Deng, XG, Liu., Z. G. Liu, X. L. Liu, Y. Liu and G. Q. Zhou.: **Implantation of bm mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: Evidence from a study in rhesus monkeys.** *Cytotherapy* 8 (2006), no 3, 210-214.
40. O Karnieli, Y I-PS, Bulvik and S, Efrat.: **Generation of insulinproducing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation,** . *Stem Cells* 25 (2007), no 11, 2837-2844.
41. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS: **The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.** *Cell Tissue Kinet* 1970, **3**(4):393-403.
42. Kaneko S, Motomura S, Ibayashi H: **Differentiation of human bone marrow-derived fibroblastoid colony forming cells (CFU-F) and their roles in haemopoiesis in vitro.** *Br J Haematol* 1982, **51**(2):217-225.
43. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA: **Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.** *Blood* 1980, **56**(2):289-301.
44. Arevalo J, Páez, DM., Rodríguez, VM.: **Células Madre Mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas.** *Laboratorio de Hematología Pontificia Universidad Javeriana* 2007.
45. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 2006, **8**(4):315-317.
46. De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A: **Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity.** *Theriogenology*, **75**(8):1431-1443.
47. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG: **Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.** *Stem Cells* 2001, **19**(3):180-192.
48. Lee HS, Huang G. T, Chiang H., Chiou L. L., . Chen .M. H, . Hsieh C. H, . Jiang C. C, : **Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis,** *Stem Cells* **21** (2003), no. 2, 190-199.

49. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G *et al*: **Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers.** *Stem Cells* 2006, **24**(2):376-385.
50. Martinez-Lorenzo MJ, Royo-Canas M, Alegre-Aguaron E, Desportes P, Castiella T, Garcia-Alvarez F, Larrad L: **Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species.** *J Orthop Res* 2009, **27**(11):1499-1507.
51. Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, Spadari A, Galli C, Lazzari G: **Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor.** *Vet Res Commun* 2009, **33**(8):811-821.
52. Fortier LA, Travis AJ: **Stem cells in veterinary medicine.** *Stem Cell Res Ther*, **2**(1):9.
53. Koch TG, Berg LC, Betts DH: **Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine.** *Can Vet J* 2008, **49**(10):1009-1017.
54. Baksh D, Song L, Tuan RS: **Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy.** *J Cell Mol Med* 2004, **8**(3):301-316.
55. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L: **Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?** *Trends Immunol* 2007, **28**(5):219-226.
56. Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL: **Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses.** *Cytotherapy*, **13**(4):419-430.
57. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EGA, Willemze R, Fibbe WE: **Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting.** *Blood* 2006, **108**(6):2114-2120.
58. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP: **Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection.** *J Inflamm (Lond)* 2005, **2**:8.
59. Williams F, Heaton, A. McCullagh, K. G.: **Cell morphology and collagen types in equine tendon scar,** *Res Vet Sci* **28** (1980), no. 3, 302-310.
60. Smith R: **Results of treatment of bone marrow derived mesenchymal stem cell therapy.** *Proceedings of the 15th ESVOT congress.* Sept 15-18, Italy 2010.
61. Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, Addicks K, Litzke LF: **Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells.** *Am J Vet Res* 2007, **68**(10):1095-1105.
62. B. Ranera. LO, J.. Lyahyai, M. L. Bernal, F. Fernandes, A. R. Remacha, A. Romero, F. J. Vazquez, R. Osta, C. Cons, L. Varona, P. Zaragoza, I. Martin- Burriel, C. Rodellar, Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells, *Equine Vet J* **44**, no. 1, 33-42.



63. S. Ibrahim K, Saunders., J. H. Kydd, D. P. Lunn, F. Steinbach: , **Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes**, *Vet Immunol Immunopathol* 119 (2007), no. 1-2, 63-80.
64. Prockop DJ: **"Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs)**. *Clin Pharmacol Ther* 2007, **82**(3):241-243.
65. Weil BR, Manukyan MC, Herrmann JL, Abarbanell AM, Poynter JA, Wang Y, Meldrum DR: **The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: implications for surgical disease**. *J Surg Res*, **167**(1):78-86.
66. Frisbie DD: **Future directions in treatment of joint disease in horses**. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2005, **21**(3):713-724, viii.
67. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, Park RD, McIlwraith CW: **Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses**. *Vet Surg* 1999, **28**(4):242-255.
68. Barnewitz D, Endres M, Kruger I, Becker A, Zimmermann J, Wilke I, Ringe J, Sittlinger M, Kaps C: **Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts**. *Biomaterials* 2006, **27**(14):2882-2889.
69. Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ: **Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model**. *J Orthop Res* 2007, **25**(7):913-925.
70. Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith RKW: **Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells**. *Equine Vet J*, **43**(3):288-294.
71. Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vazquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martin-Burriel I: **Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue**. *Vet Immunol Immunopathol*, **144**(1-2):147-154.
72. Ranera BO, L. Lyahyai,J. , . **Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells**. *Equine Vet J*, **44**(1):33-42.
73. **American Association of Equine Practitioners (AAEP). Guide for veterinary service and judging of equestrian events: definition and classification of lameness.AAEP 1991.**
74. Frisbie DD, Stewart MC: **Cell-based therapies for equine joint disease**. *Vet Clin North Am Equine Pract*, **27**(2):335-349.
75. Ilic D, Polak J: **Stem cell based therapy--where are we going?** *Lancet*, **379**(9819):877-878.
76. Mokbel AN, El Tookhy OS, Shamaa AA, Rashed LA, Sabry D, El Sayed AM: **Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model**. *BMC Musculoskelet Disord*, **12**:259.
77. McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR: **Evaluation of intra-articular mesenchymal stem**

- cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy*, **27**(11):1552-1561.
78. 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.
  79. Del Bue M RS, Ramoni R, et al. : **Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo.** *Vet Res Commun* 2008;**32**:S51-S55.
  80. Bertone AL: **Noninfectious Arthritis.** In **DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF LAMENESS IN THE HORSE**, 2nd ed, MW Ross & SJ Dyson Eds, Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, p657 a 690. 2011.
  81. Michael W. Ross SJD: **Diagnosis and Management of Lameness in the Horse**, . 2º edicion. Ed. Elseivier Saunders.
  82. Sanchez Teran A, Rubio Martinez, LM.,Villarino, N.,Sanz,M., : **Synovial serum amyloid A after repeated intrararticular administration of amikacin into equine healthy joints.** *Large animal sessions ECVS proceedings* 2012.
  83. Jacobsen S, Thomsen, MH., Nanni,S.: **Concentration of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease.** *AJUR vol 67 N° 10 pp 1738-1742* 2006.
  84. Lindegaard C, Gleerup KB, Thomsen MH, Martinussen T, Jacobsen S, Andersen PH: **Anti-inflammatory effects of intra-articular administration of morphine in horses with experimentally induced synovitis.** *Am J Vet Res*, **71**(1):69-75.
  85. Kay AT, Bolt DM, Ishihara A, Rajala-Schultz PJ, Bertone AL: **Anti-inflammatory and analgesic effects of intra-articular injection of triamcinolone acetone, mepivacaine hydrochloride, or both on lipopolysaccharide-induced lameness in horses.** *Am J Vet Res* 2008, **69**(12):1646-1654.
  86. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju Y-J, Mochizuki T, Sekiya I: **Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit.** *Cell Tissue Res* 2008, **333**(2):207-215.
  87. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP: **Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(12):3464-3474.