



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

**El papel de la respuesta inmune en el desarrollo y progresión de la
osteoartritis**

**The role of the inmunitary response in the developing and progression of
osteoarthritis**

Autor

Elena García Mainou

Directores

Laura Barrachina porcar

Arantza Vitoria Moraiz

Facultad de Veterinaria

Año 2022

INDICE

1. RESUMEN/ ABSTRACT	3
2.INTRODUCCIÓN	4
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	4
4. MATERIAL Y MÉTODOS	5
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
5.1 Etiopatogenia de la Osteoartritis	6
5.1.1. Principales mediadores de la OA	7
5.1.1.1. Enzimas degradativas de la MEC.....	7
5.1.1.2. Citoquinas pro-inflamatorias	7
5.1.1.3.. Neuropéptidos	7
5.1.2. Cambios en la articulación durante la OA.....	8
5.1.2.1. Fibrilación y erosión del cartílago articular.....	8
5.1.2.2. Sinovitis y capsulitis	8
5.1.2.3. Cambios en el hueso subcondral	8
5.1.2.4. Formación de osteofitos	9
5.1.2.5. Dolor articular	9
5.1.3. Papel del sistema inmune en la osteoartritis.....	10
5.1.3.1. Papel del sistema inmune innato en la OA	11
5.1.3.1.1. Macrófagos	12
5.1.3.1.2. Sistema del complemento	14
5.1.3.1.3. Mastocitos.....	14
5.1.3.2. Papel del sistema inmune adaptativo en la OA	15
5.1.3.2.1 Papel de Linfocitos T en la OA.....	16
5.1.3.2.1.1. Linfocitos T auxiliares	16
5.1.3.2.1.2. Linfocitos T reguladores.....	17
5.1.3.2.1.3. Linfocitos T foliculares	17
5.1.3.2.1.4. Células T citotóxicas	17
5.1.3.2.1.5. células T de memoria	17
5.1.3.2.2 Papel de los linfocitos B en la OA.....	18
5.2 Diagnóstico de la OA	18
5.2.1 Biomarcadores	18
5.2.1.1 Biomarcadores directos de la OA.....	19

5.2.1.2. Biomarcadores indirectos de la OA.....	20
5.3. Tratamiento de la osteoartritis.....	20
5.3.1. Dianas terapéuticas.....	21
5.3.2. Terapias convencionales.....	23
5.3.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	23
5.3.2.2. Corticoesteroides.....	23
5.3.2.3. Ácido hialurónico.....	24
5.3.3. Terapias biológicas.....	24
5.3.3.1. células madre mesenquimales.....	25
5.3.3.2. Productos autólogos derivados de la sangre.....	26
5.3.3.2.1 Suero autólogo condicionado.....	26
5.3.3.2.2. Solución proteica autóloga.....	26
5.3.3.2.3. Plasma rico en plaquetas.....	27
5.3.3.3. Concentrado de aspirado de médula ósea.....	28
5.3.3.4. Terapia génica.....	28
5.3.3.5. Terapias para el hueso subcondral.....	29
5.3.4. Tratamiento quirúrgico.....	30
6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	31
7. VALORACIÓN PERSONAL.....	32
8. BIBLIOGRAFIA.....	32

1. RESUMEN/ ABSTRACT

La Osteoartritis (OA) es una patología crónica y de etiología multifactorial que tiene una gran prevalencia en caballos, animales de compañía y humanos. Aunque conocemos la gran importancia clínica y económica de esta enfermedad, la comprensión de su patogenia aún está en desarrollo. Actualmente se considera que el sistema inmune juega un papel muy importante en la regulación y perpetuación de la inflamación articular de bajo grado, que resulta finalmente en la destrucción del cartílago y afección de estructuras adyacentes. Por ello, el objetivo de este Trabajo Fin de Grado es realizar una revisión bibliográfica sobre la implicación de la respuesta inmune en la fisiopatogenia de la OA equina, y establecer su relación con posibles biomarcadores y dianas terapéuticas. Es necesario cambiar el paradigma de que el sistema inmune se encarga únicamente de la defensa del organismo frente a agentes infecciosos, y empezar a comprender el papel que ejerce la respuesta inmune en la osteoartritis y otros procesos. Estudiar la etiopatogenia de la OA es esencial tanto para poder desarrollar sistemas de diagnóstico temprano mediante el uso de biomarcadores, que abarquen además la monitorización y respuesta al tratamiento, como para relacionar los procesos que tienen lugar con posibles dianas terapéuticas. De esta forma, los nuevos avances terapéuticos buscan desarrollar tratamientos desde un abordaje multimodal de todos los tejidos implicados, además de lograr terapias individualizadas según las características y fenotipos de cada paciente.

Osteoarthritis (OA) is a chronic and multifactorial pathology that is highly prevalent in horses, companion animals and humans. Although we know the great importance of this disease both in clinical and economic terms, the understanding of its pathogenesis is being continuously updated. It is currently considered that the immune system plays a major role in the regulation and perpetuation of low-grade articular inflammation that ultimately results in the destruction of cartilage and affection of adjacent structures. Therefore, the purpose of this undergraduate Thesis Project is to conduct a literature review on the involvement of the immune response in the equine OA pathophysiology, and to elucidate its relationship with potential biomarkers and therapeutic targets. It is necessary a paradigm shift on the concept of the immune system being only involved on the defence of the organism against infectious agents and start considering the key role of the immune response in the OA and in other processes. Understanding the OA etiopathogenesis is essential to develop biomarkers-based systems for early diagnosis, including monitoring and response to treatment, as well as to link the processes taking place, with potential therapeutic targets. Thus, new therapeutic advances seek to develop treatments from a multimodal approach to address all the tissues involved,

as well as to achieve personalised therapies according to the characteristics and phenotypes of each patient.

2. INTRODUCCIÓN

La visión integral del caballo como atleta dota de gran importancia a las enfermedades músculo-esqueléticas y, entre todas ellas, las patologías articulares se posicionan, dependiendo de la disciplina ecuestre, en el primer o segundo lugar (después de las alteraciones tendinosas) como causa principal de disminución del rendimiento (Weeren, 2014). Cuando un desorden articular no es diagnosticado y tratado a tiempo, es probable que dé lugar a un proceso crónico y progresivo conocido como osteoartritis OA, en el cual se produce una degeneración del cartílago articular involucrando también a otras estructuras adyacentes como son el hueso subcondral y tejidos blandos de la articulación (McIlwraith, 2010). La OA tiene una etiología multifactorial que la convierte en un proceso complejo y de gran relevancia, ya que afecta a un gran número de especies incluyendo humanos, animales de compañía y caballos. En estos últimos, la OA es responsable de hasta el 60% de las causas claudicación siendo en la clínica equina una enfermedad de gran importancia, ya que reduce el rendimiento y la vida deportiva afectando negativamente al bienestar animal (McIlwraith, 2010).

El caballo posee la ventaja de que presenta una mayor similitud del grosor, de la composición y las propiedades bioquímicas del cartílago con los del ser humano. Además, en la especie equina es posible tomar muestras repetidas de líquido sinovial, realizar intervenciones artroscópicas, técnicas de imagen e incorporar regímenes post-operatorios de rehabilitación. Por ello, aunque los estudios sobre la OA comiencen en su mayoría en modelos de pequeños animales como roedores, el uso del caballo permite una mejor extrapolación clínica. Es por esto por lo que el interés en desarrollar estudios sobre la OA en caballos se debe tanto a su importancia clínica como pacientes, como a su utilidad traslacional como modelo para la OA humana (McCoy, 2015).

El paradigma actual de la OA está evolucionando desde la consideración de que es una enfermedad puramente mecánica causada por el desgaste del cartílago hacia una respuesta biológica compleja que conecta la biomecánica, la inflamación y el sistema inmunológico (Woodell-May y Sommerfeld, 2020). Entender la etiopatogenia de esta enfermedad es crucial para poder desarrollar tratamientos específicos o métodos de diagnóstico temprano como los biomarcadores, que permiten una detección temprana de la enfermedad para poder actuar antes de que los cambios detectables mediante otros métodos diagnósticos sean irreversibles (Woodell-May y Sommerfeld, 2020).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las osteoartritis es una de las principales causas de pérdida de rendimiento deportivo en el caballo y actualmente no existe un tratamiento definitivo. Además de su importancia como paciente, el caballo destaca como modelo animal para el estudio de las patologías músculo esqueléticas. En las últimas décadas, esta enfermedad ha dejado de considerarse únicamente una consecuencia de procesos de desgaste, y se ha centrado en comprender los procesos inflamatorios que tienen lugar, entendiéndose como una patología multifactorial que afecta a toda la articulación y no solo al cartílago. Conocer el papel del sistema inmune en la OA abre la puerta a encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan desarrollar tratamientos específicos, además de biomarcadores que faciliten un abordaje de la OA en fases más tempranas.

Por todo ello, el objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado es revisar los procesos implicados en la patogenia de la osteoartritis, haciendo énfasis en el papel que desempeña el sistema inmune, y cómo este conocimiento puede mejorar el diagnóstico y tratamiento de esta patología. Para alcanzar este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Comprender la implicación de la respuesta inmune en la fisiopatogenia de la osteoartritis y conocer los mecanismos celulares implicados en los procesos inflamatorios y catabólicos que tienen lugar en dicha patología.
- Revisar el avance en el uso de biomarcadores diagnósticos para la osteoartritis, destacando aquellos basados en los distintos procesos relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria que se desarrollan en esta enfermedad.
- Relacionar la fisiopatogenia de la osteoartritis con posibles dianas terapéuticas, y revisar cómo estas pueden abordarse desde los tratamientos convencionales a los más innovadores.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología empleada para alcanzar los objetivos propuestos ha consistido en la revisión de bibliografía sobre el papel en la patogenia de la OA del sistema inmune y su relación con posibles biomarcadores y dianas terapéuticas. Para ello, se ha realizado la búsqueda de información en textos científicos como artículos, libros especializados, actas de congresos y trabajos académicos. Las herramientas empleadas para la búsqueda de la información han sido bases de datos informatizadas como Pubmed, Web of Science, Science direct, frontiers in immunology y Google Scholar. Las principales palabras clave utilizadas son las siguientes: “immune system”, “osteoarthritis”, “equine”, “therapeutic targets” o “biomarker”. Además, se amplió la búsqueda utilizando términos más específicos como “macrophage”, “innate immunity” o “adaptive immunity”, así como los nombres de diversos tratamientos. Se ha consultado bibliografía redactada en inglés y en español publicada a

partir del 2006, aunque se han incluido algunas citas más antiguas debido a su relevancia. Además, se ha incluido bibliografía de medicina humana y experimental en ratones en aquellos casos en los que la información en équidos es limitada. Las referencias bibliográficas se han introducido de forma manual y con la ayuda de google Académico y crossref.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Etiopatogenia de la Osteoartritis

La OA se puede clasificar en función de su etiología en primaria o secundaria. La forma primaria es menos frecuente en el caballo y se define como un trastorno *per se*, inherente a la articulación sin una causa incitante identificada. Mientras que la edad es el riesgo más significativo para el desarrollo de esta enfermedad en las personas, en los caballos también puede aparecer en ejemplares jóvenes debido al temprano inicio de su vida deportiva. De hecho, la OA secundaria es la más frecuente en el caballo y suele estar asociada a un proceso traumático, sobreuso o inestabilidad articular o procesos infecciosos como una sinovitis séptica (McIlWraith, 2011). Además, existen hipótesis sobre factores predisponentes para la aparición de la OA en caballos, como defectos conformacionales que den lugar a sobrecargas, un mal herraje que no permita absorber el impacto de la pisada adecuadamente, o la inmovilización por falta de ejercicio o reducción de cargas que conduce a una pérdida de los glicosaminoglicanos (GAGs), degeneración articular y atrofia (McIlWraith, 2011).

Por tanto, no siempre resulta sencillo identificar la causa de la OA, ya que esta es una enfermedad de origen multifactorial. Sin embargo, cualquiera que sea el proceso que desencadene la OA, su característica principal va a ser una pérdida de la homeostasis articular debido a un compromiso en el equilibrio entre anabolismo y catabolismo a favor de los procesos degradativos que van a predominar sobre la capacidad de reparación de los tejidos. De esta forma, la OA se define como un proceso crónico y degenerativo que se caracteriza, no solo por el deterioro progresivo del cartílago, sino también por la afección de las demás estructuras articulares, incluyendo el hueso subcondral y tejidos blandos. Además de la esclerosis subcondral y la formación de osteofitos marginales, la sinovitis es también un rasgo típico de esta enfermedad por su importante componente inflamatorio, que a su vez incrementa la limitación funcional y el dolor (McIlWraith, 2011).

Una vez iniciado el proceso inflamatorio desde un tejido primario afectado, se libera una cascada de mediadores inflamatorios que afectará al metabolismo de los tejidos secundarios, lo cual a su vez estimulará una mayor liberación de mediadores inflamatorios produciéndose un 'círculo vicioso' en el que la inflamación y el catabolismo se retroalimentan. Todos estos procesos finalmente contribuyen a alterar el estado metabólico del cartílago, produciendo así su degradación (Goodrich y Nixon, 2006).

5.1.1. Principales mediadores de la OA

Antes de continuar profundizando en los cambios que se producen en la articulación durante la OA, es importante conocer las principales moléculas, enzimas y mediadores que participan en dichos procesos.

5.1.1.1. Enzimas degradativas de la MEC

Las metaloproteinasas (MMPs) son un grupo de proteasas capaces de degradar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular (MEC) (Caron, 2011). Estas enzimas pertenecen a un grupo de endopeptidasas dependientes de zinc y pueden ser secretadas por sinoviocitos, condrocitos, macrófagos y neutrófilos (Prades y Carmona, 2009). Las MMP están presentes en altas concentraciones en el cartílago alterado y su distribución topográfica y concentración en este tejido está correlacionada con la severidad histológica de la lesión (Caron, 2011).

5.1.1.2. Citoquinas pro-inflamatorias

En la OA existen un gran número de citoquinas que participan en el desarrollo de la enfermedad promoviendo la inflamación y el catabolismo. Se considera que las proteínas pro-inflamatorias más importantes en la OA son la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), cuyos receptores se encuentran además sobre-expresados en el cartílago osteoartrítico. La activación de estos receptores tiene efectos deletéreos sobre el metabolismo de los condrocitos (Caron, 2011), ya que estimulan la producción de MMPs, óxido nítrico y prostaglandina E2 (PGE2), los cuales inhiben la síntesis de proteoglicanos (PG) y colágeno tipo 2 (Frisbie, 2005). Además, la IL-1 también contribuye en eventos proliferativos como la formación de osteofitos, como se verá más adelante, debido a la estimulación de osteoblastos que inducen a su vez la producción de otras citoquinas por parte de los condrocitos y células sinoviales. Por su parte, la PGE2 estimula la inflamación sinovial, lo que a su vez puede contribuir a la degradación de la MEC y erosión del cartílago y hueso subcondral, al inducir en estos la expresión de otras citoquinas y MMPs (Caron, 2011). Además, la PGE2 tiene un importante efecto en el proceso inflamatorio ya que promueve la dilatación vascular, reduce el umbral del estímulo doloroso y facilita la regulación del factor activador del plasminógeno (Prades y Carmona, 2009).

5.1.1.3. Neuropeptidos

La percepción sensitiva de las terminaciones nerviosas articulares no solo proporciona información del dolor, sino que además, conduce a la liberación de neurotransmisores con un potencial papel inflamatorio, puesto que la exposición a neuropeptidos como la sustancia P, causan la liberación de citoquinas tales como IL-1, IL-6 y TNF- α (McIlwraith, 2004), cuyos papeles se han explicado en el apartado anterior.

5.1.2. Cambios en la articulación durante la OA

Como se ha mencionado anteriormente, todas las estructuras que componen la articulación pueden verse afectadas durante el desarrollo de la OA. A continuación, se expondrán los principales cambios observados en dichas estructuras para comprender mejor la progresión de este desorden.

5.1.2.1. Fibrilación y erosión del cartílago articular

Los condrocitos articulares son los encargados de mantener la homeostasis del cartílago articular mediante complejas interacciones con citoquinas y otros mecanismos que les indican cómo modificar su actividad. Durante la OA predominan los procesos catabólicos que alteran la MEC y producen la pérdida progresiva de la masa cartilaginosa y de sus propiedades viscoelásticas. Los condrocitos son considerados los mediadores más importantes en la depleción de la MEC del cartílago debido a la síntesis de enzimas proteolíticas como respuesta al daño (Caron, 2011). Al ocurrir esta degradación del cartílago, la capacidad de síntesis de PGs, por parte de los condrocitos, resulta insuficiente por lo que disminuye su concentración en la MEC progresivamente. La pérdida de PGs va acompañada de degradación del cartílago, lo que se manifiesta como fibrilación superficial. Esto provoca que el cartílago se fisure y no cumpla su función biomecánica, lo que conduce a que haya remodelaciones óseas y alteración de los tejidos blandos (Caron, 2011).

5.1.2.2. Sinovitis y capsulitis

La membrana sinovial juega un papel principal en el desarrollo de la OA ya que responde al daño a través de vías de señalización celular y de activación enzimática, siendo una fuente de mediadores inflamatorios. Los daños en la membrana sinovial producen la liberación de enzimas lisosomales, principalmente MMPs, PGE2, radicales libres y citoquinas (IL-1, principalmente). La activación de la cascada de inflamación producirá daños en el cartílago articular, estimulando la producción de citoquinas como IL-1 y TNF- α , las cuales, a su vez, como en un círculo vicioso, activarán la liberación de MMPs también por los propios sinoviocitos (Ross *et al.*, 2012).

5.1.2.3. Cambios en el hueso subcondral

Durante la evolución de la OA, el hueso subcondral puede sufrir marcados cambios en su composición y organización estructural que afectan negativamente al cartílago articular. Los cambios del hueso subcondral en la OA se producen en distintos patrones y pueden clasificarse según la localización anatómica y los mecanismos patogénicos. Dichos cambios incluyen el aumento del grosor de la placa cortical, así como alteraciones en la masa ósea trabecular subcondral y su arquitectura que dependen de la fase de progresión de la OA. Las alteraciones de la remodelación ósea afectan al estado de mineralización y modifican la capacidad de deformación del hueso ante las cargas a las que está sometido, lo que altera la susceptibilidad de sufrir daños estructurales. Además, pueden producirse

otros cambios como el desarrollo de quistes óseos y osteofitos en los márgenes de la articulación, junto con el aplanamiento y deformación del contorno articular subcondral (Goldring y Goldring, 2016).

5.1.2.4. Formación de osteofitos

La formación de osteofitos consiste en una proliferación de hueso endocondral, que es iniciada por la proliferación de células periósticas en los márgenes articulares, seguido de la infiltración y diferenciación de células adicionales que poseen las características morfológicas de condrocitos hipertróficos (Van der Kraan y Van den Berg, 2007). Su formación se interpreta como la forma de adaptación de la articulación a los estímulos biomecánicos alterados durante la OA (Hashimoto *et al.*, 2002) pudiendo limitar el movimiento y ser una fuente de dolor articular. No obstante, otros autores como Felson (2005) consideran que su formación tiene una función estabilizadora en la articulación, ya que se observó en modelos animales que la retirada de los osteofitos contribuía a una mayor inestabilidad articular.

Los osteofitos se encuentran con frecuencia en articulaciones afectadas por OA, por lo que se consideran un componente característico y consecuencia secundaria de esta patología. Sin embargo, este aspecto mantiene un debate abierto ya que, según Hashimoto *et al.* (2002) los osteofitos pueden aparecer en ausencia de cambios óseos o del cartílago por lo que su aparición no es exclusiva de la OA. Asimismo, y por el contrario, la OA no va siempre acompañada de osteofitos y estos pueden no apreciarse incluso en casos severos (McIlwraith, 2016). La forma de aparición de los osteofitos varía según la articulación afectada. En articulaciones poco móviles la proliferación ósea tiende a ser exagerada observándose incluso a simple vista, como son el esparaván en las articulaciones distales del tarso o la sobremano/pie en la articulación interfalangiana proximal. En las articulaciones con un mayor grado de movilidad los cambios pueden ser mínimos y ser difíciles de apreciar con radiología convencional (Prades y Carmona, 2009; McIlwraith, 2016).

5.1.2.5. Dolor articular

El dolor articular se manifiesta generalmente como una claudicación que es el resultado de la inflamación de la cápsula articular y membrana sinovial, exposición del hueso subcondral, neovascularización y neoinervación de los tejidos articulares y periarticulares (Prades y Carmona, 2009), y procesos proliferativos secundarios como la aparición de osteofitos (Hashimoto *et al.*, 2002). El cartílago articular no está inervado, por lo que mientras su rol en la patogénesis de OA es central, este no es directamente la fuente del dolor. Por el contrario, el hueso subcondral, periostio, membrana sinovial, ligamentos y cápsula articular están ricamente inervados y contienen terminaciones nerviosas que podrían ser la fuente del estímulo nociceptivo (Dieppe *et al.*, 2005). Los

nervios sensitivos son conocidos por responder a estímulos mecánicos como el estiramiento, pero también a mediadores químicos como neuropéptidos (sustancia P, neuroquinina A y neuropéptido Y) y citoquinas. Entre estas destacan la IL-1, IL-6 y TNF- α , todas ellas asociadas directamente con el dolor y producidas mayormente por los macrófagos sinoviales (Souza, 2016).

Entre las moléculas mencionadas, la sustancia P es el principal neuropéptido relacionado con la inflamación articular. Esta sustancia es capaz de intensificar el catabolismo articular y la inflamación sinovial, así como de inducir vasodilatación local de la membrana sinovial y extravasación de leucocitos y proteínas al líquido sinovial. Por tanto, como se ha visto en estudios realizados en otras especies, conseguir inhibir esta sustancia podría ser una buena diana terapéutica para tratar la osteoartritis (Prades y Carmona, 2009). Sin embargo, cabe considerar que el manejo del dolor puede resultar en una buena respuesta clínica a medio plazo, no obstante, a largo plazo puede resultar en un empeoramiento si no se modifica la actividad física y el plan de entrenamiento. Por tanto, es crítico conocer los mecanismos patogénicos del dolor para lograr una terapia lo más específica y eficaz posible (Van Weeren y de Grauw, 2010).

5.1.3. Papel del sistema inmune en la osteoartritis

Las investigaciones sobre los mecanismos inmunes implicados en la OA habitualmente incluyen la caracterización de las citoquinas inflamatorias, los infiltrados celulares y las respuestas tisulares locales de la membrana sinovial y el cartílago (Wu *et al.*, 2020). Mientras que la OA se diagnostica habitualmente mediante técnicas de imagen como la radiografía, en la mayoría de los casos cuando aparecen los cambios radiológicos los daños son ya irreversibles. No obstante, los procesos inflamatorios y los micro-daños tisulares son procesos que se producen de forma mucho más temprana. Por esta razón, conocer y entender mejor los factores que contribuyen a la instauración y progresión temprana de esta enfermedad es esencial para mejorar no solo su diagnóstico temprano sino también las opciones terapéuticas que permitan reducir o paliar su desarrollo (di Nicola *et al.*, 2020; Pauli *et al.*, 2011).

Aunque la comprensión de la patogenia de la OA sigue evolucionando, en la actualidad ya se conoce que las células del sistema inmune juegan un papel central en esta enfermedad. En concreto, las células del linaje mieloide juegan un papel fundamental regulando y perpetuando la inflamación de bajo grado que caracteriza a la OA. Histológicamente la inflamación sinovial se caracteriza por una hiperplasia de las células de la membrana sinovial acompañada por un infiltrado celular inflamatorio, en el que predominan los macrófagos y un pequeño número de linfocitos T y B, mastocitos y células NK (Sellam y Berenbaum, 2010; Steel, 2008).

Cuando comienza el proceso inflamatorio, ya sea su origen alteraciones en la membrana sinovial, el hueso subcondral o el cartílago, la cascada inflamatoria adquiere una importancia crucial para comprender los procesos que ocurren posteriormente y poder establecer terapias que interrumpan la progresión de los cambios bioquímicos que se producen. El proceso inflamatorio implica la liberación de metabolitos del ácido araquidónico y de la membrana celular, lo que conlleva la liberación de prostaglandinas, sobre todo del tipo PGE2 (Robinson *et al.*, 2016). A su vez, los sinoviocitos dañados liberan enzimas, tanto de sus lisosomas como no lisosomales, que promueven la degradación del ácido hialurónico en el líquido sinovial, resultando en una pérdida de viscosidad característica de la inflamación articular. Por otra parte, los subproductos derivados de este proceso actúan como quimioatrayentes para células inflamatorias como los neutrófilos y macrófagos. La actividad de estas células resultará además en la liberación de radicales libres derivados del oxígeno que contribuirán al proceso inflamatorio (Robinson *et al.*, 2016).

A consecuencia de lo anterior, a menudo el contenido en proteoglicanos del cartílago articular se va reduciendo a medida que se degrada el colágeno. Esto tiene como consecuencia un aumento en el contenido de agua del cartílago, volviéndose biomecánicamente más débil y pudiendo verse disminuido su grosor. Estos eventos pueden ir acompañados de necrosis de los condrocitos, lo que resultará en una menor capacidad de síntesis de MEC para intentar restaurar la estructura del cartílago dañado. Además de la membrana sinovial y el cartílago, tal y como se ha comentado anteriormente, el resto de estructuras articulares también pueden verse comprometidas y experimentar cambios patológicos. El hueso subcondral puede desarrollar esclerosis para compensar la pérdida de cartílago, y las regiones donde este se calcifica pueden sufrir la invasión de vasos sanguíneos que progresan hacia el sobrecrecimiento de cartílago y hueso subcondral en la periferia de las articulaciones, formándose los osteofitos mencionados anteriormente (Robinson *et al.*, 2016).

El tratamiento temprano de la OA tiene como objetivo frenar la sucesión de todos estos acontecimientos antes de que se instauren daños irreversibles, por lo que conseguir el diagnóstico temprano de esta enfermedad también determina el éxito de los tratamientos (Robinson *et al.*, 2016). Pese a que la respuesta inmune es un proceso muy complejo, conocer su papel en el desarrollo de la OA equina puede ayudar a determinar en qué puntos puede utilizarse para frenar este proceso, los cuales se conocen como dianas terapéuticas (Robinson *et al.*, 2016).

5.1.3.1. Papel del sistema inmune innato en la OA

Cuando se produce un daño en la articulación que puede desencadenar una OA postraumática, las células del sistema inmune innato van a reaccionar frente a este insulto, siendo principalmente los macrófagos residentes los encargados de mediar esta respuesta. La destrucción de la matriz del

cartílago por MMPs va a resultar en la producción inmediata IL-1 tipo β (IL-1 β) y TNF- α . Estas citoquinas, fuertemente pro-inflamatorias, son capaces de perpetuar la cascada de inflamación (Duan, 2016; Miller *et al.*, 2020).

La respuesta inmune innata se activa como respuesta a la interacción entre receptores reconocedores de patrones moleculares (PRR) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o a daños moleculares (DAMP). Estos receptores PRR se encuentran en células como neutrófilos, macrófagos, monocitos y células dendríticas, y son una familia de receptores endosomales, citosólicos y de superficie que incluyen receptores tipo TOLL y NOD (Wu *et al.* 2020). La activación de estos receptores en tejidos como la articulación lleva a la rápida instauración de una respuesta inflamatoria, seguida de la activación de respuestas por parte del sistema inmune adaptativo y, por último, de medidas de reparación en el caso de que haya tejidos dañados. Pese a que esta es una respuesta inicialmente fisiológica para promover la reparación del tejido, una activación prolongada o desequilibrada de estos receptores puede resultar destructiva y está implicada en la inflamación crónica observada en la OA (Cao Y Kaufman, 2012).

Existen al menos cuatro tipos de DAMPs asociados a la OA: productos de degradación de la MEC (como por ejemplo fibronectina, biglicano y ácido hialurónico de bajo peso molecular), proteínas plasmáticas que se extravasan en los lugares de inflamación (ej. microglobulinas α 1, α 2, fibrinógeno), alarminas intracelulares liberadas por células que sufren estrés, daño o necrosis (ej. HMGB1) y cristales microscópicos liberados del cartílago al espacio articular debido a desgaste o daño lesión del cartílago (por ejemplo, fosfato cálcico o ácido úrico) (Robinson *et al.*, 2016).

Uno de los principales tipos de receptores PRRs que se une a DAMPs son los receptores de tipo Toll (TLR). La activación de estos receptores lleva a la síntesis de factores de transcripción tales como los factores reguladores del interferón, el factor nuclear Kappa B (NF- κ B) y la proteína activadora tipo 1, cuya liberación puede activar macrófagos y células dendríticas además del inflamasoma y el sistema del complemento (Cao Y Kaufman, 2012). Esta cadena de sucesos puede desencadenar en sinovitis, degeneración del cartílago y una alta probabilidad de desarrollar OA.

Seguidamente se presenta con mayor detalle el papel de los principales componentes del sistema inmune innato que, al estar implicados en la OA equina, podrían constituir biomarcadores o dianas terapéuticas de interés (Cao Y Kaufman, 2012).

5.1.3.1.1. Macrófagos

Los macrófagos son células muy heterogéneas que tienen un papel central en la defensa inmune y se encuentran distribuidos en prácticamente todos los tejidos, desempeñando diferentes funciones

dependiendo del ambiente específico donde se encuentren. Además de sus funciones más familiares como proinflamatorias, antimicrobianas y antitumorales, también actúan como inmunomoduladores promoviendo acciones antiinflamatorias y de reparación (Chen *et al.*, 2020; Wilson *et al.*, 2020). Al tener un papel central en la OA, actuar sobre los macrófagos activados en etapas tempranas de la OA puede inhibir o ralentizar la progresión de este proceso, constituyendo una diana terapéutica de gran interés (Murray Y Wynn, 2011).

Los macrófagos tisulares, debido a su origen embrionario, tienen capacidad de auto-renovación durante toda la vida del individuo y, en el caso de los macrófagos sinoviales, son esenciales para mantener la homeostasis articular. La población de macrófagos residentes que se encuentran en la membrana sinovial se clasifica como sinoviocitos tipo A y constituyen hasta el 25% de las células sinoviales. Además de los macrófagos residentes, también pueden alcanzar la articulación los macrófagos inflamatorios, que son secretados desde la médula ósea al torrente sanguíneo y, una vez llegan a la articulación, se diferencian en macrófagos de vida corta (di Nicolla, 2020).

Los macrófagos se pueden polarizar hacia el fenotipo proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2) según el medio en el que se encuentren (Peter, 2017). La razón de que existan estos dos sistemas opuestos de macrófagos M1 y M2 es el mantenimiento del homeostasis bajo un correcto balance de los dos sistemas y, de esta manera, poder tener un ambiente inmunológico capaz de responder ante patógenos a la vez que previene la destrucción de los tejidos del hospedador. Estas consideraciones son muy importantes ya que los macrófagos son las células inmunes más abundantes de la membrana sinovial, por lo que una mejor comprensión de sus funciones puede ser útil para desarrollar tratamientos (Estrada *et al.*, 2021).

La polarización hacia uno u otro tipo fenotipo depende principalmente del ambiente del tejido en el que se encuentren. Por ejemplo, la presencia de varios DAMPS en el microambiente articular puede influir en el fenotipo de los macrófagos. Por lo tanto, se debe considerar cuidadosamente si el estado general en un tejido se describe como pro o antiinflamatorio (Menarim *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020). Los macrófagos de tipo M1 son responsables de la liberación de moléculas que desencadenan el proceso inflamatorio. Estos, a su vez, se activan por diferentes estímulos como son la secreción de IFN- α por parte de células T y NK y por varios agonistas de receptores TLR como pueden ser lipopolisacáridos bacterianos o factores de crecimiento estimuladores de granulocitos (Estrada *et al.*, 2021). Una vez activados, los macrófagos M1 (tipo CD80/86) secretan altos niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α y alarminas) las cuales inducen la respuesta inmune adaptativa de los linfocitos T auxiliares tipo 1 (Th1). Los macrófagos sinoviales, además, activan la producción de moléculas degradativas por parte de otras células del sistema inmune innato y

fibroblastos sinoviales. La actividad de estas enzimas, a su vez, libera productos que actúan como DAMPS por la degradación de la MEC (Chen *et al.*, 2020).

Los macrófagos de tipo M2, por otra parte, se consideran funcionalmente antiinflamatorios y capaces de modular la respuesta inmune para reducir la destrucción tisular. Los macrófagos M2 son estimulados por las IL-4 e IL-13, las cuales son secretadas principalmente por linfocitos T auxiliares tipo 2 (Th2), mastocitos y basófilos. En respuesta, los macrófagos M2 secretan citoquinas antiinflamatorias como son la IL-10, IL-1- α , factor de necrosis TGF- β y arginasa tipo 1. Bajo un estado de homeostasis la mayoría de macrófagos tienen función M2 para promover el correcto funcionamiento de los tejidos, proteger frente a los daños oxidativos de la inflamación y evitar el flujo de neutrófilos hacia la articulación, además contrarrestar la respuesta inflamatoria y los efectos catabólicos que se observan en la OA (Estrada *et al.*, 2021).

5.1.3.1.2. Sistema del complemento

El sistema del complemento es una de las primeras líneas de defensa en la inmunidad innata. Puede activarse mediante 3 vías diferentes, las cuales convergen en la activación de componentes efectores de la cascada del complemento (c3a y C5a) promoviendo la inflamación mediante la quimioatracción de leucocitos y formación del complejo de ataque de membrana (MAC), que puede o bien producir la lisis de las membranas celulares, o bien producir una señalización proinflamatoria (Robinson *et al.*, 2016), la cual es capaz de aumentar la capacidad fagocítica de neutrófilos y macrófagos (Woodel y Sommerfeld, 2019) y el incremento de la respuesta inflamatoria de fase aguda y la estimulación de linfocitos de tipo B y T (Lopes *et al.*, 2017).

El sistema del complemento se encuentra en forma de proteínas plasmáticas, por lo que es posible que alcance el líquido sinovial a través de la filtración de la sangre, sin embargo los sinoviocitos y condrocitos también tienen la capacidad de sintetizar las proteínas del sistema del complemento. De hecho, se ha demostrado que los complementos de la vía clásica y alternativa (C3 y C5) y los componentes de la MAC se encuentran expresados en grandes cantidades en la membrana sinovial y el líquido sinovial tanto en pacientes con OA como en modelos animales, por lo que cabría destacar el papel del sistema del complemento tanto en procesos fisiológicos como patológicos en la articulación (Woodel y Sommerfeld, 2019), y sería de interés el desarrollo de estrategias que inhiban el sistema del complemento como potencial terapéutico en la OA (Robinson *et al.*, 2016).

5.1.3.1.3. Mastocitos

Los mastocitos son células reguladoras esenciales en la modulación de procesos alérgicos e inflamatorios, principalmente conocidas por la liberación de poderosos mediadores inflamatorios

como la histamina, heparina y citoquinas. No obstante, también producen moléculas como la tripsina, capaces de degradar el cartílago articular (Wang *et al.*, 2019). De hecho, estudios realizados en medicina humana han mostrado un incremento de mastocitos en la membrana sinovial de pacientes con OA y otras alteraciones articulares, viéndose una correlación entre la severidad radiográfica y la presencia de estas células (Takata *et al.*, 2020).

La triptasa (α y β) es una de las proteasas más abundantes que liberan los mastocitos durante su degranulación, y es de gran interés ya que está involucrada en la producción de citoquinas inflamatorias durante procesos inflamatorios y alérgicos. Altos niveles de triptasa tipo β se han encontrado en el líquido sinovial de pacientes con OA y se ha demostrado que son capaces de elevar la producción de citoquinas inflamatorias, tales como la IL-1- β . IL-1 a su vez, produce la liberación de MMPs y mediadores del dolor (Takata *et al.*, 2020), como se ha mencionado anteriormente.

Por otra parte, el rol de los mastocitos sobre el metabolismo óseo es controvertido. Muchos de los mediadores inflamatorios producidos por los mastocitos pueden regular o inducir el metabolismo óseo, inhibiendo la actividad de los osteoblastos (IL-1, TNF) y promoviendo la osteoclastogénesis (histamina, TNF, IL-6). Sin embargo, los mastocitos también están involucrados en el mantenimiento del homeostasis ósea (Li, Huang y Bai, 2021). Varios estudios han demostrado el incremento en la expresión de genes implicados en la diferenciación de mastocitos en la membrana sinovial de pacientes con OA, y ratones en los que se inhibía la acción de la enzima triptasa produjeron una reducción de la concentración de mediadores inflamatorios, tales como interleucinas y metaloproteasas, ejerciendo así un papel protector sobre el cartílago. El tratamiento con antihistamínicos a su vez consiguió reducir la prevalencia de OA en este modelo, evidenciando así su potencial como diana terapéutica en la OA (Li, Huang y Bai, 2021).

5.1.3.2. Papel del sistema inmune adaptativo en la OA

El sistema inmune adaptativo incluye dos componentes principales: el celular (mayormente linfocitos T y B) y el humoral, que incluye a los anticuerpos, proteínas capaces de reconocer y unirse a antígenos específicos. Dentro del componente celular, las células T se pueden categorizar en células T auxiliares (Th), T citotóxicas (Tc), T reguladoras y T foliculares. A su vez los Th (CD4) se dividen principalmente en Th1, Th2, Th9 y Th17 (Li *et al.*, 2017). Cada uno de estos subgrupos Th secreta distintos tipos de citoquinas y estimulan la proliferación y diferenciación de células involucradas en la respuesta inmune. Por otra parte, las células Tc (CD8) son células efectoras que eliminan células diana (Mitchell, 2013). Mientras que el sistema inmune adaptativo parece estar diseñado para la identificación y eliminación específica de microbios de tipo extracelular e intracelular, su regulación a través de las células T auxiliares tiene también potencial para influenciar en la progresión de la OA.

5.1.3.2.1 Papel de Linfocitos T en la OA

El rol de los linfocitos T sobre la patogenia de la OA aún es incierto, no obstante, se conoce que en pacientes con OA se produce un incremento de linfocitos T en la membrana sinovial en comparación con individuos sanos. Estas células son las más numerosas en la membrana sinovial después de los macrófagos, suponiendo un 20-25% de las células inflamatorias, de entre las cuales las células T auxiliares son más numerosas en los agregados celulares en comparación con los linfocitos T citotóxicos (Lopes *et al.*, 2017).

5.1.3.2.1.1. Linfocitos T auxiliares

Los linfocitos Th nativos se diferencian hacia el subtipo Th1 bajo la estimulación de la IL-12, y una vez activados son capaces de producir mediadores inflamatorios tales como IL-2, interferón gamma (IFN- γ), TNF- α , linfoquinas y el factor estimulador de la colonia de macrófagos. El número de células Th1, así como IL-2 e IFN- γ y sus receptores, se encuentra incrementado en el líquido y la membrana sinovial de pacientes con OA. Estas moléculas son capaces de exacerbar los procesos catabólicos que degradan el cartílago y estructuras adyacentes (Li *et al.*, 2017), además de orientar a los macrófagos hacia un fenotipo M1 proinflamatorio (Peter, 2017). Por otra parte, los linfocitos Th2 se diferencian por acción de la IL-4 y producen interleucinas antiinflamatorias como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. No obstante, la implicación de estas células en la patogenia de la OA no está clara, ya que en diversos estudios no se pudo demostrar que la síntesis de estas interleucinas fuese producida por Th2, por lo que se cree que la producción de IL-10 podría estar sintetizada por otras células como las T reguladoras (Li *et al.*, 2017).

Las células Th9 producen IL-9 y están asociadas principalmente a la inmunopatología de las alergias y enfermedades autoinmunes, no obstante, también está involucrada en la patogenia de la artritis.

Altos niveles de esta citoquina han sido detectados tanto en el líquido sinovial como en sangre periférica de pacientes con OA. Además, algunos estudios han demostrado una correlación positiva entre el incremento de IL-9 y el nivel de proteína C reactiva, la cual es un indicador de inflamación sistémica que puede verse incrementada en pacientes con OA (Jin *et al.*, 2013). Estos estudios resaltan la implicación de Th9 en la patogenia de la OA y, junto con los linfocitos Th1, podrían actuar como biomarcadores de la enfermedad (Li *et al.*, 2017).

Otro subtipo de células T implicado en la OA son los linfocitos Th17, que pueden ser activado por la acción de moléculas tales como TGF β , IL6, IL1- β e IL-23, que sintetiza interleucinas del tipo IL-17, IL17F, IL-21, y IL-22. La función más conocida de estos linfocitos es la de conferir protección frente a infecciones bacterianas y estar implicados en procesos autoinmunes (Li *et al.*, 2017). No obstante, aunque su cuantificación en el líquido sinovial ha dado lugar a controversia, estudios recientes han

correlacionado el incremento de IL-17 con la severidad de la enfermedad, pudiendo incluirse esta molécula como un posible biomarcador para predecir la evolución de la OA (Zhu *et al.*, 2020).

5.1.3.2.1.2. Linfocitos T reguladores

Las células T reguladoras, son esenciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la prevención de procesos autoinmunes. Bajo la influencia de TGF- β las células T nativas se diferencian en células T reguladoras, las cuales producen IL-10 y TGF- β . Estas células son importantes inmunoreguladoras en procesos inflamatorios ya que regulan la secreción de citoquinas antiinflamatorias y sus receptores.

Se ha demostrado que tanto en la artritis reumatoide como en la OA existe un menor porcentaje de células T reguladoras en sangre periférica y en el fluido y membrana sinovial, lo que parece exacerbar el proceso inflamatorio que tiene lugar en ambos procesos y demuestra su implicación en la patogenia de la OA (Li *et al.*, 2017).

5.1.3.2.1.3. Linfocitos T foliculares

Las células T foliculares se encuentran en los folículos del tejido linfoide e inducen a los Linfocitos B a la producción de inmunoglobulinas, y la producción de un linaje de citoquinas específicas, tales como IFN-gamma, IL-4 y IL-17. Estas células producen un gran número de mediadores además de IL-21, la cual aparece incrementada en sangre periférica de pacientes con OA y demuestra que su expresión y la presencia de células Tfh están correlacionadas positivamente con la patogénesis y progresión de la OA (Li *et al.*, 2017).

5.1.3.2.1.4. Células T citotóxicas

La mayoría de células T presentes en el proceso de la OA, tanto en sangre como en el líquido y membrana sinovial son linfocitos Th mientras que la presencia de linfocitos citotóxicos es escasa. Sin embargo, pese a no ser los linfocitos predominantes, se considera que los Tc jugarían también un papel en la destrucción del cartílago articular (Li *et al.*, 2017).

5.1.3.2.1.5. células T de memoria

Aunque la mayoría de células T sufren apoptosis una vez activadas, una pequeña proporción de ellas persiste como célula T de memoria y se encargan de mediar la respuesta inmune cuando el organismo se expone de nuevo a un agente nocivo. En el caso de la OA, existen evidencias de que las células T de memoria podrían estar implicadas en su patogenia, debido a su acumulación en sangre periférica y el fluido sinovial de pacientes con OA (Zhu *et al.*, 2020).

5.1.3.2.2 Papel de los linfocitos B en la OA

Las células B pueden contribuir al desarrollo de esta enfermedad a través de la producción de autoanticuerpos, actuando como presentadoras de antígeno de las células T y las cuales son capaces de producir citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, lo que conduce a una amplificación de la respuesta inmune. No obstante, la proporción de células B en pacientes con OA, incluyendo células B nativas, células B de memoria y células B transicionales no se encontraban incrementadas respecto a pacientes sanos. Pese a ello, la expansión oligoclonal de las células B que se ha observado en la membrana sinovial sugiere que existen distintos tipos de respuesta de células B en las articulaciones con OA y algunas de estas pueden inducir, mantener o modificar el curso de la OA (Zhu et al., 2020). Por otra parte, el papel de los autoanticuerpos contra componentes del propio organismo puede influir en el desarrollo de la enfermedad, como sugieren estudios que probaban sus efectos citotóxicos sobre el cartílago (Haseeb y Haqui, 2013).

Como ya se ha mencionado, comprender la implicación del sistema inmune en la patogenia de la osteoartritis es importante para detectar células y mediadores que pueden servir tanto como biomarcadores en el diagnóstico de la OA, así como dianas terapéuticas a la hora de abordar el tratamiento y desarrollar nuevas terapias. A continuación, y una vez desarrollada la etiopatogenia de la OA, se abordará el diagnóstico y el tratamiento de la OA equina desde el punto de vista de la respuesta inmune.

5.2 Diagnóstico de la OA

El diagnóstico de la OA se realiza habitualmente mediante examen clínico y técnicas de diagnóstico por imagen (Jason, 1996) Sin embargo, ninguna de las pruebas más habituales puede extrapolarse al grado de deterioro que presenta el cartílago articular (Bertone *et al.*, 2014). Es por esto que el estudio de biomarcadores tanto en el líquido sinovial como sistémicos ha adquirido gran importancia en la detección temprana de la osteoartritis (McIlwraith *et al.*, 2018).

5.2.1 Biomarcadores

El término biomarcador se define como cualquier medición que puede ser detectada de forma objetiva y evaluada como un indicador de un proceso biológico fisiológico, patológico o una respuesta terapéutica a un fármaco (Acebes-Cachafeiro *et al.*, 2004). En el caso de la OA, el incremento de mediadores inflamatorios junto con la liberación de micromoléculas y sus fragmentos al líquido sinovial y al suero, pueden emplearse como reflejo del estado de los procesos anabólicos y catabólicos articulares. Los biomarcadores de la OA pueden clasificarse de distintas formas, siendo una de las más habituales en directos e indirectos, según su origen. Los biomarcadores directos se producen mayoritariamente en el cartílago hialino o el hueso subcondral, por lo que ofrecen información sobre

el metabolismo de estos tejidos. Los biomarcadores indirectos no son sintetizados por el cartílago, pero desempeñan un papel esencial para el control del metabolismo de los condrocitos, MEC o hueso subcondral, aportando datos sobre su metabolismo (Acebes-Cachafeiro et al., 2004).

La OA es una enfermedad que posee una fase prolongada y asintomática marcada por procesos moleculares y pre-radiográficos, cuyo diagnóstico temprano es uno de los retos actuales. Los biomarcadores pueden aportar una detección temprana de cambios bioquímicos y estructurales que nos permitan detectar alteraciones en las articulaciones previas a daños irreversibles, lo cual es esencial para el éxito de la terapia posterior. (McIlwraith et al., 2018). Además, el uso de biomarcadores puede permitir monitorizar el desarrollo de la OA, predecir la respuesta clínica a los tratamientos realizados e identificar individuos que posean mayor riesgo de progresión de la enfermedad (McIlwraith et al., 2018).

5.2.1.1 Biomarcadores directos de la OA

Cuando comienza a instaurarse la osteoartritis, la sobreexpresión de enzimas degradadoras de la matriz produce una degradación progresiva del colágeno y agreganos, junto con otros componentes de la matriz que van a ser liberados al líquido sinovial, la sangre y la orina, y pueden ser cuantificables como biomarcadores. Dentro de los biomarcadores directos, pueden diferenciarse entre los anabólicos y catabólicos, según reflejen la producción o destrucción de tejido, respectivamente. En el caso del cartílago, destacan como indicadores directos de procesos anabólicos el agregán y el colágeno tipo II, los cuales son sintetizados de forma fisiológica por los condrocitos durante el recambio tanto fisiológico como patológico de la MEC e incrementándose en caballos sanos y con OA cuando se someten a ejercicio, debido a la exposición a diferentes cargas mecánicas (Chávez et al 2010). Al contrario, para procesos catabólicos podrían cuantificarse los GAGs, queratán sulfato (como indicador de recambio de cartílago articular), fragmentos de colágeno tipo II, proteínas oligoméricas de la matriz del cartílago (COMP), teniendo esta última un papel importante en la organización de la MEC y fibrilogénesis del colágeno (Hernández-Gil et al., 2006).

También el metabolismo del hueso subcondral puede reflejarse por biomarcadores directos, siendo algunos de los anabólicos la fosfatasa alcalina (la cual puede ser un indicador de mineralización ósea (Hernández-Gil et al., 2006), la osteocalcina (producto de síntesis de los osteoblastos) y los péptidos del colágeno tipo I. Por otra parte, entre los biomarcadores utilizados como reflejo de procesos catabólicos destacaría la Piridinolina-Deoxipiridinolina (las cuales sirven para estabilizar el colágeno tipo I presente en tejido óseo), Telopéptidos del colágeno tipo I (que consisten en péptidos liberados durante la degradación ósea), y la sialoproteína ósea, la cual es producida por los

osteoclastos y es específica del tejido mineralizado, relacionándose con procesos de remodelación ósea (Herández-Gil *et al.*, 2006).

5.2.1.2. Biomarcadores indirectos de la OA

La inflamación es uno de los principales pilares en los que se basa la instauración, progresión y mantenimiento de la osteoartritis, por lo que la detección de las moléculas implicadas y sus productos de síntesis permiten definir biomarcadores indirectos del daño articular debido a la OA. Los factores inflamatorios que podrían servir como biomarcadores podrían clasificarse en factores celulares (macrófagos), moleculares (citoquinas y quimioquinas) y del sistema del complemento. Su detección además puede correlacionarse con la severidad radiográfica de la osteoartritis, siendo de gran utilidad como biomarcador (Kumavat *et al.*, 2021).

Los macrófagos son las células más importantes de los tejidos sinoviales, como ya se ha mencionado, ya que son capaces de secretar moléculas que podemos detectar como biomarcadores de procesos tanto catabólicos como de reparación dependiendo del fenotipo que esté presente (M1 o M2). Durante el proceso inflamatorio, predomina la acción de los macrófagos M1 y los productos de su síntesis como son las agreganasas, metaloproteasas (de las que destacan la MMP2 y MMP9 como biomarcadores en caballo (Chávez *et al.*, 2010), y citoquinas, entre las que destacan la IL-6, IL-1 y TNF- α . La producción de estos productos proinflamatorios depende de la vía de señalización a través de NF-kB, receptores tipo TLR y la activación de receptores reconocedores de patrones asociados a daño tisular. Por tanto, la selección de biomarcadores para detectar estos procesos proinflamatorios abarca desde las vías de señalización del proceso inflamatorio, la detección de marcadores de superficie que caracterizan el fenotipo de las células inflamatorias, y los productos que secretan estas (Kumavat *et al.*, 2021). El papel de la inmunidad adquirida en el desarrollo de la OA no está tan bien definido como el papel de la inmunidad innata, pero los avances en el estudio de estas moléculas dan pie al conocimiento de nuevos biomarcadores aún no muy explorados en la clínica equina como son la detección de linfocitos T, en especial los auxiliares, de entre los que destacarían la Th1, Th2, Th9, Th17 y sus respectivos productos de secreción (Li *et al.*, 2017).

5.3. Tratamiento de la osteoartritis

El abordaje terapéutico de la OA equina puede ser médico o quirúrgico, siendo el primero el más habitual y reservándose el segundo para casos más avanzados. Una forma de clasificar los fármacos utilizados para tratar la OA se basa en los efectos que estos ejercen, pudiendo clasificarse en dos grupos: los fármacos modificadores de síntomas (SMOADs) y los fármacos modificadores de la estructura (DMOADs). Los fármacos SMOADs son capaces de proporcionar una mejoría clínica, basándose principalmente en el alivio del dolor, pero no modifican el progreso de la enfermedad. En

este grupo de fármacos incluiríamos los analgésicos y antiinflamatorios, debido a su mecanismo de acción. Por su parte, los fármacos DMOADs tienen potencial para frenar y tratar de revertir la destrucción del cartílago, incluyendo en este grupo los fármacos condroprotectores (Barrachina *et al.*, 2017). El fármaco ideal debería expresar los dos potenciales, tanto aliviar el dolor como ralentizar o incluso revertir el progreso de la enfermedad. Para ello, la identificación de dianas terapéuticas es esencial, ya que permiten desarrollar terapias que las aborden de forma específica (McIlwraith *et al.*, 2012).

5.3.1. Dianas terapéuticas

Una diana terapéutica se puede definir como el lugar del organismo o el proceso fisiopatológico donde un fármaco ejerce su acción (Cirilo, Llombart, y Tamargo, 2003). En la tabla 1 se presenta la clasificación que propone Grässel (2020) en cuanto a dianas terapéuticas estudiadas para la OA humana, según el tejido al que se dirige y los procesos implicados. Esta clasificación se ha completado con la información sobre las dianas terapéuticas más relevantes que se han ido viendo en este trabajo en relación a la etiopatogenia de la OA y la implicación de la respuesta inmune. Por tanto, se presenta de manera conjunta la información recabada en la especie humana y equina, ya que en la actualidad la información es más limitada en la segunda pero la etiopatogenia de esta enfermedad es muy similar entre ambas especies.

Objetivos	Dianas terapéuticas
Dianas terapéuticas dirigidas al cartílago	<ul style="list-style-type: none"> → Inhibición de la degradación de la matriz del cartílago: (MMP, Agrecanasas) → Regeneración de la matriz del cartílago: aumento del colágeno tipo I y II.
Dianas terapéuticas dirigidos al hueso subcondral	<ul style="list-style-type: none"> → Reducción del recambio óseo (catepsina K, RANKL, HPT) → Inhibición de la degradación ósea (TGF, catepsina K, vitamina D)
Dianas terapéuticas dirigidos a los procesos inflamatorios	<ul style="list-style-type: none"> → IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL- 12 → TNF-α y TNF-γ → GM-CSF → Receptor tipo Toll (TLR) → NF-kB → Cascada del complemento. → ROS → Estimulación del Factor Nrf2 → Inhibición de la enzima ciclooxigenasa → Inhibición de la fosfolipasa A2

Tabla 1. **Dianas terapéuticas en la OA.** En esta tabla se enumeran las principales dianas terapéuticas ordenadas por tipo de tejido y proceso que influye. Modificación de la tabla de Grassel (2020). Mediante información de (Strbo et al., 2014; Chen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2017).

Si buscamos posibles dianas terapéuticas dirigidas al cartílago, podemos establecer dos objetivos: o bien inhibir los procesos que están degradando la matriz del cartílago, como la acción catabólica que ejercen las MMP y las agreganasas, o bien buscar moléculas que favorezcan la formación de los componentes del cartílago articular, entre los que destacan el colágeno tipo I y II, los proteoglicanos y los condrocitos. La remodelación del hueso subcondral también es un proceso sobre el que se puede intervenir, por tanto, estos procesos constituyen dianas terapéuticas de interés y existen tratamientos enfocados a prevenir o retardarlos mediante la reducción del recambio óseo, inhibición de la actividad y proliferación de los osteoclastos y sus proteasas, reducción de la degeneración del hueso y fomento de su fortalecimiento.

Por otra parte, como se ha desarrollado a lo largo de este TFG, en la actualidad se acepta que la OA tiene un componente inflamatorio muy importante, por lo que los mediadores y vías de señalización implicadas constituyen también dianas terapéuticas relevantes. Entre las acciones que se podrían ejercer sobre estas dianas, podemos destacar la inhibición de IL-1, IL-6, TNF- α y el factor estimulante de los granulocitos (Grassel, 2020) debido a su papel en la degeneración de la MEC y el dolor. Estas moléculas son sintetizadas principalmente por macrófagos M1, los cuales tienen un rol central en los procesos inflamatorios innatos y en la activación del sistema inmune adaptativo (Th1 principalmente) que desencadena el círculo vicioso de procesos degradativos (Chen *et al.*, 2020). No obstante, la inflamación de bajo grado y no sistémica observada en la OA, podría explicar el éxito limitado del bloqueo de citoquinas aisladas, siendo posiblemente necesario un enfoque multimodal para mejorar el éxito de estas terapias (Grassel, 2020).

Por esta razón, las estrategias recientes pretenden interferir con otros iniciadores de la cascada de señalización proinflamatoria, entre los que destacan la inhibición de receptores TLR (Grassel, 2020) activados por la unión a DAMPS procedentes de la degradación del cartílago y metabolismo del hueso subcondral (Strbo *et al.*, 2014), y de factores de transcripción como NF- κ B, implicados en la secreción de moléculas pro-inflamatorias que desencadenan la activación del resto de células del sistema inmune innato y adaptativo (Grassel, 2020). La cascada del sistema del complemento también se podría incluir como objetivo terapéutico (Grassel, 2020) debido a las altas concentraciones detectadas en el líquido sinovial de pacientes con OA y su implicación en procesos inflamatorios (Lopes *et al.*, 2017). Por otra parte, las vías de señalización reducción-oxidación conducen al incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), que contribuyen a la disfunción celular y daño tisular. De esta forma, el descubrimiento del factor de transcripción Nrf, clave para regular la expresión de enzimas

antioxidantes, podría ser un factor esencial para proteger a las células del estrés oxidativo y daño tisular (Li *et al.*, 2017).

Finalmente, el papel del sistema inmune adaptativo en la etiopatogenia de la OA no está tan establecido como la implicación de la respuesta inmune innata y del proceso inflamatorio, pero cabe destacar como posibles dianas terapéuticas, la importancia de células como LTh y sus productos de secreción, principalmente la IL-2 y IFN- γ (Li *et al.*, 2017).

5.3.2. Terapias convencionales

5.3.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

El mecanismo de acción de los AINEs consiste en inhibir el sistema enzimático que convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos. Todas las células, incluidas los condrocitos y los sinoviocitos, poseen ácido araquidónico como componente fosfolipídico de su membrana, por lo que inhibiendo la ciclooxigenasa (COX) responsable de la oxidación del ácido araquidónico y su consiguiente transformación en prostaglandinas se conseguiría evitar los efectos deletéreos de estas sustancias (Goodrich y Nixon, 2006).

Cada vez se tiende a buscar una inhibición más específica de esta enzima hacia la isoforma de la COX tipo 2, ya que su isoforma COX 1 posee funciones esenciales sobre el resto de células, como es mantener las funciones gástricas y renales, la homeostasis vascular y coordinar la acción de las hormonas circulantes. Los AINES más utilizados en caballos son la fenilbutazona vía oral, la cual inhibe la inflamación periférica y espinal y la síntesis de prostaglandinas tipo E2 por parte de los condrocitos. El Flunixin meglumine también es un AINE muy utilizado para tratar condiciones musculoesqueléticas, no obstante, la vía de administración y el coste hace que en la OA equina se utilice más fenilbutazona debido a la cronicidad de la enfermedad. Otras opciones terapéuticas son el ketoprofeno, carprofeno y naproxeno. Entre ellas hay que destacar la capacidad del carprofeno sobre otros AINEs de beneficiar el metabolismo de síntesis de proteoglicanos, por lo que podría ser el AINE de elección para procesos articulares (Goodrich y Nixon, 2006).

5.3.2.2. Corticoesteroides

El uso de glucocorticoides (GC) en la clínica equina está ampliamente distribuido por sus efectos beneficiosos, no obstante, existen controversias debido a los efectos negativos relacionados con el tipo de corticoide utilizado, la dosis, la concentración y variables dependientes del tipo del tejido que se expone. Los GC se unen a receptores específicos (GCR) que modulan la expresión de genes diana para aumentar la producción de proteínas que inhiben el factor nuclear NF- κ B, conocido por su implicación en el aumento de citoquinas pro-inflamatorias, y reduciendo drásticamente de esta manera el proceso inflamatorio. Estos receptores GCR se encuentran en la membrana de muchas

células inflamatorias, pero son los neutrófilos los que se ven más afectados por los GC, reduciendo su capacidad fagocítica y de migración (Goodrich y Nixon, 2006). Por otra parte, la capacidad de inhibir la producción de prostaglandinas es una de las funciones más reconocidas de los GC sobre el proceso inflamatorio, gracias a la inhibición de la enzima fosfolipasa A2 mediante la producción de proteínas conocidas como lipocortinas, inhibiendo de esta forma la liberación del ácido araquidónico de las membranas celulares (Goodrich y Nixon, 2006). Sin embargo, los posibles efectos deletéreos que se han descrito en los glucocorticoides a altas dosis en el cartílago incluyen la reducción del tamaño y necrosis de los condrocitos y la inhibición de la síntesis de glicosaminoglicanos y proteoglicanos (Goodrich y Nixon, 2006).

Entre los tipos de GC disponibles para su uso en clínica equina se encuentra la metilprednisona, cuyos efectos beneficiosos son la inhibición de IL-1 β , metaloproteasas de tipo 13 y otros causantes de la degradación del cartílago, mientras que los efectos nocivos en función de la dosis administrada serían la necrosis de los condrocitos, la inhibición de la síntesis de proteoglicanos, proteínas, y procolágeno (Goodrich y Nixon, 2006). La betametasona, por su parte, se considera un GC de acción intermedia-larga. Por último, la triamcinolona se considera en muchas ocasiones como el corticoide de elección para la OA equina, debido a su capacidad de inhibición de la mayoría de moléculas inflamatorias sin producir efectos negativos sobre la expresión de genes que regulan la síntesis de productos de la matriz extracelular (Goodrich y Nixon, 2006).

5.3.2.3. Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (HA) posee importantes funciones en el mantenimiento de la homeostasis articular, por lo que la administración de HA con fines terapéuticos se utiliza en la clínica equina. Inicialmente, la administración de HA tenía como objetivo promover la recuperación de la capacidad viscoelástica, hidratación y lubricación de los tejidos blandos de la articulación. Posteriores estudios *in vitro* han demostrado que el ácido hialurónico exógeno inhibe la quimiotaxis de los macrófagos y reduce la capacidad de los linfocitos de proliferar y migrar, y también puede reducir la síntesis y liberación de prostaglandinas durante la fagocitosis de los macrófagos y eliminar radicales libres de oxígeno, por lo que el HA tendría también efectos anti-inflamatorios a distintos niveles. (Goodrich y Nixon, 2006). Pese a su uso tan extendido, una revisión sistemática de la literatura disponible llevada a cabo por da silva *et al.* (2020) concluyó que las infiltraciones de HA son capaces de reducir el grado de cojera en caballos a corto plazo, pero parece ser que no es efectivo a largo plazo.

5.3.3. Terapias biológicas

Los tratamientos convencionales descritos anteriormente se enfocan principalmente en controlar los síntomas de la OA tales como el dolor, que se traduce en cojera y pérdida de rendimiento deportivo y

bienestar del animal. Sin embargo, aunque el uso de tratamientos convencionales puede ser una buena opción para inhibir o modular la inflamación, estos compuestos no puede detener la progresión de la OA ni regenerar el tejido que se ha perdido, por lo que continúa la búsqueda de terapias capaces de mejorar tanto los síntomas como los cambios estructurales ligados a la OA (Fernández-Pernas *et al.*, 2020).

La sustitución del cartílago dañado por tejido hialino en vez de fibrocartílago, de inferiores propiedades biomecánicas, es la meta a la que se aspira para preservar la funcionalidad de la articulación. Esta premisa ha propiciado que en los últimos años se está haciendo hincapié en la búsqueda de terapias regenerativas. Sin embargo, aunque se han conseguido importantes avances, a día de hoy no existe ningún tratamiento que consiga frenar la progresión de la OA, y aún menos revertirla. De hecho, actualmente las terapias biológicas no persiguen tanto la regeneración real del cartílago sino la modulación del ambiente catabólico e inflamatorio en la articulación, y promover la reparación de los tejidos empleando los propios mecanismos del organismo (Fernández-Pernas *et al.*, 2020).

5.3.3.1. células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células con una morfología similar a los fibroblastos que tiene la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse *in vitro* a hueso, cartílago y grasa (Krampera *et al.*, 2007). Aunque esta capacidad de diferenciación es lo que inicialmente hizo atractivas a las MSCs, por potencialmente poder sustituir un tejido dañado, actualmente se considera que su mecanismo de acción se debe principalmente a sus propiedades antiinflamatorias, pro angiogénicas e inmunomoduladoras sobre el tejido alterado (Asari *et al.*, 2009).

El lugar habitual de obtención de MSC suele ser médula ósea, no obstante, también pueden aislarse del tejido adiposo, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, membrana sinovial y líquido sinovial, entre otros (Zayed *et al.*, 2018). Dichas fuentes de obtención pueden ser tanto autólogas como alogénicas ya que ambos tipos de MSCs poseen unas capacidades inmunomoduladoras similares, no obstante, debería tenerse en cuenta la posible inmunogenicidad que pueden producir las células alogénicas (Ribitsch *et al.*, 2021).

Generalmente las MSCs pueden modificar la respuesta inflamatoria bien por un contacto directo con las células inmunes, o bien a través de la liberación de sustancias biológicamente activas como son quimioquinas y citoquinas con acción antiinflamatoria como son IL-6, IL-10 y TGF- β . Dicha acción paracrina puede influenciar la capacidad de reparación del cartílago, especialmente mediante la liberación de las proteínas de la superfamilia TGF (De Mónaco *et al.*, 2018), la estimulación de células endógenas, y promoviendo la deposición de colágeno tipo II y glicosaminoglicanos (Fernández- pernas

et al., 2020). Por otra parte, las MSCs son capaces de suprimir las principales células inmunes involucradas en la patogenia de la OA. Entre otras acciones, las MSCs inhiben la activación de los macrófagos M1, productores de las principales citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1) y promueven su conversión hacia fenotipos M2 los cuales atenúan la inflamación articular a través de sus productos de secreción (principalmente IL-10) (Harrell *et al.*, 2019). Es interesante destacar que las MSCs activan su secreción de estas moléculas reguladoras en presencia de TNF- α y otras citoquinas proinflamatorias, que precisamente son secretadas por los macrófagos M1 presentes en la articulación, siendo capaces de reducir la señalización vía NF-kB /TLR2 y aliviando así la secreción de mediadores inflamatorios (óxido nítrico, TNF- α e IL-1). Además, las MSCs son capaces de atenuar la proliferación y citotoxicidad de las células NK (Harrell *et al.*, 2019).

A nivel del sistema inmune adaptativo, las MSCs son capaces de prevenir la activación de células B, las cuales producen auto-anticuerpos que dañan el cartílago articular. Respecto a los linfocitos T, suprimen la activación de Th1 proinflamatorios (a través de la inhibición de IFN- γ) y promueven la formación de linfocitos T reguladores, los cuales poseen una importante función antiinflamatoria. A su vez, las MSCs pueden interactuar con los ligandos de los linfocitos T previamente activados, inhibiendo así su proliferación (Harrell *et al.*, 2019). Por último, destacar también la inhibición de la IL1 gracias a la producción de IL-1Ra por parte de las MSCs, teniendo este mediador un papel antiinflamatorio importante al prevenir la apoptosis de los condrocitos y la liberación de enzimas degradadoras de la matriz que son desencadenadas por IL-1 (Harrell *et al.*, 2019)

5.3.3.2. Productos autólogos derivados de la sangre.

5.3.3.2.1 Suero autólogo condicionado

El suero autólogo condicionado (ACS) es un hemoderivado concentrado de proteínas endógenas producido tras la incubación de las células blancas sanguíneas (Linardi *et al.*, 2019), que secretan la proteína antagonista del receptor de la IL-1 (IRAP) junto con otros productos antiinflamatorios (Evans, Chevalier y Wehling, 2016). El ACS inyectado a nivel intraarticular es ampliamente empleado en la clínica equina para el tratamiento de la OA. Estudios experimentales en caballos con OA inducida han demostrado que reduce el grado de cojera y los cambios patológicos a nivel de la hiperplasia sinovial frente al uso de un placebo (Frisbie *et al.*, 2007).

5.3.3.2.2. Solución proteica autóloga

La solución proteica autóloga (APS) es un concentrado a base de citoquinas antiinflamatorias. La sangre extraída se mezcla con el anticoagulante citrato y se centrifuga durante 15 minutos. Se extrae plasma y posteriormente se estimula con el objetivo de que las células blancas sanguíneas

incrementen la producción de proteínas antiinflamatorias. De esta forma se consigue una elevada concentración de las mismas en un volumen de plasma inferior (Camargo, Garbin y Morris, 2021)

En la práctica veterinaria equina el empleo de la APS se centra en su inyección intraarticular para reducir el progreso de la OA (Textor, 2011). Según un estudio realizado por (Bertone *et al.*, 2014) una única inyección intraarticular de APS en caballos con OA mejoró el grado de cojera, el dolor, la marcha y el rango de movimiento a los 14 días después del tratamiento. Además, redujo la concentración proteica del fluido articular, que se encuentra aumentada durante la inflamación.

5.3.3.2.3. Plasma rico en plaquetas

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un concentrado del plasma sanguíneo para lograr una concentración plaquetaria superior a la de la sangre periférica. Están descritos varios métodos para su producción, como la doble centrifugación o el uso de kits específicos (Textor, 2011) En general, la obtención de PRP es un procedimiento simple, de bajo coste, mínimamente invasivo y ampliamente estudiado por su habilidad para ayudar en la regeneración tisular (Torricelli *et al.*, 2011). Su eficacia radica en la degranulación de las plaquetas puesto que sus gránulos α contienen factores de crecimiento que ayudan a modular la respuesta inflamatoria ante una lesión. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- β , el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) son algunos de los principales factores liberados (Linardi *et al.*, 2019).

Por tanto, su potencial terapéutico dependería del número de plaquetas y de su contenido en factores de crecimiento (Textor, 2011). Diferentes estudios revelan que una mayor concentración plaquetaria está relacionada con una mejor respuesta y una más rápida recuperación (McLellan y Plevin, 2011; Torricelli *et al.*, 2011). Sin embargo, otros estudios sugieren que estos factores liberados por las plaquetas podrían aumentar la proliferación de osteoclastos y células endoteliales (Fréchette, Martineau y Gagnon, 2005; Bertrand-Duchesne *et al.*, 2010). Además, se considera que las características individuales del paciente relativas a su edad, a su estado de salud, y sobre todo la presencia de trastornos hematológicos, influirían en el potencial terapéutico del producto (Middleton *et al.*, 2012). Su aplicación en la clínica equina está muy extendida en el tratamiento de lesiones ligamentosas y tendinosas (Textor, 2011), pero menos en articulaciones, donde se prefieren otros derivados de la sangre que tengan un perfil más antiinflamatorio, como los mencionados anteriormente.

5.3.3.3. Concentrado de aspirado de médula ósea

El aspirado de médula ósea concentrado (BMAC) se obtiene gracias a la centrifugación de aspirado de médula ósea, y puede ser administrado de forma inmediata al paciente, o bien someterse a un proceso de expansión en cultivo para obtener un mayor número de células, entrando este abordaje en la categoría de terapia celular. De hecho, el BMAC es una fuente de MSCs y factores de crecimiento además de numerosas moléculas bioactivas y diferentes tipos celulares, como pueden ser linfocitos, monocitos y plaquetas (Cassano *et al.*, 2018).

Las MSCs, como se vio en el apartado anterior, son capaces de estimular la condrogénesis, inhibir la inflamación y promover la reparación del cartílago. Los factores de crecimiento, por su parte, son capaces de promover los procesos de reparación gracias a la disminución de la apoptosis celular, la proliferación y diferenciación de células (TGF- β , factor estimulador de granulocitos) y la estimulación de procesos angiogénicos (factor de crecimiento vascular) vía autocrina y paracrina (Kim *et al.*, 2020). Entre los factores de crecimiento destacan el TGF- β , importante por su capacidad inmunomoduladora, y el PDGF), que tiene un papel específico en la regeneración del cartílago y mantenimiento de la homeostasis ya que es capaz de estimular la proliferación de las MSCs e inhibir los procesos inflamatorios asociados a la IL-1 β (Kim *et al.*, 2020).

5.3.3.4. Terapia génica

La terapia génica consiste en transferir, modificar, activar o silenciar genes con un fin terapéutico. Mientras que esta terapia se estudia ampliamente para el tratamiento de enfermedades genéticas, también podría utilizarse para inducir la expresión y producción de proteínas que tengan un efecto beneficioso en la regulación de una patología. En el caso de la OA, la transferencia de ciertos genes a las células de la articulación podría mejorar la reparación tisular mediante el incremento de proteínas anabólicas y la disminución o inhibición de mediadores inflamatorios. (Frisbie *et al.*, 2002). Este abordaje resulta especialmente atractivo para la OA debido a la dificultad de los tratamientos convencionales para vehicular directamente los agentes terapéuticos en la articulación cuando no son administrados vía intraarticular, además de que los agentes utilizados poseen una vida media muy corta incluso si se inyectan de forma local, requiriendo repetir este procedimiento múltiples veces para conseguir un efecto prolongado. Además, otra limitación que podría solventar la terapia génica es la de llevar a la articulación ciertos compuestos con gran potencial pero que no pueden administrarse de forma intraarticular (Frisbie *et al.*, 2002). La terapia génica es capaz de aportar un enfoque totalmente distinto para el tratamiento de la OA, ya que nos permite transferir los genes que seleccionemos, en función de las dianas terapéuticas estudiadas, directamente a los condrocitos articulares, y de esta manera poder modificar la estructura y funciones del cartílago afectado de una forma muy específica (Ashraf *et al.*, 2019). De esta forma, mediante terapia génica podría inducirse la

síntesis de proteínas tanto anabólicas como anti-catabólicas, con el objetivo de la síntesis de colágeno y de otros componentes de la MEC, y de bloquear los efectos negativos de las moléculas inflamatorias, respectivamente (Frisbie *et al.*, 2002).

Sin embargo, el desarrollo de terapias génicas es muy complejo y costoso. Entre los principales retos de la terapia génica se incluyen la necesidad de dar con la secuencia génica adecuada para lograr el efecto deseado, encontrar un vector apropiado (viral o no viral) para vehicular dicho material genético, y optimizar la metodología para el procedimiento resulte efectivo y seguro a partes iguales (Delplace *et al.*, 2021). En cuanto a la elección del vector viral ideal podemos destacar los vectores retrovirales y adenovirales, presentando ambos ventajas e inconvenientes (Frisbie, Billingham y McIlwraith, 2001). En la actualidad, se encuentra en estudio el uso de distintos vectores no virales que tendrían la ventaja de ser menos inmunogénicos y más sencillos de producir en grandes cantidades. Sin embargo, su efectividad *in vivo* parece ser menor que con el uso de vectores virales (Delplace *et al.*, 2021).

En cuanto a la selección de las secuencias génicas a transducir en las células de la articulación, se ha propuesto el uso de distintas dianas terapéuticas y pueden destacarse el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), TGF- β (por sus efectos regenerativos en el cartílago), las proteínas morfogenéticas de tipo 2 y 7 y factores de crecimiento fibroblástico. Por otra parte, la vehiculización de una potente proteína anticatabólica como es la interleucina antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra) en un vector viral ha demostrado grandes resultados en estudios realizados en caballos y humanos, gracias a su potencial antiinflamatorio e inmunomodulador (Kay *et al.*, 2009; McIlwraith *et al.*, 2016). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, este tipo de terapia se encuentra todavía en fases muy preliminares.

5.3.3.5. Terapias para el hueso subcondral

Como se ha explicado con anterioridad, la remodelación del hueso subcondral se mantiene gracias al equilibrio entre la actividad osteoblástica y osteoclástica. El equilibrio entre la actividad de estos dos tipos celulares mantiene la composición mineral de calcio y fósforo del hueso, pero puede verse alterado durante la OA. El proceso de remodelación ósea se compone de varias fases, conocidas como activación, resorción, reversión y formación. Durante este proceso, varios componentes del hueso sufren diversas remodelaciones, afectando a células específicas como osteoblastos, osteoclastos y osteocitos, y también a sustancias como proteoglicanos, colágeno tipo I y otras proteínas no colágenas. La remodelación anormal del hueso subcondral, la angiogénesis y la neoinervación parecen contribuir de distintas maneras a la destrucción del cartílago y al dolor, lo que crea una oportunidad terapéutica dirigida a la remodelación ósea con agentes como los bifosfonatos, la calcitonina o

mediante inhibidores del TGF- β , al poder estimular esta molécula la producción de osteofitos mediante una síntesis anormal de matriz ósea (kawacak *et al.*, 2010). Otras opciones serían a la osteoprotegerina, que estimula la osteoclastogénesis y la activación de osteoclastos inmaduros, y el uso de anticuerpos dirigidos contra el factor de crecimiento endotelial (VEGF), que bloquearían las acciones de este mediador implicadas en la diferenciación de las poblaciones osteoprogenitoras para ejercer un efecto pro-osteogénico (Bravo *et al.*, 2017). También se incluirían en esta categoría los inhibidores del angiogénesis, inhibidores de la enzima mTOR implicada en la degeneración del cartílago (Pal *et al.*, 2015), o inhibición del factor de crecimiento nervioso (NGF), uno de los causantes de dolor óseo, mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra el mismo (Montiel-Ruiz *et al.*, 2013) o incluso utilizando sistemas de edición génica (como CRISPR/Cas9) para la ablación local del gen que codifica este factor. Además, la anti-catepsina K regularía la expresión de genes que permiten la maduración de los osteoclastos (Muñoz-Torres y García, 2006), y agentes formadores de hueso como la hormona paratiroidea(PTH)(Estrada *et al.*, 2021) podrían ser beneficiosos ya que sus niveles se han visto reducidos en los pacientes con OA al disminuir los receptores para esta hormona (Kawan, 2010).

5.3.4. Tratamiento quirúrgico

Las opciones quirúrgicas para la OA constan de tres posibles enfoques según Hunziker *et al.* (2015): abordajes paliativos a través de lavados y desbridamientos regenerativos enfocados a estimular la regeneración endógena, y regenerativos mediante el uso de trasplantes de tejido. Aunque se mencionan como técnicas por separado, existen nuevos abordajes que combinan estas técnicas e incluyen terapias biológicas como la administración conjunta de factores de crecimiento y células madre. De entre estos tres enfoques, aquel dirigido a estimular la regeneración endógena es el que más relación guarda con la temática de este TFG por lo que será el único que se desarrolle a continuación.

En los tratamientos que estimulan el crecimiento endógeno, uno de los abordajes más habituales es establecer una comunicación directa entre las lesiones articulares y la médula ósea del hueso subyacente, ya que esta contiene células madre y factores de crecimiento que se conocen por ser beneficiosos para la reparación del cartílago. Los factores de crecimiento que se consideran de utilidad ya se han mencionado en apartados anteriores e incluirían el IGF-1, TGF- β y proteínas morfogenéticas del hueso tipo 2 y 7. Estos mediadores son sintetizados por células mesenquimales, osteoprogenitoras, condrocitos y plaquetas de forma natural durante reparación y remodelación ósea (Sierra-García *et al.*, 2016). Las técnicas para acceder a la médula ósea son diversas, entre las que destaca la micro-fractura subcondral. Esta es la técnica de elección para tratar defectos del espesor del cartílago que no comprometen al hueso subcondral haciendo pequeñas perforaciones en el mismo para facilitar el flujo de las células madre y factores de crecimiento que se originan debajo de la placa

ósea subcondral. La ventaja de la micro fractura subcondral frente al trasplante de tejidos es que solo precisa de una operación y es menos compleja técnicamente, por lo que se utiliza de forma más rutinaria. Sin embargo, los resultados de esta técnica son variables, como ha podido observarse tanto en estudios realizados en humana como en equinos, ya que en algunos casos puede resultar beneficiosa, pero en otros no ha habido diferencias reseñables o sólo se han encontrado a corto plazo e, incluso, en algunas circunstancias esta técnica ha derivado en la formación de osteofitos (McIlwraith *et al.*, 2016).

6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

En base a la información analizada en este Trabajo fin de grado, podemos concluir que:

-Es necesario dejar de pensar en el sistema inmune solo como el encargado de la defensa frente a agentes infecciosos, y comenzar a comprender su implicación en la mayoría de procesos del organismo. Cuanto mejor se comprenda la etiopatogenia de una enfermedad como la OA, mejores herramientas podrán desarrollarse para su diagnóstico y tratamiento. / *It is necessary to move from considering the immune system as only participating in the defence against infectious agents, and start to understanding its involvement in most of the body's processes. The better we understand the etiopathogenesis of a disease such as the OA, the better tools can be developed for its diagnosis and treatment.*

- El diagnóstico de la OA necesita herramientas que permitan, no solo una detección más temprana, sino también que faciliten monitorizar la progresión de la patología y su respuesta al tratamiento. / *The diagnosis of OA needs tools that allow both earlier detection as well as also improving the monitoring of the pathology progression and its response to treatment.*

-La OA es una enfermedad muy heterogénea ya que son muchas las vías y factores de riesgo implicados en su inicio y progresión. Por esta razón, las terapias dirigidas a un único tejido o proceso parecen no surtir el efecto deseado y sería necesario un abordaje multimodal y personalizado. / *Osteoarthritis is a very heterogeneous disease as there are many pathways and risk factors involved in its onset and progression. For this reason, therapies directed at a single tissue or process do not seem to have the desired effect and a multimodal and personalized approach would be necessary.*

-Relacionar la fisiopatología de la enfermedad con las dianas terapéuticas es un reto que pretende mejorar la estratificación de los pacientes según sus fenotipos y conseguir terapias individualizadas según los procesos que tienen lugar. / *Relating the pathophysiology of the disease to therapeutic targets is a challenge that aims to improve the stratification of patients according to their phenotypes, and to achieve individualized therapies according to the processes taking place.*

7. VALORACIÓN PERSONAL

Realizar este TFG me ha permitido entender la importancia que tiene conocer los procesos fisiopatológicos de una enfermedad tan compleja como es la OA. Y valorar que para conseguir avanzar y aportar nuevos tratamientos y enfoques, primero hay que partir de la base de lo que sucede en cada proceso, sin dar por sentados conocimientos previos.

También me ha enseñado a realizar revisiones bibliográficas científicas y desarrollar un análisis crítico para valorar la información aportada. Agradecer a mis tutoras Laura Barrachina y Arantza Vitoria por la ayuda y el tiempo que le han dedicado a este TFG.

Agradecer también a mi familia, amigas y compañeras de piso por motivarme siempre y regalarme los mejores años de carrera.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Acebes-Cachafeiro, J. C., Calvo-Crespo, E., Guerrero-López, R., & Herrero-Beaumont, G. (2004). "Biomarcadores en la artrosis: utilidad de la proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa (COMP) y de los glucosaminoglicanos sulfatados (sGAG) en la valoración del cartílago articular". *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 48(5), pp. 398-403. DOI: 10.1016/S1888-4415(04)76243-8
2. Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C. P., Kuroda, Y., Kandeel, F., & Mullen, Y. (2009). "Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation". *Experimental hematology*, 37(5), pp. 604-615. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.01.005
3. Ashraf, S., Kim, B. J., Park, S., Park, H., & Lee, S. H. (2019). "RHEB gene therapy maintains the chondrogenic characteristics and protects cartilage tissue from degenerative damage during experimental murine osteoarthritis". *Osteoarthritis and cartilage*, 27(10), 1508-1517. DOI:10.1016/j.joca.2019.05.024
1. Barrachina, L., Remacha, A. R., Romero, A., Vázquez, F. J., Albareda, J., Prades, M., ... & Rodellar, C. (2017). "Priming equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells with proinflammatory cytokines: implications in immunomodulation-immunogenicity balance, cell viability, and differentiation potential". *Stem Cells and Development*, 26(1), pp. 15-24. DOI: 10.1089/scd.2016.0209
2. Bertrand-Duchesne, M. P., Grenier, D., & Gagnon, G. (2010). "Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro". *Journal of periodontal research*, 45(1), pp. 87-93. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2009.01205.x

3. Bertone, A. L., Ishihara, A., Zekas, L. J., Wellman, M. L., Lewis, K. B., Schwarze, R. A., ... & Genovese, R. L. (2014). "Evaluation of a single intra-articular injection of autologous protein solution for treatment of osteoarthritis in horses". *American Journal of Veterinary Research*, 75(2), pp. 141-151. DOI: 10.2460/ajvr.75.2.141
4. Bravo, B., Fernández de Castro, L., Buendía, I., Santos, X., & Gortázar, A. (2017)." El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el fragmento N-terminal de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) regulan la proliferación de células madre mesenquimales humanas". *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 9(1), pp.5-12. DOI:0.4321/S1889-836X2019000100002
5. Cao, S. S., & Kaufman, R. J. (2012)." Unfolded protein response". *Current Biology*, 22(16), pp. 622-626. DOI: 10.1016/j.cub.2012.07.004
6. Caron, J. 2011. "Arthritis: Osteoarthritis. In: Diagnosis and Management of Lameness in the Horse". *Second Ed. Saunder Elsevier, St Louis, MO, USA*. Pp. 655-668. DOI: 10.1016/B978-1-4160-6069-7.00061-4
7. Cassano, J. M., Kennedy, J. G., Ross, K. A., Fraser, E. J., Goodale, M. B., & Fortier, L. A. (2018). "Bone marrow concentrate and platelet-rich plasma differ in cell distribution and interleukin 1 receptor antagonist protein concentration". *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 26(1), pp. 333-342. DOI:10.1007/s00167-016-3981-9
8. Chávez, H., Araya, O., Folch, H., & Morán, G. (2010). "Uso de biomarcadores para el diagnóstico de enfermedad articular en el caballo". *Archivos de medicina veterinaria*, 42(1), pp. 1-10. DOI:10.4067/S0301-732X2010000100002
9. Chen, Y., Jiang, W., Yong, H., He, M., Yang, Y., Deng, Z., & Li, Y. (2020). "Macrophages in osteoarthritis: pathophysiology and therapeutics". *American Journal of Translational Research*, 12(1), pp. 261.
10. Cirilo, A. D., Llombart, C. M., & Tamargo, J. J. (2003). *Introducción a la química terapéutica*. Ediciones Díaz de Santos.
11. da Silva Xavier, A. A., da Rosa, P. P., de Brum Mackmill, L., & Roll, V. F. B. (2021). "An assessment of the effectiveness of hyaluronic acid and polyacrylamide hydrogel in horses with osteoarthritis: Systematic review and network meta-analysis". *Research in Veterinary Science*, 134, 42-50. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.11.013
12. Delplace, V., Boutet, M. A., Le Visage, C., Maugars, Y., Guicheux, J., & Vinatier, C. (2021). "Osteoarthritis: From upcoming treatments to treatments yet to come". *Joint Bone Spine*, 88(5), 105206. DOI: 10.1016/j.jbspin.2021.105206

13. di Nicola, V. (2020). "Degenerative osteoarthritis a reversible chronic disease". *Regenerative Therapy*, (15), pp. 149–160. DOI: 10.1016/j.reth.2020.07.007
14. Dieppe, P., Lohmander, S. 2005. "Pathogenesis and Management of Pain in Osteoarthritis". *The Lancet* (365), pp. 965-973 DOI: 10.3389/fvets.2019.00064.
15. Duan, L.; Mukherjee, E. (2016). *Janeway's Immunobiology*, Ninth Edition. Yale J. Biol. Med (89), pp. 424–425
16. Estrada Mcdermott, J. *et al.* (2021) "Role of innate immunity in initiation and progression of osteoarthritis, with emphasis on horses", *Animals*, 11(11), pp. 1–14. doi:10.3390/ani11113247.
17. Evans, C. H., Chevalier, X., & Wehling, P. (2016)." Autologous Conditioned Serum". *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 27(4), pp. 893–908. DOI: 10.1016/j.pmr.2016.06.003
18. Felson, D. T. (2005)." Osteophytes and progression of knee osteoarthritis". *Rheumatology*, 44(1), pp. 100–104. DOI:10.1093/rheumatology/keh411
19. Fernández-Pernas, P., Barrachina, L., Marquina, M., Rodellar, C., Arufe, M., & Costa, C. (2020). "Mesenchymal stromal cells for articular cartilage repair: preclinical studies". *European Cells and Materials*, 40, pp. 88–114. DOI: 10.22203/ecm.v040a06
20. Fréchette, J. P., Martineau, I., & Gagnon, G. (2005). "Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing". *Journal of dental research*, 84(5), pp. 434-439. DOI:10.1177/154405910508400507
21. Frisbie, D. *et al.* (2007) "Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis". *American Journal of Veterinary Research*, 68(3), pp. 290-296. DOI:10.21836/PEM20080311.
22. Frisbie, D., Ghivizzani, S., Robbins, P., Evans, C., & McIlwraith, C. (2002)." Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene". *Gene Therapy*, 9(1), pp. 12–20. DOI: 10.1038/sj.gt.3301608
23. Frisbie, D. D. (2005)." Future directions in treatment of joint disease in horses". *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 21(3), pp. 713-724. DOI: 10.1016/j.cveq.2005.07.001
24. Goldring, S. R., & Goldring, M. B. (2016)." Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk". *Nature Reviews Rheumatology*, 12(11), pp. 632–644. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.148
25. Goodrich, L. R., & Nixon, A. J. (2006). "Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review". *The Veterinary Journal*, 171(1), pp. 51–69. DOI: 10.1016/j.tvjl.2004.07.008

26. Grassel, S., & Muschter, D. (2020). "Recent advances in the treatment of osteoarthritis". *F1000 Research*, (9). DOI: 10.12688/f1000research.22115.1
27. Harrell, C. R., Markovic, B. S., Fellabaum, C., Arsenijevic, A., & Volarevic, V. (2019). "Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives". *Biomedicine & pharmacotherapy*, 109, 2318-2326. DOI:10.1016/j.biopha.2018.11.099
28. Haseeb, A., & Haqqi, T. M. (2013). Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clinical immunology*, 146(3), 185-196. DOI: 10.1016/j.clim.2012.12.011
29. Hashimoto, S., Creighton-Achermann, L., Takahashi, K., Amiel, D., Coutts, R., & Lotz, M. (2002). "Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis". *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(3), pp. 180–187. DOI: 10.1053/joca.2001.0505
30. Hernández-Gil, I. F. T., Gracia, M. A. A., Pingarrón, M. D. C., & Jerez, L. B. (2006). "Bases fisiológicas de la regeneración ósea I". *Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, (11), pp. 47-51.
31. Hunziker, E. B., Lippuner, K., Keel, M.J.B. y Shintani, N. (2015). "An educational review of cartilage repair: precepts & practice - myths & misconceptions - progress & prospects". *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(3), pp. 334-350. DOI: 10.1016/j.joca.2014.12.011
32. Jin, X., Beguerie, J. R., Zhang, W., Blizzard, L., Otahal, P., Jones, G., & Ding, C. (2013). "Circulating C reactive protein in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis". *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(4), pp. 703–710. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204494
33. Kawcak, C.E., Frisbie, D.D., Werypy, N.M., Park, R.D., McIlwraith, C.W., 2008. "Effects of exercise vs experimental osteoarthritis on imaging outcomes". *Osteoarthritis and Cartilage* (16), 1519-1525. DOI: 10.1016/j.joca.2008.04.015
34. Kay, J. D., Gouze, E., Oligino, T. J., Gouze, J. N., Watson, R. S., Levings, P. P., ... & Ghivizzani, S. C. (2009). "Intra-articular gene delivery and expression of interleukin-1Ra mediated by self-complementary adeno-associated virus". *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, 11(7), pp.605-614. DOI:10.1002/jgm.1334
35. Kim, G. B., Seo, M. S., Park, W. T., & Lee, G. W. (2020). "Bone Marrow Aspirate Concentrate: Its Uses in Osteoarthritis". *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3224. DOI: 10.3390/ijms21093224
36. Kumavat, R., Kumar, V., Malhotra, R., Pandit, H., Jones, E., Ponchel, F., & Biswas, S. (2021). "Biomarkers of Joint Damage in Osteoarthritis: Current Status and Future Directions". *Mediators of Inflammation*, 2021, pp. 1–15. DOI: 10.1155/2021/5574582

37. Li YS, Luo W, Zhu SA, *et al.* 2017. "T cells in osteoarthritis: alterations and beyond". *Front Immunol* 8:356. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00356
38. Li, Z., Huang, Z., & Bai, L. (2021). "Cell Interplay in Osteoarthritis". *Frontiers in cell and developmental biology*, (9), 720477. DOI: 10.3389/fcell.2021.720477
39. Linardi, R. L., Dodson, M. E., Moss, K. L., King, W. J., & Orved, K. F. (2019). "The Effect of Autologous Protein Solution on the Inflammatory Cascade in Stimulated Equine Chondrocytes". *Frontiers in Veterinary Science*, (6). DOI: 10.3389/fvets.2019.00064
40. Lopes, E. B. P., Filiberti, A., Husain, S. A., & Humphrey, M. B. (2017). "Immune Contributions to Osteoarthritis". *Current Osteoporosis Reports*, 15(6), pp. 593–600. DOI: 10.1007/s11914-017-0411-y
41. McCoy, A.M. (2015) "Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations", *Veterinary Pathology*, 52(5), pp. 803–818. doi:10.1177/0300985815588611.
42. McIlwraith, C. W., Kawcak, C. E., Frisbie, D. D., Little, C. B., Clegg, P. D., Peffers, M. J., ... & Kraus, V. B. (2018). "Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis". *Journal of Orthopaedic Research®*, 36(3), 823-831. DOI:10.1002/jor.23738
43. McIlwraith, C. W. (2016). "Traumatic arthritis and posttraumatic osteoarthritis in the horse". In *Joint disease in the horse* pp. 33-48. WB Saunders. DOI: 10.1016/B978-1-4557-5969-9.00003-6
44. McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D., & Kawcak, C. E. (2012). "The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis". *Bone & joint research*, 1(11), 297-309. DOI: 10.1302/2046-3758.111.2000132
45. McIlwraith, C.W., 2011. "Principles and Practices of Joint Disease Treatment en Diagnosis and management of lameness in the horse (2ª Edición)". Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU. DOI: 10.1016/B978-1-4160-6069-7.00084-5
46. McIlwraith, C. (2010). "Recent advances in diagnosis of equine joint disease", *Proceedings of the 2010 17th Kentucky equine research: Nutrition Conference*. Kentucky, 26-27 abril 2010. Lexington: Kentucky equine research, pp. 23-33.
47. McIlwraith, C. W., Billingham, R. C., & Frisbie, D. D. (2001). "Current and future diagnostic means to better characterize osteoarthritis in the horse—routine synovial fluid analysis and synovial fluid and serum markers". In *AAEP proceedings* Vol. 47, pp. 171-179.
48. McLellan, J., & Plevin, S. (2011). "Does it matter which platelet-rich plasma we use?". *Equine Veterinary Education*, 23(2), pp. 101-104. DOI:10.1111/j.2042-3292.2010.00185.x
49. Menarim, B. C., Gillis, K. H., Oliver, A., Mason, C., Ngo, Y., Werre, S. R., ... & Dahlgren, L. A. (2019). "Autologous bone marrow mononuclear cells modulate joint homeostasis in an equine in vivo model of sinovitis". *The FASEB Journal*, 33(12), 14337-14353. DOI:10.1096/fj.201901684RR

50. Middleton, K. K., Barro, V., Muller, B., Terada, S., & Fu, F. H. (2012). "Evaluation of the effects of platelet-rich plasma (PRP) therapy involved in the healing of sports-related soft tissue injuries". *The Iowa orthopaedic journal*, 32, pp. 150.
51. Mitchell RN. 2013. "Innate and adaptive immunity: the immune response to foreign materials". *In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. Biomaterials Science, 3rd ed.* Amsterdam: Academic Press, pp. 512–533. DOI:10.1016/B978-0-08-087780-8.00045-0
52. Montiel-Ruiz, R. M., Acosta-González, R. I., & Andrade, J. M. J. (2013). "Dolor oncológico óseo: de la farmacología preclínica a los ensayos clínicos". *Gaceta Médica de México*, 149(2), pp. 204-211 DOI: 10.1016/s0304-4858(06)74528-0
53. Muñoz-Torres, M., & García, R. R. (2006). "Cathepsina K y resorción ósea". *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 15(4), pp. 88-89. DOI:10.1016/S1132-8460(06)75270-9
54. Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews immunology*, 11(11), pp. 723-737 DOI:10.1038/nri3073
55. Pal, B., Endisha, H., Zhang, Y., & Kapoor, M. (2015). "mTOR: a potential therapeutic target in osteoarthritis?". *Drugs in R&D*, 15(1), pp. 27-36. DOI: 10.1007/s40268-015-0082-z
56. Pauli, C., Grogan, S. P., Patil, S., Otsuki, S., Hasegawa, A., Koziol, J., ... & D'Lima, D. D. (2011). "Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis". *Osteoarthritis and cartilage*, 19(9), 1132-1141. DOI: 10.1016/j.joca.2011.05.008
57. Peter, J. (2017). "Macrophage Polarization". *Annu Rev Physiol*, 79(1), pp. 541-66. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339
58. Prades, M., Carmona, J., 2009. "Pathophysiology of Osteoarthritis". *Compendium Equine: Continuing Education for Veterinarians* (4), pp. 28-40. Disponible en: http://vetfolio-vetstreet.s3.amazonaws.com/mmah/4e/005843e583478292f015a0b053a3ac/filePVE_04_01_28.pdf [consultado el 20-06-2022]
59. Ribitsch, I., Oreff, G. L., & Jenner, F. (2021). "Regenerative medicine for equine musculoskeletal diseases". *Animals*, 11(1), pp. 234. DOI:10.3390/ani11010234
60. Robinson, W. H., Lepus, C. M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T. M., & Sokolove, J. (2016). "Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis". *Nature Reviews Rheumatology*, 12(10), pp. 580-592. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.136
61. Ross, T. N., Kisiday, J. D., Hess, T., & McIlwraith, C. W. (2012). "Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide". *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(12), 1583-1590. DOI:10.1016/j.joca.2012.08.008

62. Sierra-García, G. D., Castro-Ríos, R., González-Horta, A., Lara-Arias, J., & Chávez-Montes, A. (2016). "Proteínas morfogenéticas óseas (BMP): aplicación clínica para reconstrucción de defectos en hueso". *Gac Med Mex*, (152), 381-5.
63. Souza, M. V. D. (2016). "Osteoarthritis in horses-Part 1: relationship between clinical and radiographic examination for the diagnosis". *Brazilian Archives of Biology and Technology*, pp 59. DOI:10.1590/1678-4324-2016150024
64. Strbo, N., Yin, N., & Stojadinovic, O. (2014). "Innate and adaptive immune responses in wound epithelialization". *Advances in wound care*, 3(7), pp. 492-501. DOI:10.1089/wound.2012.0435
65. Sellam, J., & Berenbaum, F. (2010). "The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis". *Nature Reviews Rheumatology*, 6(11), pp.625-635. DOI:10.1038/nrrheum.2010.159
66. Steel, C. M. (2008). "Equine synovial fluid analysis". *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 24(2), 437-454. DOI: 10.1016/j.cveq.2008.05.004
67. Takata, K., Uchida, K., Mukai, M., Takano, S., Aikawa, J., Iwase, D., ... & Takaso, M. (2020). "Increase in tryptase and its role in the synovial membrane of overweight and obese patients with osteoarthritis of the knee". *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, (13), 1491. DOI:10.2147/DMSO.S253147
68. Textor, J. (2011). "Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein". *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 27(2), pp. 275-298. DOI: 10.1016/j.cveq.2011.05.001
69. Torricelli, P., Fini, M., Filardo, G., Tschon, M., Pischedda, M., Pacorini, A., ... & Giardino, R. (2011). "Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses". *International Orthopaedics*, 35(10), 1569-1576. DOI:10.1007/s00264-011-1237-3
70. van der Kraan, P. M., & van den Berg, W. B. (2007). "Osteophytes: relevance and biology". *Osteoarthritis and cartilage*, 15(3), pp. 237-244. DOI: 10.1016/j.joca.2006.11.006
71. van Weeren, P. R., & de Grauw, J. C. (2010). "Pain in osteoarthritis". *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 26(3), pp. 619-642. DOI: 10.1016/j.cveq.2010.07.007
72. Wang, Q., Lepus, C. M., Raghu, H., Reber, L. L., Tsai, M. M., Wong, H. H., ... & Robinson, W. H. (2019). "IgE-mediated mast cell activation promotes inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis". *Elife*, 8, e39905. DOI: 10.7554/eLife.39905
73. Weeren, R. 2014. "Joint physiology: responses to exercise and training". In: *Equine Sports Medicine & surgery. Second Ed. Saunder Elsevier*. St Louis, MO, USA. Pp 213-222 DOI: 10.1016/B978-0-7020-4771-8.00011-9

74. Wilson, M. E., McCandless, E. E., Olszewski, M. A. y Robinson, N. E., (2020). "Alveolar macrophage phenotypes in severe equine asthma". *The Veterinary Journal* (256), 105436. DOI: 10.1016/j.tvjl.2020.105436
75. Woodell-May, J. E., & Sommerfeld, S. D. (2020). "Role of inflammation and the immune system in the progression of osteoarthritis". *Journal of Orthopaedic Research*[®], 38(2), pp. 253-257. DOI: 10.1002/jor.24457
76. Wu, C.L.; Harasymowicz, N.S.; Klimak, M.A.; Collins, K.H.; Guilak, F. (2020) "The role of macrophages in osteoarthritis and cartilage repair". *Osteoarthr. Cartilage*, (28), pp. 544–554. DOI: 10.1016/j.joca.2019.12.007
77. Zayed, M., Adair, S., Ursini, T., Schumacher, J., Misk, N., & Dhar, M. (2018). Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse. *Research in veterinary science*, 118, pp. 317-323. DOI: 10.1016/j.rvsc.2018.03.011
78. Zhu, H., Yan, H., Ma, J., Zhang, H., Zhang, J., Hu, Z., & Guo, Y. (2020). "CCAL1 enhances osteoarthritis through the NF-κB/AMPK signaling pathway". *FEBS Open bio*, 10(12), 2553-2563. DOI: 10.1002/2211-5463.12989

