



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

ESTUDIO RETROSPECTIVO DE CASOS CLÍNICOS TRATADOS
CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN PATOLOGÍAS
MUSCULOESQUELÉTICAS EQUINAS.

Autor/es

BEGOÑA ARNAIZ DE LAS REVILLAS CALOMARDE

Director/es

ANTONIO ROMERO LAS HERAS
LAURA BARRACHINA PORCAR

Facultad de Veterinaria

2015

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	3
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Lesiones musculoesqueléticas equinas y tratamientos convencionales.....	4
1.2. Terapia regenerativa.....	5
1.3 Células Madre.....	6
1.4 Protocolo de infiltración recomendado.....	10
1.5 El caballo como modelo para el estudio de terapias con MSCs.....	11
1.6. Importancia de los estudios in vivo del caballo.....	11
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. Diseño del estudio.....	14
3.2. Creación de una base de datos.	14
3.3. Recopilación de la información.....	17
3.4 Obtención de productos celulares y acelulares para medicina regenerativa.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Obtención de productos para medicina regenerativa	19
4.2. Creación de la base de datos.....	19
4.3. Estadística descriptiva sobre los animales.....	20
4.4. Estadística descriptiva sobre los tratamientos.....	21
4.5. Estadística descriptiva sobre la evolución.....	25
4.6. Efectos adversos.....	28
5. CONCLUSIONES	29
6. CONCLUSIONS.....	30
7. VALORACIÓN PERSONAL.....	31
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS.....	35

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al HVUZ y al grupo LAGENBIO la posibilidad de realizar este Trabajo Fin de Grado sobre casos llevados a cabo dentro de sus instalaciones, poniendo a mi disposición toda la información necesaria para la realización del estudio.

Agradecer también los veterinarios responsables la ayuda aportada al facilitarme información a cerca de la evolución de los pacientes y permitir continuar con el seguimiento de los casos.

En último lugar, especial mención a los directores de este trabajo, Laura Barrachina y Antonio Romero, que me han acompañado durante toda su realización. Agradecerles el tiempo invertido, su paciencia y ganas de enseñarme, así como el haberme dado la posibilidad de llevar a cabo junto a ellos el presente estudio.

RESUMEN

Las lesiones del aparato locomotor tienen gran relevancia en la especie equina, dado que actualmente su papel principal es deportivo. Los tejidos más frecuentemente afectados son tendones, ligamentos y cartílago, caracterizados por poseer muy poca capacidad de regeneración. El tejido cicatricial que se produce durante la fase reparatoria tras la lesión, presenta características diferentes al original, por lo que es frecuente que el caballo no logre recuperar plenamente su actividad y haya recidivas.

La terapia celular tiene como objetivo la regeneración del tejido para devolverle sus propiedades y funcionalidad normales. El potencial terapéutico de las células madre mesenquimales (MSCs) se basa principalmente en su capacidad de diferenciación hacia distintos tejidos del linaje mesodérmico, así como sus propiedades antiinflamatorias y de inmunomodulación.

Este estudio retrospectivo incluye 15 caballos con lesiones ligamentosas, tendinosas y/o articulares, que han recibido terapias regenerativas con células madre mesenquimales cultivadas en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Se ha recopilado la información sobre estos casos referentes a las lesiones y el tratamiento de elección recibido, y se ha valorado el efecto del tratamiento en las lesiones mediante técnicas de diagnóstico por imagen y evolución clínica.

La mayoría de las lesiones tratadas fueron de tejidos blandos y recibieron MSCs autólogas. En general, la medicina regenerativa no fue el tratamiento de primera elección. Ecográficamente todas las lesiones de tejidos blandos mejoraron tras el tratamiento con MSCs, clínicamente más de la mitad de los casos tratados recuperaron su nivel previo de entrenamiento, y en ninguno de los animales se observaron efectos adversos significativos.

SUMMARY

Injuries of the locomotor system are very important in equine species due to their current sporty role. The most frequently affected tissues are tendons, ligaments and cartilage, which are characterized by their limited capacity for regeneration. The tissue produced in the reparative stage after the injury presents different characteristics to the original one, so the horse often does not reach the complete recovery of its activity and relapses are frequent.

The aim of cellular therapy is the tissue regeneration in order to restore its normal properties and functions. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) is based on their ability to differentiate into various tissues of mesodermal lineage and their anti-inflammatory and immunomodulatory properties.

This retrospective study includes 15 horses with ligament, tendon and/or joint injuries, who have received regenerative therapy with mesenchymal stem cells cultured in the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Zaragoza. Information about these injuries and the treatment received was compiled, and the effect of these treatments was assessed by imaging techniques and the clinical course. Soft tissue pathologies were the most treated and they mainly received autologous MSCs. In general, regenerative medicine was not the first treatment option. All soft tissue injuries improved ultrasonographically after the MSC treatment, and more than half of treated cases had a complete clinical improvement, recovering their previous level of training. Significant adverse effects were not observed in none of the animals treated with MSCs.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LESIONES MUSCULOESQUELÉTICAS EQUINAS Y TRATAMIENTOS CONVENCIONALES

El potente aparato locomotor de los caballos es fundamental para el desarrollo de disciplinas deportivas. La aparición de lesiones que afecten a tejidos de este sistema va a tener como resultado que el caballo no pueda llevar a cabo de forma normal su actividad, o que incluso su permanencia en la disciplina se vea comprometida, viéndose obligado a una prematura retirada (Frisbie & Smith, 2010). De hecho, las enfermedades más comunes en esta especie son aquellas que afectan a su aparato musculoesquelético (Carmona & López, 2011), lo que se traduce en un importante impacto económico para la industria del mundo del caballo (Schlueter & Orth, 2004).

El principal problema que presentan los tejidos como el **tendón**, el **ligamento** o el **cartílago articular** es su limitada capacidad de regeneración. Tras la lesión, el tejido tendinoso o ligamentoso sufre un proceso de fibrosis y se produce una lenta cicatrización, que da lugar a un tejido reparado, con diferente arquitectura de las fibras y diferentes características de elasticidad y fuerza que el tejido original, lo que tiene importantes consecuencias en cuanto al rendimiento del caballo (Godwin, EE 2012). Además, los caballos afectados con estos problemas presentan una predisposición de **recaída** aproximadamente del 80% (Halper, J. 2006).

Por lo que respecta a los problemas **articulares**, son también una causa frecuente de cojera en el caballo. Tienen un tratamiento complejo debido a que las estructuras afectadas, como el cartílago articular o el hueso subcondral, poseen una capacidad de reparación muy limitada como sucede con los tendones y ligamentos, lo que da lugar a un tejido de características biomecánicas inferiores a las del tejido original (Frisbie & Smith, 2010). El tratamiento ideal de estas patologías debería centrarse no sólo en frenar la progresión de las lesiones, sino además, reparar los daños producidos. Sin embargo, los tratamientos convencionales sólo pueden aspirar a reducir la inflamación y el dolor, e intentar **enlentecer la progresión de las lesiones**, evitando así que avancen los cambios degenerativos en la articulación (Fortier, L. 2009).

Los **tratamientos** más usados en clínica equina para patologías locomotoras hasta la actualidad son, básicamente, el uso de **AINES** sistémicos, los **corticoesteroides intralesionales** y las **sustancias de viscosuplementación** como el **ácido hialurónico** o los **glucosaminoglicanos polisulfatados**, entre otros. Además existen **tratamientos quirúrgicos** como son los lavados articulares y la artroscopia en el caso de problemas articulares (Fortier, L. 2009), y tenotomía/desmotomía en las lesiones de tejidos blandos.

Actualmente, y en vista de las limitaciones de los tratamientos convencionales, se ha iniciado la búsqueda de fármacos o compuestos biológicos con efectos regenerativos.

1.2 TERAPIA REGENERATIVA

La medicina regenerativa consiste en reemplazar o regenerar las células, tejidos, u órganos, para conseguir restaurar o restablecer una función normal. Es decir, pasar de la simple cicatrización a la completa curación (Vázquez et al., 2012). Los mecanismos para lograr este objetivo pueden ser:

- **Estimulando los propios mecanismos del cuerpo** para reparar esos tejidos dañados mediante:
 - Células progenitoras o “células madre” (terapia celular).
 - Moléculas activas: administradas solas (factores de crecimiento) o secretadas por células (terapia de inmunomodulación).
- **Reemplazando la matriz extracelular** dañada, permitiendo a la lesión curar por sí misma o mejorando la acción de alguno de los mecanismos anteriores (mallas biológicas, *scaffolds*).
- **Reemplazando completamente los tejidos/órganos dañados** por otros creados *in vitro* (ingeniería de tejidos).

Dentro de este primer grupo podemos hacer una distinción en función de si contienen o no células progenitoras.

1.2.1 PRODUCTOS QUE CONTIENEN CÉLULAS PROGENITORAS:

- Células progenitoras aisladas y cultivadas: Es el caso de las células madre mesenquimales (**MSCs**). Se cultivan a partir de una muestra, como médula ósea o tejido adiposo, para obtener elevadas concentraciones celulares para inocular.
- Fracciones celulares no expandidas (no cultivadas): Se inoculan células progenitoras pero en cantidades muy pequeñas, puesto que no se realiza un paso de cultivo y expansión. Dentro de este grupo podemos citar el **aspirado de médula ósea** sin cultivar, y la fracción vascular estromal derivada de la grasa (**AD-SVF**). Ambos tienen una disponibilidad inmediata y menor coste que cualquier producto cultivado, pero como la cantidad de células progenitoras es muy escasa (tal vez sub-terapéutica), los resultados no son tan evidentes como en el caso de las MSCs (Frisbie & Smith, 2010).

1.2.2 PRODUCTOS QUE CONTIENEN MOLÉCULAS ACTIVAS:

Generalmente las denominamos factores de crecimiento. Son sustancias producidas por el organismo, capaces de estimular el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular. Son generalmente proteínas u hormonas que actúan uniéndose a receptores específicos en la superficie de sus células diana, estimulando funciones en las mismas. Algunos ejemplos de factores de crecimiento son el Insulin growth factor-1 (IGF-1), el Fibroblast growth factor (FGF), o el Platelet-derived growth factor (PDGF), entre otros (Ma et al., 2014).

Dentro de los productos que contienen estas moléculas activas encontramos;

- **Sobrenadante de médula ósea (M.O) esternal:** Fracción acelular obtenida tras centrifugación de médula ósea, que es rica en factores de crecimiento.
- **Fracción de plasma rico en plaquetas (PRP):** concentrado de plaquetas obtenido mediante centrifugación de la propia sangre del caballo, dada la riqueza en factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas de las plaquetas.
- **Suero autólogo condicionado (ACS):** Suero autólogo enriquecido con la producción endógena de IRAP (Antagonista de la IL-1, citoquina pro-inflamatoria con importante efecto catabólico y de degeneración en la articulación).
- **Fibrina rica en plaquetas:** Obtenida a partir de la gelificación del suero sanguíneo. Produce una liberación mucho más lenta de los factores de crecimiento.

1.3 CÉLULAS MADRE

En general, una **célula madre** se define como una célula que tiene la capacidad de dividirse (auto-replicarse) por periodos indefinidos durante toda la vida del individuo, permaneciendo indiferenciada, y que bajo las condiciones apropiadas o señales correctas del microambiente celular pueda dar origen (diferenciarse) a diferentes linajes con características y funciones especializadas (Rodríguez,V 2005). Sus funciones biológicas son: **la creación de estructuras orgánicas** durante el desarrollo del individuo (células madre embrionarias), y la **regeneración de tejidos dañados**, enfermos o envejecidos durante la vida del animal (células madre adultas).

Las células madre pueden clasificarse según su potencial de diferenciación, y según el tejido de origen. Dentro de la clasificación según su potencial de diferenciación: Es decir, de acuerdo al tipo de tejido que originan, existen cuatro tipos de células madre:

- **Células totipotentes:** Estas células tienen el poder de generar un embrión completo ya que son capaces de diferenciarse a todos los tipos celulares existentes.

- **Células pluripotentes:** Células que puedan dar origen a progenitores que forman cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo, y ectodermo.
- **Células multipotentes:** Son aquellas que pueden dar origen a precursores relacionados únicamente con una de las tres capas embrionarias.
- **Células unipotentes:** este tipo celular sólo puede generar células hijas de una sola línea celular, que es el del tejido donde residen.

Clasificación según el tejido de origen:

- **Células madre embrionarias**, obtenidas a partir de las primeras etapas de formación del embrión (mórula o blastocisto). Es el caso, por ejemplo, de las células madre totipotentes.
- **Células madre germinales**, derivadas del blastocisto postimplantación.
- **Células madre fetales**, aparecen en tejidos y órganos fetales pero presentan características similares a las células madre presentes en los tejidos adultos.
- **Células madre adultas**, se encuentran en la mayoría de los tejidos de un individuo adulto. A este grupo pertenecen las células madre multipotentes.

1.3.1 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES. ¿QUÉ SON, PARA QUÉ SE UTILIZAN Y CÓMO FUNCIONAN?

Las **MSCs** son células pluripotentes, adultas, con morfología fibroblastoide, y con capacidad de autorenovarse y formar colonias celulares (Vázquez, Romero, & Rodellar, 2012). Al derivar de la capa embrionaria del mesodermo presentan la capacidad de diferenciarse a células especializadas de tejidos que también derivan de ella. Se ha demostrado la capacidad de diferenciación de las MSCs a hueso, cartílago, tendón, músculo, tejido adiposo y estroma de la médula ósea (Ranera et al, 2011). Sin embargo, también se ha descrito su diferenciación a tejidos del endodermo como el pancreático, o del ectodermo, como el linaje neuronal (Ma et al., 2014).

El considerable **potencial terapéutico de las MSCs** en medicina regenerativa equina se basa tanto en la simplicidad de su **aislamiento**, su capacidad para promover la **regeneración** de tejidos, su elevada **tasa de proliferación**, y su **potencial de diferenciación**, así como en su capacidad de evitar la formación de cicatriz patológica o exagerada mediante la **modulación de la respuestas inmunes, y la regulación de la respuesta inflamatoria** (Stewart and Stewart, 2011). Aunque hemos de tener presente que la finalidad con la que se emplea esta terapia celular no es nunca la de reducir los tiempos de recuperación, si no la de regenerar los tejidos para devolverles sus propiedades y funcionalidad normales.

El primer uso terapéutico de MSCs en équidos se informó en 2003. Desde entonces, su aplicación clínica ha crecido enormemente con miles de caballos tratados en todo el mundo. En la actualidad, las MSCs se utilizan principalmente en **medicina veterinaria** para el tratamiento de **enfermedades musculoesqueléticas**.

Aunque la terapia celular con células madre mesenquimales lleva tiempo siendo aplicada **todavía se desconoce cuál es el mecanismo de acción de las células implantadas en el tejido**. Existe gran controversia sobre si son las células inyectadas las que se encargan de regenerar el tejido a través de su propia diferenciación, o si contribuyen a crear un microambiente en el que a través de la producción y secreción de factores solubles (citoquinas y factores de crecimiento), sean las células del individuo las que reparen el tejido dañado (Prockop, DJ 2007). Su papel inmunoregulador y antiinflamatorio está siendo ampliamente estudiado en los últimos años (Koch et al, 2009) (Ma et al., 2014).

La tendencia actual se inclina hacia la terapia alogénica por las ventajas que brinda esta estrategia, dado que permite una mayor y más rápida disponibilidad de MSCs. Además, permite el uso de terapia celular en aquellos casos en los que hay limitaciones con las células autólogas, bien porque éstas son escasas y/o con baja viabilidad, como en el caso de pacientes de edad avanzada, o bien cuando el paciente tiene un problema genético que, por tanto, también tendrán sus MSCs (Chen & Tuan, 2008).

Algunos de los estudios más recientes rompen con las bases establecidas que se tenía sobre las MSCs, conocidas comúnmente como inmunoprivilegiadas (lo que significa que no son reconocidas por el sistema inmune del receptor). Se ha visto que las MSCs equinas pueden expresar el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII), especialmente en situaciones inflamatorias (Schnabel et al., 2014), lo que supone que tienen capacidad de iniciar una respuesta inmune. Sin embargo, las MSCs son mucho menos inmunogénicas que otras células alogénicas, ya que por un lado no expresan las moléculas co-estimuladoras necesarias para el reconocimiento antigénico, y por otro lado, como se ha comentado anteriormente, son capaces de regular al sistema inmune local. Por ello, se considera que no son inmunoprivilegiadas sino inmunoevasivas (Ankrum et al., 2014).

Este reciente descubrimiento clínicamente se traduce en un empleo más cuidadoso de MSCs alogénicas, tanto desde el punto de vista de la seguridad, como de la funcionalidad. (Schnabel et al., 2013) (Ma et al., 2014). Recientemente se ha recomendado que, previo al uso alogénico, se teste la compatibilidad entre donante y receptor, de forma que se minimicen los posibles efectos adversos (Ankrum et al., 2014).

1.3.2 ¿CÓMO Y DE DÓNDE SE OBTIENE LAS MSC EQUINAS?

Las MSCs equinas pueden obtenerse de **médula ósea**, **grasa subcutánea**, **sangre** y **tejido del cordón umbilical**, y **sangre periférica**. Las derivadas de médula ósea (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, **BMMSC**) y de tejido adiposo (adipose-derived mesenchymal stem cells, **ASC** o **ATMSCs**) son los dos tipos de células madre más frecuentemente empleados en el caballo. Ambos son fácilmente accesibles, y pueden cultivarse con relativa sencillez (Vidal et al., 2008). Las técnicas para la obtención, aislamiento y cultivo de MSCs equinas tanto de M.O. como de tejido adiposo son procesos bien documentados (Ranera et al. 2011).

La facilidad del procedimiento de recogida, el número de células obtenidas, la capacidad y la eficiencia para diferenciarse, así como la morbilidad asociada a la recogida, son los puntos importantes a considerar en la elección entre BMMSC o ASC. (Frisbie & Smith, 2010). En términos generales, los resultados obtenidos son mejores cuando se emplean BMMSCs (Frisbie, DD 2009). Las publicaciones sugieren que, si bien las ATMSCs tienen la capacidad de diferenciarse en tejido musculoesquelético, esta capacidad parece inferior a la que tienen las BMMSC. Pero no debemos olvidar las ventajas nos brinda el empleo del tejido adiposo, entre las que destacan: su accesibilidad en grandes cantidades con mínima morbilidad, la facilidad de extracción, y las pocas barreras prácticas, éticas e inmunológicas para su aplicación clínica (Arias, J I 2013).

La figura 1 muestra un esquema del proceso completo del tratamiento que recibe un caballo tratado con terapia celular de MSCs autólogas. En primer lugar se toma una muestra de los tejidos que contienen MSCs del caballo lesionado, generalmente de M.O. o tejido adiposo. Después, las MSCs se aíslan de los tejidos, se expanden durante varios pases en un medio de cultivo adecuado, se reimplantan en la lesión del animal de forma eco-guiada o mediante perfusión locoregional, y finalmente el animal sigue un programa de ejercicios de recuperación en el que la intensidad se incrementa gradualmente con los meses.

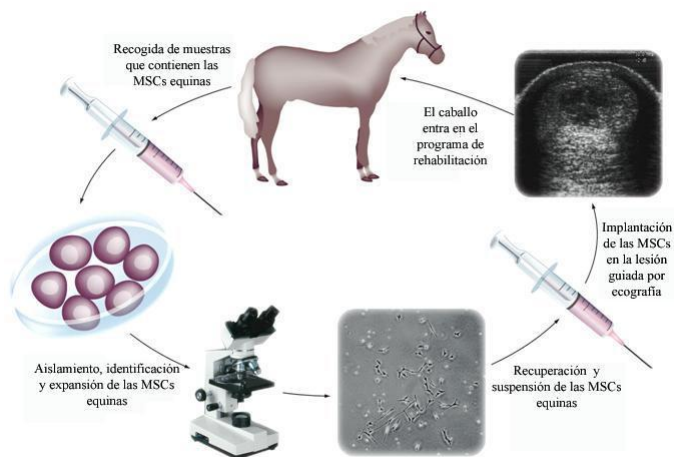


Figura 1. Esquema del tratamiento con MSC a caballos con lesiones relacionadas con el sistema locomotor. Adaptado de VetCell MS-

1.4 PROTOCOLO DE INFILTRACIÓN RECOMENDADO

Para las lesiones del aparato locomotor que pretenden ser tratadas con medicina regenerativa no hay un protocolo de actuación definido, sino más bien un **patrón recomendado**. Según la edad del animal, la naturaleza y grado de lesión, y la evolución en el tiempo, se actúa de una forma específica para cada caso.

Como opción para el primer tratamiento, es frecuente el empleo de productos acelulares (PRP/ sobrenadante de MO), y que se extraiga una muestra de los tejidos que contienen MSCs para su posterior cultivo. Aunque otra opción a contemplar sería el empleo de MSC alogénicas, en cuyo caso no se precisa toma de muestras. A los **20/30 días**, cuando ya está disponible un buen número de MSC cultivadas del propio animal, se procede a realizar la primera **infiltración intralesional**. Las células pueden ir resuspendidas en distintos vehiculantes: suero salino fisiológico, PRP, o sobrenadante de M.O. del mismo animal, a fin de beneficiarnos de una gran variedad de factores de crecimiento, aunque el portador ideal está aún por determinar (Smith et al., 2003). Suele realizarse una revisión del caballo a los 30 días post 1ª inyección, y se **repite** el tratamiento **si hay menos de un 50% de mejoría**, tanto clínica como ecográfica.

Algunos trabajos publicados afirman que la efectividad de las MSCs es mayor si se pone más de una dosis independientemente de la evolución de la lesión (Hatsushika et al., 2014). Un protocolo de **rehabilitación** basado en el aumento gradual de ejercicio del caballo es también esencial para el éxito, y debe adaptarse a cada individuo en función del examen físico y la evaluación de las cojeras. (Schnabelet al., 2013)

1ª Infiltración	Día 0	Productos acelulares y toma de muestra para cultivo de MSCs.
2ª Infiltración	Día 20-30	Infiltración intralesional de MSC autólogas cultivadas.
3ª Infiltración	Al mes de la 2ª Infiltración	Si mejora < 50%, infiltrar por segunda vez con MSC autólogas.

Figura 2: Resumen de las pautas de actuación descritas por (Schnabel, Fortier, McIlwraith, & Nobert, 2013)

Por lo que respecta a la **cantidad de células** a infiltrar, el tratamiento con células madre no parece seguir una relación dosis-efecto, pero basándonos en la bibliografía, la cantidad de células más comúnmente empleadas para las lesiones de tendones/ligamentos está en torno a los 10 millones, mientras que para problemas articulares como la osteoartritis, la recomendación actual ronda los 20 millones. (Schnabel et al., 2013)

1.5 EL CABALLO COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE TERAPIAS CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

El caballo es un animal que se utiliza como **modelo para la investigación en terapia celular**, especialmente para aquellos tratamientos orientados hacia la **regeneración de lesiones de los tejidos musculoesqueléticos**. Esto se debe a su importancia como animal deportivo y a su idoneidad como modelo animal con futuras aplicaciones a la medicina humana (Weil et al., 2011).

Se ha establecido como modelo animal para lesiones focales de **cartílago y osteoartritis** puesto que presenta ventajas con respecto a otros animales: su gran tamaño facilita la exploración y la valoración de la evolución, y el espesor y composición del cartílago se asemejan más estrechamente a las características del cartílago articular humano (Poole et al., 2010). El caballo también se considera un buen modelo animal para los problemas **del tendón y ligamento**, ya que muchas de las lesiones espontáneas vistas en esta especie, son similares a las observadas en los atletas humanos (Koch et al., 2009).

Otra de las razones para considerar el caballo como modelo ideal es, que al igual que las personas, puede ser sometido a periodos de rehabilitación y entrenamiento posteriores a la terapia. Sin embargo el uso del caballo como un modelo de estudio de terapias con células madre **no está exento de problemas** en este momento, sobre todo debido a la **falta de marcadores moleculares específicos** equinos necesarios para caracterizar las poblaciones celulares. (Koch et al., 2009).

1.6 IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS IN VIVO EN EL CABALLO

A día de hoy se sabe que **el comportamiento *in vitro* de las células madre y su interacción con el sistema inmune difiere de lo que sucede *in vivo***, y que las células madre se comportan de manera diferente en función del entorno en el que son implantadas (Fortier, L. 2012). El uso de células no diferenciadas, parte del principio de que, el medio ambiente local de los tejidos, el llamado "nicho", guía a las células madre hacia el fenotipo y la función deseada. Este proceso puede verse comprometido, especialmente en tejidos enfermos o lesionados donde existe un microambiente inflamatorio. Además, las complejas interacciones con el sistema inmune del animal no pueden ser completamente recreadas *in vitro*. Los estudios *in vitro* permiten avanzar en el conocimiento sobre el comportamiento de las MSCs, pero no nos aportan información sobre el efecto real que producirían en los caballos lesionados (Consentius et al., 2015).

Por ello, para el estudio de la eficacia de las MSCs en patologías del aparato locomotor, es imprescindible la realización de estudios *in vivo*. Aquellos estudios que cuentan con un modelo de lesión (Frisbie et al., 2009), son los que más información nos aportan, ya que se trata de lesiones más homogéneas y al ser estudios prospectivos, se siguen protocolos de actuación predeterminados, así como un seguimiento de los casos a plazo fijo. Los inconvenientes de estos estudios es que son costosos, precisan el sacrificio de los animales para realizar estudios anatomo-patológicos, y en muchas ocasiones se debate sobre si el efecto de las MSCs en una lesión inducida difiere de su comportamiento en aquellas lesiones de origen natural (Poole et al., 2010) (Koch et al., 2009). Por ello, la realización de estudios *in vivo* con animales que padecen lesiones espontáneas o naturales, es de gran importancia ya que complementan los datos obtenidos por los estudios *in vitro*, e *in vivo*, anteriormente citados. Estos estudios suponen la oportunidad de ver el efecto de las MSCs en condiciones reales, pero cuentan también con limitaciones como la gran variabilidad del tipo y gravedad de lesiones, de los diferentes tiempos transcurridos desde el inicio de la lesión, así como la heterogeneidad de los tratamientos previos que han podido recibir y de las características intrínsecas de los animales. Por ello, son difíciles de llevar a cabo, y sobre todo de valorar e interpretar sus resultados, pero permiten seguimientos a largo plazo, se pueden incluir caballos de alto rendimiento y valorar su vuelta al trabajo, y no requieren la inducción de lesiones, ni el sacrificio de animales (Broeckx et al., 2014).

En conclusión, aunque los estudios *in vitro* e *in vivo* con modelos de lesión siguen siendo imprescindibles, debe aprovecharse siempre que sea posible la información obtenida de casos clínicos tratados con MSCs. El conocimiento que de ellos se puede extraer es muy valioso, y nos acerca al efecto real que estas terapias pueden suponer en la gran variedad de lesiones locomotoras equinas.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las lesiones musculoesqueléticas suponen un problema de vital importancia en el mundo del caballo dado que los tejidos más frecuentemente afectados tiene escasa capacidad de regeneración, y los tratamientos convencionales no suponen una solución definitiva de la patología.

La mejoría descrita por otros autores tras el empleo de medicina regenerativa y células madre en la especie equina, es tangible. Los resultados obtenidos en este campo de investigación se pretende que sean de utilidad no solo para la medicina veterinaria sino también para la medicina humana.

Los principales objetivos con los que este estudio retrospectivo ha sido llevado a cabo fueron:

1. Revisar la incidencia de caballos con lesiones del locomotor tratados con MSCs cultivadas en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.
2. Estudiar individualmente los casos a fin de valorar la mejoría ecográfica y/o radiológica.
3. Conocer la evolución clínica de los animales tras recibir el tratamiento con MSCs.
4. Valorar la aparición de efectos adversos tras la infiltración intralesional.
5. Tratar de valorar la efectividad de estas terapias.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1- DISEÑO DEL ESTUDIO

Para desarrollar este Trabajo Fin de Grado se ha realizado un estudio **retrospectivo** en el que han sido seleccionados 15 caballos, de edades comprendidas entre los 3 y 19 años, que presentaban lesiones tendinosas, ligamentosas y/o articulares y que habían recibido como tratamiento intralesional, en al menos una de sus infiltraciones, **MSCs autólogas o alogénicas** cultivadas en los laboratorios LANGEBIO de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

Los animales tratados fueron diagnosticados de cojera en al menos una de las extremidades mediante **examen estático y dinámico**, en diferentes suelos y a diferentes aires, acompañado de las **anestias diagnósticas y pruebas ecográficas y/o radiológicas** pertinentes.

3.2- CREACIÓN DE UNA BASE DE DATOS

El presente trabajo engloba casos tratados desde 2007 hasta 2014. Como criterio para seleccionar los individuos del estudio, al margen de las características intrínsecas de los animales, se ha buscado que los casos estuviesen bien **documentados** y apoyados por **pruebas diagnósticas** que nos pudieran servir de utilidad para evaluar la evolución de los mismos. Hemos recopilado la máxima información disponible a cerca de los animales y sus lesiones, incluyendo el diagnóstico de las mismas y las condiciones antes del tratamiento con MSCs, el/los tratamientos individuales con medicina regenerativa recibidos, así como la evolución posterior.

La información sobre los casos fue cumplimentada con los **registros médicos** y de **laboratorio**, junto con la **información aportada por los veterinarios** remitentes con los que nos hemos puesto en contacto. Para facilitar la recopilación de información, así como la organización de la misma, se creó una **base de datos** en formato Excel de la que nos hemos servido para desarrollar el posterior estudio. En ella se incluyó toda la información disponible a cerca de: datos sobre los animales, sobre el tratamiento, y sobre la evolución.

3.2.1 INFORMACIÓN SOBRE EL ANIMAL

Para caracterizar los animales se recogió la siguiente información a fin de cumplimentar la reseña de los mismos: sexo, raza, edad, disciplina, y tipo de lesión. Con el objetivo de cumplir con la política de protección de datos de los distintos centros veterinarios, en lugar de emplear los nombres propios de los caballos, a estos se les asignó al comienzo del estudio una numeración arbitraria que emplearemos a lo largo del trabajo para referirnos a los distintos animales.

3.2.2 INFORMACIÓN SOBRE EL TRATAMIENTO

Con el objetivo de analizar el tratamiento administrado a cada animal, hemos recopilado información relativa a los siguientes apartados: **tratamientos previos administrados, cantidad de células madre infiltradas, origen de las mismas, medios de suspensión de las células y número de infiltraciones.**

Los animales de nuestro estudio fueron tratados con terapia regenerativa, y como hemos dicho anteriormente, en al menos una de las infiltraciones recibieron MSCs, autólogas o alogénicas, obtenidas a partir de médula ósea (M.O) esternal o tejido adiposo. No obstante tanto anterior como posterior a la misma, pudieron recibir otro tipo de infiltraciones con productos regenerativos acelulares (PRP/Sobrenadante de M.O).

Las MSCs implantadas podían ir resuspendidas en los siguientes vehiculantes: Ringer Lactato, PRP o Sobrenadante de médula ósea. Dado que las diferentes lesiones pudieron recibir hasta un total de 5 infiltraciones, y teniendo en cuenta que en nuestro estudio existe más variabilidad en cuanto al tipo de MSCs (Autólogas/Alogénicas), que respecto al origen (ya que la mayoría proceden de M.O) hemos decidido agrupar los datos de los tratamientos intralesionales en las siguientes categorías:

- PRP / Sobrenadante de M.O
- MSCs Autólogas
- MSCs Alogénicas
- PRP / Sobrenadante de M.O + MSCs autólogas/alógenicas

3.2.3. INFORMACIÓN SOBRE LA EVOLUCIÓN

Para evaluar la mejoría de los animales tras la infiltración hemos de tener en cuenta tanto la **mejoría clínica**, como la mejoría según las **técnicas de diagnóstico por imagen**, dentro de las cuales se emplean diferentes criterios según se trate de un problema articular o de tejidos blandos. Además, se ha recogido información sobre los posibles efectos adversos de la infiltración de MSCs:

- Para evaluar la **evolución clínica**, hemos empleado la clasificación utilizada por (Ferris et al., 2014), que separa en 3 grupos a los animales en función del nivel de retorno a la actividad desarrollada antes de la lesión.

- "Vuelta al nivel anterior de trabajo" → pertenecen a esta categoría los animales que tras el tratamiento hubieran vuelto o superado su nivel original de rendimiento previo a la lesión.
 - "Vuelta al trabajo" → En este grupo se engloban los animales que no pudieron recuperar el nivel de trabajo previo a la lesión, pero siguieron ejerciendo algún tipo de actividad.
 - "No retorno al trabajo" → aquellos casos que se hubieran retirado del trabajo completamente como consecuencia de la lesión, o en aquellos casos que no hubo mejora tras el tratamiento.
- Evolución **radiológica** de **lesiones articulares**:
 - "Nuevos cambios radiológicos" → englobamos en este grupo aquellas lesiones que pese a recibir diferentes infiltraciones, no se estabilizaron en el tiempo, si no que evolucionaron desfavorablemente.
 - "Conservación de la imagen radiológica" → pertenecen a este grupo las lesiones articulares que, independientemente de su evolución clínica, no empeoraron en las sucesivas radiografías realizadas post-infiltración de MSCs.
 - Evolución **ecográfica** de lesiones en **tejidos blandos**: la valoración de cada lesión post tratamiento tendrá en cuenta los siguientes parámetros: **ecogenicidad**, **alineación de fibras**, y **porcentaje de lesión** afectado. En función de éstos, cada lesión quedará englobada en uno de estos 3 grupos:
 - "Progresión favorable" → Se incluyen en este grupo lesiones que tras la infiltración de las MSC, mejoraron mínimo en uno de los parámetros anteriormente citados, y el resto de los parámetros al menos se mantuvieron estables.
 - "Progresión desfavorable" → Quedan englobados en este grupo aquellos animales que muestran evolución desfavorable en al menos uno de los parámetros anteriores.
 - "No progresión" → Casos en los que las lesiones se estabilizaron en el tiempo.

Con el fin de analizar los efectos que produce la administración de MSCs en la especie equina, hemos recogido también información acerca de los **efectos adversos** producidos por la administración intralesional de este tipo de células:

- "Presencia de efectos adversos asociados a la infiltración intralesional".
- "No presencia de efectos adversos asociados a la infiltración intralesional".

Dada la dificultad para recopilar la totalidad de la información de cada uno de los casos tratados con MSCs, se establecieron unos **criterios de inclusión y de exclusión** para seleccionar sólo aquellos casos, bien documentados íntegramente, o de los que a pesar de estar incompletos, se pudo recoger la información esencial: reseña, registros médicos acerca del tratamiento, (número y tipo de infiltraciones, origen de las MSCs), o sobre su evolución clínica.

3.3- RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN

Para completar la base de datos descrita en el apartado anterior, comenzamos buscando los animales que habían sido tratados con MSCs basándonos en el listado proporcionado por el grupo LANGEBIO de animales para los cuales se habían cultivado MSCs. Solicitamos las **fichas clínicas** de los animales tratados en el Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HV-UZ). En el caso de aquellos animales que habían sido tratados fuera del HV-UZ, ya fuera en otro hospital o en clínica ambulante, fue necesario contactar con los veterinarios responsables para solicitar la información sobre dichos casos. La **encuesta estandarizada** para el seguimiento de los animales, realizada a los veterinarios responsables, englobaba, entre otras, preguntas acerca de la disciplina deportiva del caballo, nivel previo competitivo, así como si el caballo retorna o no a su nivel anterior de trabajo.

3.4- OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS CELULARES Y ACELULARES PARA MEDICINA REGENERATIVA.

Aunque no ha sido objeto de este trabajo la realización de estas tareas, puesto que se trata de un estudio retrospectivo en el que se han revisado casos antiguos, nos parece relevante hacer una breve mención a la forma de obtención tanto de MSCs como de PRP y sobrenadante de médula ósea.

3.4.1 OBTENCIÓN, CULTIVO, Y CARACTERIZACIÓN DE MSCs.

Las muestras biológicas a partir de las cuales se aislaron MSCs en este estudio fueron: aspirados de médula ósea del esternón, y tejido adiposo subcutáneo del área supragluteal cercana a la cola del caballo. Tras ser aisladas (por gradiente de centrifugación y digestión con colagenasa tipo I respectivamente), las células fueron lavadas con PBS y se sembraron en medio de cultivo estéril. Se realizaron lavados, a las 24 horas, 48 horas y 72 horas con PBS, y se les cambió el medio con el objetivo de dejar en cultivo sólo a las células adherentes. Posteriormente, se cambió el medio dos veces a la semana. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta que las células se hallaron cercanas

a un 80%-90% de confluencia, es decir, cuando el 80% -90% de la superficie de la placa de cultivo estaba ocupada por células. En este momento las células fueron tratadas con tripsina para romper las adherencias a la placa de cultivo, se lavaron y se contaron manualmente las células viables con una cámara de Neubauer y la tinción vital azul de Trypan. Seguidamente, las células se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm². A este proceso de tratamiento con tripsina y resiembra, cuando las células alcanzan alta confluencia, se le denomina pase. Cuando las células llegaron al tercer pase se conservaron congeladas en un medio consistente en 90% de suero fetal bovino (FBS) y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector (Ranera et al, 2011)

La caracterización de las células se realizó en pase 3 por el análisis de los marcadores de superficie positivos (CD29, CD90, CD105, CD73 y CD44) y negativos (, CD34 y CD45) por citometría de flujo y RT-qPCR. Para llevar a cabo la diferenciación osteogénica, condrogénica o adipogénica, las MSC fueron cultivadas en diferentes medios, y con diferente suplementación. Para valorar y cuantificar la diferenciación de las MSCs, se llevaron a cabo tinciones específicas para los diferentes linajes.

3.4.2. OBTENCIÓN DE PRODUCTOS ACELULARES. PRP y SOBRENADANTE DE MÉDULA ÓSEA.

El **concentrado autólogo de plasma rico en plaquetas**, se obtiene a partir de sangre entera periférica siguiendo el método de doble tubo de centrifugación (Arguelles et al. 2006). Se recogen 80 ml de la vena yugular de cada caballo empleando un catéter de mariposa de 23G. La sangre se deposita en tubos con citrato sódico al 3,8%, y se centrifuga a 120g durante 5 minutos. A continuación se recoge el plasma que queda sobre la capa leucocitaria, y se deposita en tubos de polipropileno de 10ml que vuelven a centrifugarse una vez más a 240g durante 5 minutos. La fracción de sobrenadante se recoge en jeringuillas y se infiltra intralesionalmente.

Para obtener el **sobrenante de médula ósea** se realiza una aspiración aséptica a nivel del esternón (3^a-5^a esternebra), o hueso ilíaco utilizando una aguja de biopsia medular tipo Jamshidi de 11G (Adams et al., 2012). El área a incidir es anestesiada localmente, y la médula es recogida en jeringuillas de 20ml precargadas con 2 ml de heparina sódica (10.00 UI/jeringuilla). El aspirado es inmediatamente centrifugado a 1700-1800 rpm durante 10 minutos para conseguir, por un lado, en la parte inferior un concentrado de médula ósea (BMC), que contiene mayores cantidades de células madre y de plaquetas que el aspirado de médula ósea en bruto, y en la parte superior el sobrenadante de M.O. El BMC puede utilizarse para tratamientos intralesionales y el sobrenadante se puede infiltrar directamente o utilizar, como en el caso del presente estudio, para vehicular MSCs en la infiltración de las lesiones pertinentes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OBTENCIÓN DE PRODUCTOS PARA MEDICINA REGENERATIVA

Pese a tratarse de un estudio retrospectivo, y no haber sido objeto directo del presente trabajo la obtención de estos productos, cabe mencionar que de todos los caballos incluidos, se lograron los siguientes resultados generales:

- Obtener PRP/ sobrenadante de médula ósea.
- Aislar células madre mesenquimales a partir de médula ósea o grasa.
- Cultivar y expandir durante al menos cuatro pases dichas células madre.
- Caracterizar las células empleadas como MSCs mediante diferenciación a osteoblastos, condrocitos o adipocitos y estudio de la expresión de los marcadores típicos.

El patrón de proliferación celular, así como el de expresión de marcadores de superficie y el potencial de diferenciación de las MSCs empleadas fueron similares a los descritos previamente (Ranera et al., 2011).

4.2 CREACIÓN DE LA BASE DE DATOS

En función de los criterios de inclusión/exclusión anteriormente citados en material y métodos, se han excluido del estudio **4 pacientes** tratados con MSCs debido a la falta de información de algunos de los campos considerados como esenciales: reseña, registros médicos acerca del tratamiento, o evolución clínica. Además, otros caballos para los que se han cultivado células en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, directamente no fueron objeto de estudio, porque ha sido imposible contactar con el propietario/veterinario responsable, porque pertenecían a otros estudios, o porque se trataba de los primeros casos de los que apenas había documentación recopilada.

De un **40%** de los casos incluidos en el estudio se han podido completar **todos los campos** de información. Mientras que del **60%**, ha quedado **incompleto** alguno de los campos no esenciales, principalmente la cantidad de células infiltradas y la evolución radiológica. Esto es debido a la pérdida de cierta información de casos antiguos por un lado, y a la falta de un seguimiento radiológico seriado por otro. Se han considerado incompletos aquellos casos de los que no hay suficientes radiografías, o de los que aun teniéndolas, no sirven para evaluar la progresión o estabilización de lesiones, difícilmente valorables únicamente por radiología.

4.3 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA SOBRE LOS ANIMALES.

La información recopilada a cerca de la reseña de los animales (sexo, edad, raza, disciplina, y tipo de lesión), queda representada en la Tabla 1 del Anexo I.

Pese a ser 15 los caballos incluidos en el estudio, son 19 las lesiones tratadas con medicina regenerativa, y han sido estudiadas como elementos aislados en cuanto a tipo y número de infiltraciones así como mejoría por imagen, puesto que 4 de los caballos tenían dos lesiones que fueron tratadas independientemente. No obstante, a la hora de valorar la mejoría clínica, hablaremos de caballo como “individuo”, englobando todas sus lesiones.

De las 19 lesiones sobre las que se realiza el estudio, cinco eran articulares, siete ligamentosas, y siete tendinosas. Los porcentajes quedan representados en la Figura 3.

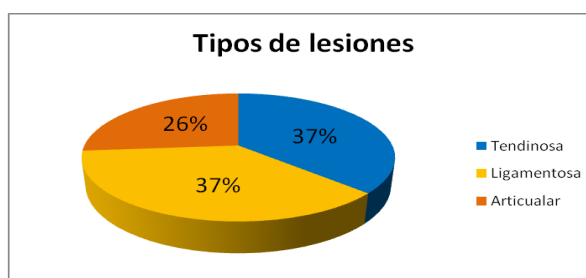


Figura 3. Porcentajes según tipo de lesión.

Del total de lesiones tratadas con MSCs, la estructura en la que más se ha empleado esta terapia ha sido el tendón flexor digital superficial (TFDS). Un 26,32% del total de lesiones tratadas (5 de 19) fueron del TFDS. Este resultado se relaciona con revisiones bibliográficas previas (Thorpe, CT 2010) en el que afirma que las lesiones de tendón son la causa más frecuente de disminución del rendimiento del caballo y aparecen en todas las disciplinas. El riesgo de padecer este tipo de patologías aumenta con la edad y algunos estudios han reportado incluso un mayor riesgo si se trata de machos enteros. Dentro de las tendinopatías, la mayoría ocurren en el TFDS, con un marcado predominio de las extremidades anteriores.

Al analizar las lesiones tratadas en el estudio en función de la disciplina a la que se dedicaban los caballos, se obtienen los siguientes resultados:

- El 75% de las lesiones en **caballos de carreras** incluidos en el estudio, son debidas a problemas en el ligamento suspensor del menudillo (LSM). Según lo descrito por otros autores (Murray et al., 2006), las lesiones típicas en los caballos de carreras afectan principalmente al carpo, la pelvis, y la región dorsolumbar, además hacen alusión a la alta prevalencia de lesiones a nivel del LSM y de la articulación interfalangeana distal.

- En el caso de los caballos que se dedicaban a **doma clásica**, un 50% presentaban lesiones articulares, de las cuales la mitad se encontraron en el tarso. Un 25% de estos caballos presentaban lesiones en el LSM. Estos datos son similares a los publicados por Murray et al., 2006, quienes describen que los caballos de doma clásica presentan principalmente lesiones del LSM en la extremidad posterior, seguidas de lesiones a nivel del tarso (Murray et al., 2006).
- El 50% de las lesiones dentro del grupo de **caballos se salto** fueron a nivel del TFDS, y el 25% del TFDP. Estos resultados coinciden con lo publicado en otros estudios acerca del alto riesgo que presentan los caballos de salto de élite de padecer este tipo de tendinopatías en las extremidades anteriores (Thorpe, CT. 2010).

Pese al tamaño reducido de la muestra estudiada, y a que solo se han incluido aquellas lesiones tratadas con MSCs aunque los caballos presentaran más lesiones del locomotor, puede observarse que **el tipo de lesiones tratadas en función de la disciplina muestra una tendencia similar a la publicada en otros estudios**.

4.4 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA SOBRE LOS TRATAMIENTOS

4.4.1. TRATAMIENTOS PREVIOS.

La mayoría de los animales del estudio, un 73.3% (11 de 15), recibieron algún tipo de tratamiento, de los considerados como convencionales (Fortier, L. 2009), antes de emplearse la medicina regenerativa: AINES, cortico-esteroides, ácido hialurónico, vendajes, reposo, etc.

En general, la farmacoterapia solo actúa de manera sintomática e incluso algunas de las sustancias empleadas podrían agravar las lesiones presentes mediante la inhibición de la síntesis de matriz cartilaginosa, de moléculas (ej. prostaglandinas), o de expresión de genes clave (ej. ciclooxigenasa) (Carmona & López, 2011). Pese a ello, estos suelen ser los tratamientos de primera elección, mientras que se tiende a reservar la terapia regenerativa como segunda opción si los tratamientos convencionales fallan. Lo hace que en ocasiones la efectividad la medicina regenerativa, se vea limitada al emplearla en lesiones ya avanzadas, y muy difíciles de recuperar (Arias & Beato, 2013)

Tan solo 4 de los 15 casos fueron tratados con medicina regenerativa como primera elección, sin embargo este número es más alto de lo que cabría esperar en otros centros veterinarios. Los casos en que se utilizaron MSCs como primera elección se debieron principalmente a que en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza se intentó impulsar el empleo de estas terapias para promover su estudio, facilitando para ello el acceso de estos tratamientos a los propietarios.

El **momento óptimo de tratamiento** con MSCs es también un tema que despierta gran interés de cara al empleo de la medicina regenerativa como primera elección. Estudios realizados en diferentes especies afirman que se han obtenido mejores resultados cuando las MSCs son administradas una semana después de la inducción de la lesión, que cuando se infiltran una hora o un mes post inducción de la lesión. Parece que el momento ideal sería cuando la inflamación es moderada en comparación con la originada a continuación de la lesión, y la formación de tejido cicatricial es aún reducida (Koch et al., 2009).

4.4.2. NÚMERO DE INFILTRACIONES Y TIPO DE TRATAMIENTOS:

Las lesiones incluidas en el estudio recibieron un máximo de 5 tratamientos con medicina regenerativa, los cuales quedan agrupados en las siguientes categorías:

- PRP / Sobrenadante de M.O.
- MSCs Autólogas
- MSCs Alogénicas
- PRP / Sobrenadante M.O. + MSCs autólogas/alogénicas

Estos datos se recogen en la Tabla 1 del Anexo 2, en la que aparece representado el tipo de tratamiento recibido en cada lesión, así como el número de infiltraciones. Partiendo de la suma de los tratamientos administrados en el total de animales y lesiones (51), hemos obtenido los porcentajes de cada tipo de tratamiento de forma independiente.

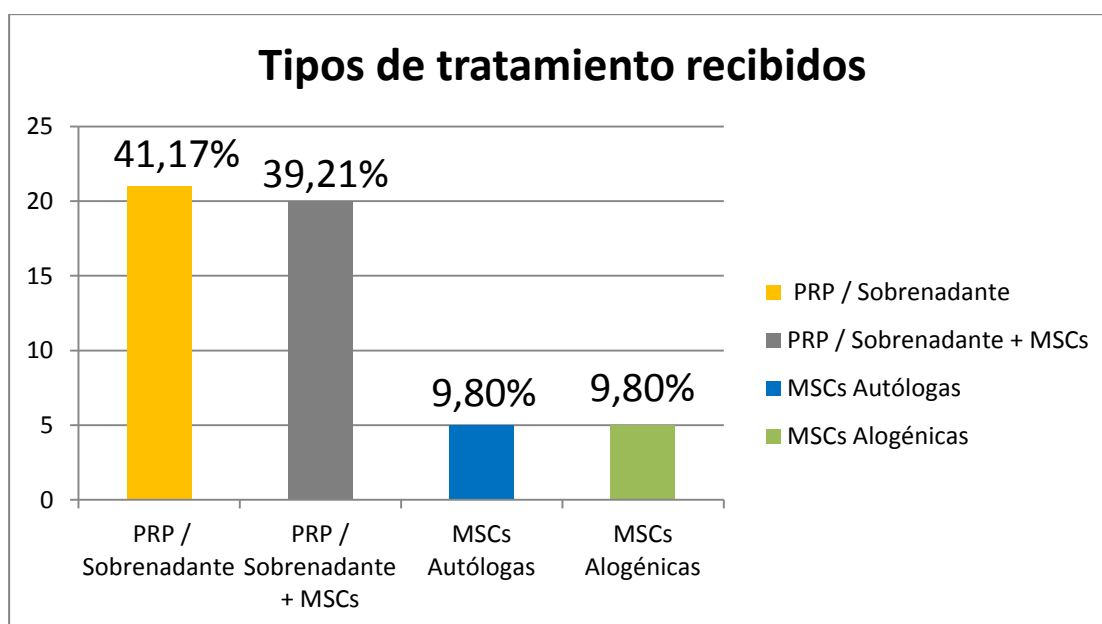


Figura 4. Tipos de tratamiento recibidos

Al tratarse de un **estudio retrospectivo** no pueden fijarse las condiciones en las que se ha llevado a cabo, ni las pautas terapéuticas a seguir. En el HVUZ a lo largo de los años se han empleado diversos protocolos de actuación, en función tanto del tipo de lesión y del presupuesto del propietario, como de los resultados que se iban publicando.

A menudo el tratamiento de células madre se combina con otros factores biológicos, tales como sobrenadante de médula ósea, suero autólogo, o plasma rico en plaquetas, lo que dificulta el determinar la **eficacia de estos tratamientos** (Koch et al., 2009). Por ello, la tendencia durante los últimos años en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, ha sido a infiltrar las MSCs re-suspendidas en ringer lactato (RL) en lugar de en otros productos acelulares con la finalidad de comprobar el efecto intrínseco de las mismas.

Estudios publicados recientemente (Broeckx et al., 2014) afirman que en caballos con **enfermedad articular degenerativa**, el **uso combinado de PRP y MSCs** mejoró significativamente la funcionalidad y la sostenibilidad de las articulaciones dañadas en caballos con cojera leve o moderada, en comparación con el tratamiento PRP o MSCs por separado. Estos resultados difieren de los obtenidos en estudios previos de lesiones tendinosas, en las que la adición de PRP autólogo a las MSCs no incrementaba el efecto regenerativo. Nuevos estudios necesitan ser llevados a cabo para determinar si el uso de **BM-MSc es más o menos eficaz que el uso de PRP** para el tratamiento de la **tendinitis** o si sus efectos son aditivos si se utiliza de forma simultánea (Schnabel et al., 2013).

Aunque el porcentaje de infiltraciones realizadas con MSCs autólogas y alogénicas sin productos acelulares es el mismo (9,80%), cabe destacar que dentro del grupo de tratamiento mayoritario, **PRP/Sobrenadante MO + MSC**, algunos casos fueron tratados con **MSC autólogas** y otros con **alogénicas**. Analizando únicamente los tratamientos con MSCs, independientemente del vehiculante empleado, obtenemos los siguientes resultados: del total de 29 infiltraciones con MSCs, un **70%** se realizaron con **MSCs autólogas**, mientras que un **30%** fueron con **MSCs alogénicas**. Puede observarse una inclinación hacia el empleo de MSCs autólogas, ya que cuando el grupo LAGENBIO empezó a cultivar MSCs para uso terapéutico, se sabía muy poco sobre el efecto de las procedentes de un caballo donante. A día de hoy, clínica e histológicamente no se observan reacciones adversas, ni hay un aumento de células inflamatorias en las lesiones que son tratadas con MSCs alogénicas frente a las autólogas (Koch et al., 2009), por lo que se tiende a **emplear las MSCs alogénicas**. Este enfoque nos brinda ciertas **ventajas**: las MSCs se pueden criopreservar hasta el momento en que se precisan, se puede tratar a muchos animales con un único donante (ya que mantienen la capacidad de auto-renovación durante varios pases), y su uso evita esperar el pertinente mes de cultivo que se necesita en el caso de las MSC autólogas.

Sin embargo, todavía existen puntos a clarificar en el uso de MSCs alogénicas, como la posibilidad de que sean reconocidas por el sistema inmune del receptor y se genere una respuesta adversa (Ankrum et al., 2014). Por otro lado, deben contemplarse los riesgos que presenta el caballo receptor de contraer enfermedades infecciosas, o latentes crónicas, que no han sido estudiadas en las actuales publicaciones (Consentius et al., 2015).

4.4.3. TIPO DE TRATAMIENTO EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE INFILTRACIÓN:

Un **40%** de los casos tratados recibieron **más de una dosis MSCs**, pero en un **46,60%** de los casos no se emplearon MSCs en la **primera infiltración**, si no que antes se administraron productos acelulares como PRP o sobrenadante de MO.

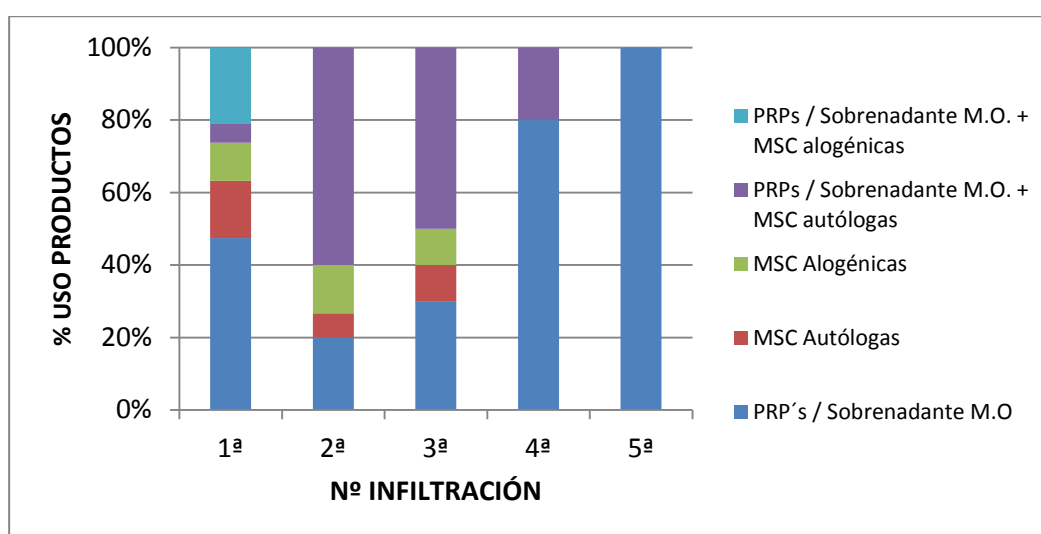


Figura 5. Tipos de tratamiento en función del número de infiltración.

En la figura 5 aparecen representados los tipos de tratamiento en función del número de infiltración registrados en el presente estudio.

- En la primera infiltración casi un 50% de las infiltraciones se realizaron con productos acelulares. Seguido de MSCs alogénicas resuspendidas en PRP o sobrenadante de M.O.
- En la segunda y tercera infiltración, sin embargo es la combinación de MSCs autólogas + PRP/ Sobrenadante de M.O la que predomina.
- En la cuarta y quinta infiltración aparece un marcado predominio de nuevo de productos acelulares, aunque a estos tiempos sólo son 5 las lesiones que reciben tratamiento.

Los resultados del estudio coinciden con las pautas recomendadas (Schnabel et al., 2013), en las que describen como primer tratamiento el empleo de productos acelulares (PRP/ sobrenadante de MO), o MSCs alogénicas y en las posteriores infiltraciones se comienzan a emplear MSCs autólogas cultivadas.

4.4.4. CANTIDAD DE MSCs INFILTRADAS:

No ha sido posible recopilar la información acerca de la dosis celular administrada en todos los casos incluidos en este estudio, dado que algunos casos son antiguos y no se ha podido recuperar parte de la información.

Sin embargo, en base a aquellos casos de los que sí se tiene este dato, se observa que las cantidades usadas en cada infiltración oscilan entre los **20 y los 70 millones** de MSCs. Las dosis usadas han ido **decreciendo** a lo largo del tiempo y se ha visto que al principio se empleaban cantidades celulares muy superiores a lo recomendado en estudios recientes (Schnabel, Fortier, McIlwraith, & Nobert, 2013) aunque el **número óptimo de células madre** para el tratamiento de lesiones locomotoras está todavía por determinarse. Es probable que exista un **rango** dentro del cual el número de células madre sea más **efectivo**, pero se necesitan estudios de “dosis-respuesta” para poder determinar este rango (Schnabel et al., 2013)

4.5 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA SOBRE LA EVOLUCIÓN

4.5.1. EVOLUCIÓN RADIOLÓGICA.

La radiografía ha sido la herramienta utilizada para analizar la evolución de aquellos casos con lesiones articulares. En este tipo de lesiones no cabe esperar una mejoría radiológica, si no una **estabilización en el tiempo** de la progresión de la patología, siendo esto lo en este trabajo se considera como una **evolución favorable**.

De las 5 lesiones articulares del estudio tratadas con medicina regenerativa, solo se ha podido valorar la evolución radiológica en dos de ellas. En ambos casos la evolución fue favorable, es decir, no hubo progresión de la patología y la imagen radiológica se conservó entre los tiempos evaluados. En el resto de animales no pudo analizarse la evolución radiológica, bien porque las radiografías disponibles estaban muy espaciadas en el tiempo, o bien porque se trataba de patologías de la articulación interfalangiana distal, estructura que sufre cambios remodelativos óseos muy discretos, y por tanto no se puede valorar por radiología (Stashak, 2004). Para estos casos, se ha empleado como criterio de progresión únicamente la evolución clínica.

Pese a que se han hecho avances en el diagnóstico, tratamiento y reparación de las lesiones articulares, estas todavía tienen en general, unas posibilidades de éxito limitadas (Ferris et al., 2014).

4.5.2 EVOLUCIÓN ECOGRÁFICA.

Los resultados ecográficos obtenidos tras la infiltración de MSCs en este estudio, muestran que de los casos tratados con medicina regenerativa, y de los que ha podido recopilarse y valorarse ecografías tanto pre como post infiltración, el **100%** han **evolucionado favorablemente**.

En este estudio el parámetro ecográfico más precoz que revela mejoría, es la ecogenicidad, seguido de la disminución del área de lesión y en último lugar el alineamiento de fibras. Otras publicaciones (Pacini, S. 2007) ya revelaron que en la evaluación ecográfica de caballos con lesiones naturales en el TFDS, se apreciaba un mayor alineamiento de fibras en los caballos tratados con MSC, en comparación con el grupo control.

4.5.3. EVOLUCIÓN CLÍNICA.

Al haber en el estudio caballos que presentaban **varias lesiones**, estas han sido estudiadas como elementos independientes para algunos parámetros, pero en el caso de la **evolución clínica**, esta debe hacerse del caballo **“en su conjunto”**. Por ello, se han dado situaciones en las que clínicamente el caballo no mejoró tras el tratamiento, pese a que una de sus lesiones sí lo hiciera de forma independiente. O bien, que aunque las lesiones tratadas con medicina regenerativa mejorasen, el caballo presentara otras lesiones no contempladas en el estudio, o no se siguieran correctamente las pautas de rehabilitación, produciendo una recaída, y por tanto no lograra recuperar su nivel previo de trabajo.

De los 15 caballos incluidos en este retrospectivo, tras recibir un tratamiento individualizado en función de su lesión, evolución en el tiempo y administración de tantas infiltraciones como se consideró conveniente, la mejoría clínica (que se manifiesta como retorno al trabajo tras el periodo de rehabilitación pertinente), queda representada en la siguiente gráfica (Figura 6).

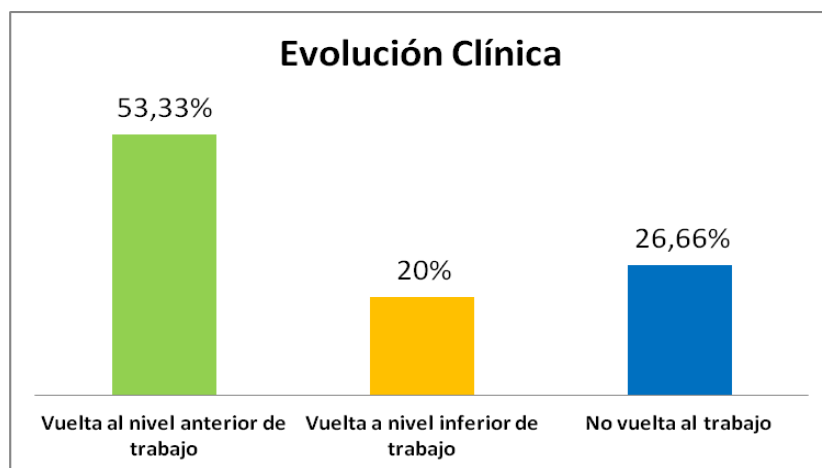


Figura 6. Evolución clínica de los

Los resultados obtenidos muestran que aproximadamente la mitad de los caballos tratados con MSCs recuperan su nivel anterior de trabajo (**53,33%**), de forma similar a los resultados aportados por Ferris et al., 2014, sobre un estudio llevado a cabo con 33 caballos con lesiones femorotibiales tratados con cirugía y posterior administración de BM-MSC autólogas. En los resultados que obtuvieron, el **43% de los caballos volvieron al nivel anterior de trabajo**, el 33% volvió al trabajo, y el 24% no pudo volver a trabajar. Sin embargo, en dicho estudio solo se contemplan lesiones articulares.

Otro estudio realizado por Pacini et al., 2007 que solo incluye patologías tendinosas (tendinitis del TFDS de origen natural en caballos de carreras) tratadas con BM-MSCs, demostró que el **82% de los caballos tratados volvieron a la competición** sin sufrir recidivas en los dos años siguientes al tratamiento, mientras que la totalidad del grupo control (tratados por métodos convencionales) sufrió una recidiva durante el primer año post tratamiento, habiéndose empleado en ambos grupos el mismo protocolo de rehabilitación. En el 2008 Smith publicó un trabajo donde evaluó el tratamiento con MSCs autólogas en 168 caballos de deporte con lesión en el **TFDS**. Tras 48 semanas de rehabilitación, los caballos retornaron a su entrenamiento habitual. De los caballos que se introdujeron a un entrenamiento continuo **solo recayó el 18% de los tratados con MSCs frente a un 56% reportado con terapias convencionales** (Smith, 2008).

En el presente trabajo, en el que se han incluido tanto lesiones tendinosas y ligamentosas como articulares, se ha obtenido un mayor porcentaje de caballos que volvieron al nivel anterior de trabajo que en el estudio de Ferris et al., 2014, pero menor que el reportado por Pacini et al., 2007. Los reducidos tamaños muestrales, la variabilidad de lesiones y tratamientos, así como la dificultad de seguimiento, hacen que sea difícil extrapolar los resultados, sin embargo, los porcentajes de evolución clínica obtenidos en este trabajo no distan mucho de los previamente descritos.

Debe hacerse hincapié en que el criterio de retorno al nivel de trabajo anterior, no siempre se cumple aunque la evolución de un caballo después del tratamiento sea muy buena. Es el caso de algunos de los ejemplares que no volvieron al mismo nivel de rendimiento por tratarse de **caballos de élite** dedicados a salto, doma o carreras, **que necesitan estar recuperados al 100% para recuperar su actividad**. Aunque la mejoría en estos caballos fuese tangible, para volver al nivel previo de trabajo no pueden presentar ninguna secuela de la lesión, lo cual actualmente todavía no se ha logrado. Además, durante el reposo y rehabilitación los caballos pierden unos niveles de entrenamiento en ocasiones irrecuperables. En contraposición a esto, no todos los caballos competían o hacían un trabajo intenso, en algunos casos solo se trató de mejorar la calidad de vida en caballos retirados con lesiones.

Merece la pena remarcar tres casos tratados con medicina regenerativa, que fueron diagnosticados como **lesiones catastróficas**, y en los que se logró una evolución muy favorable:

- Infosura crónica con grave afección del crecimiento del casco en un caballo de paseo.
- Rotura del ligamento colateral lateral de la articulación metatarso-falángica de la extremidad posterior derecha y subluxación de dicha articulación con cambios degenerativos por inestabilidad articular en un caballo dedicado a rejoneo.
- Rotura del LSM de la extremidad posterior izquierda en un caballo dedicado a doma clásica.

Tras el tratamiento con MSCs y las terapias de rehabilitación, se logró que los 2 casos que presentaban rotura de ligamento recuperasen el exigente nivel anterior de trabajo. En el caballo con infosura crónica, el herraje terapéutico fue clave en su evolución, y las MSCs pudieron actuar como coadyuvantes en su recuperación. Pese a que el caballo no pueda realizar un gran trabajo en la actualidad, la gravedad de la infosura que padecía podría haber hecho necesaria la eutanasia humanitaria.

4.6 EFECTOS ADVERSOS

Los posibles efectos adversos a considerar incluyen, además de una respuesta inflamatoria exagerada, el desarrollo de tejido celular aberrante, la contaminación con agentes infecciosos o sustancias biológicas, y la transmisión de enfermedades infecciosas. Todo ello es de especial interés si se están utilizando células alogénicas. (Koch et al., 2009)

Tras la inoculación de MSCs, independientemente de su origen, se produce una reacción inflamatoria transitoria que se normaliza sin necesidad de tratamiento. Esta inflamación es difícilmente detectable a nivel clínico, pero muy marcada en los parámetros laboratoriales. Estudios recientes afirman que las MSCs autólogas producen un pico de inflamación a las 24 horas, incluso mayor que las MSC alogénicas (Pigott et al., 2013).

En el presente estudio, **no se observaron efectos deletéreos de ningún tipo, en ninguno de los casos**. La **seguridad** a corto plazo, y sobre todo a largo plazo, **de las células madre es en gran parte desconocida**. Hasta la fecha, no ha habido ningún informe de reacciones adversas significativas. Sin embargo, esto podría ser debido al sesgo de notificación (Koch et al., 2009).

5. CONCLUSIONES

Tras la realización del presente Trabajo Fin de Grado, las conclusiones obtenidas en las condiciones de este estudio son las siguientes:

1. Las patologías de tejidos blandos del aparato locomotor en la especie equina son las más frecuentemente tratadas con medicina regenerativa, principalmente con MSCs autólogas acompañadas o no por productos acelulares. En la mayoría de casos, la medicina regenerativa no se emplea como primera opción de tratamiento.
2. La ecografía es una técnica útil para valorar la evolución de los problemas de tejidos blandos tratados con MSCs, mostrando mejoría en la totalidad de lesiones. Sin embargo, la radiología presenta limitaciones para evaluar la evolución de las patologías articulares tratadas con MSCs.
3. La evolución clínica es una herramienta útil en este estudio, revelando un porcentaje de retorno a la actividad anterior a la lesión en los casos tratados con MSCs similar a lo descrito en otros estudios.
4. No hay efectos adversos significativos tras la administración de MSCs en patologías musculoesqueléticas equinas.
5. La medicina regenerativa basada en MSCs tiene un gran potencial en el tratamiento de patologías musculoesqueléticas equinas, pero es necesario clarificar diversos aspectos. Por ello, la comunicación de los resultados obtenidos tras su utilización mediante estudios retrospectivos tiene un papel fundamental.

6. CONCLUSIONS

The conclusions of this work are based on the results obtained in the conditions of the present study:

1. Equine muskulo-eskeletal soft tissue injuries are the most frequently treated by regenerative medicine, mainly using autologous MSCs including or not acellular products. In general, the regenerative medicine is not used as first treatment option.
2. Ultrasonography is a useful method to evaluate the MSC-treated soft tissue pathologies evolution, showing improvement in all injuries. However, radiology presents handicaps for assessing the evolution of the MSC-treated joint diseases.
3. The clinical course is an important tool in this study, showing a percentage of return to previous activity in MSC-treated horses similar to those reported in other researches.
4. Significant adverse effects are not observed after the MSC administration in equine muskulo-eskeletal pathologies.
5. MSC-based regenerative medicine has a great potential for the treatment of equine muskulo-eskeletal injuries, but several issues need to be clarified. Thus, communicating the results obtained with MSC treatments through retrospective studies is essential.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Con la elaboración del presente trabajo me he enriquecido de conocimientos que no habían sido abordados a lo largo de la carrera. Me he iniciado en el estudio de la medicina regenerativa, y he conocido cuales son las nuevas terapias empleadas para abordar los problemas locomotores en el mundo del caballo, al margen de los tratamientos convencionales.

Ha supuesto un desafío personal ya que nunca me había enfrentado a un estudio real de este tipo, con tantos datos para recopilar, organizar, analizar y sacar conclusiones. Con él he aprendido a familiarizarme con la búsqueda de artículos científicos, con la lectura en inglés, y con el empleo de bases de datos. He sido consciente del complicado mundo de la investigación, de la importancia de evidenciar los resultados, y del constante avance de las ciencias veterinarias.

Me gustaría agradecer a los profesores que han tutorizado este trabajo Laura Barrachina y Antonio Romero su colaboración, ya que fueron ellos quienes me propusieron el planteamiento y me han ayudado a tomar decisiones y dar forma al trabajo conforme íbamos avanzando en el estudio.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M., Goodrich, L., Rao, S., Olea-Popelka, F., Phillips, N., Kisiday, J., et al. (2013). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: Are there differences? *Equine Veterinary Journal*, 45(3), 372-375.

Ankrum, J. A., Ong, J. F., & Karp, J. M. (2014). Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*, 32(3), 252-260.

Argüelles, D., Carmona, J., Pastor, J., Iborra, A., Viñals, L., Martínez, P., et al. (2006a). Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Research in Veterinary Science*, 81(2), 237-245.

Arias, J. I., & Beato, C. (2013). Terapia regenerativa en tendones y células madres en medicina equina. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 28(2), Pág. 49-57.

Broeckx, S., Zimmerman, M., Crocetti, S., Suls, M., Mariën, T., Ferguson, S. J., et al. (2014). Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: A preliminary study.

Carmona, J., & López, C. (2011). Tendinopatía del tendón flexor digital superficial y desmopatía del ligamento suspensorio en caballos: Fisiopatología y terapias regenerativas. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 43(3), 203-214.

Chen, F. H., & Tuan, R. S. (2008). Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther*, 10(5), 223.

Consentius, C., Reinke, P., & Volk, H. (2015). Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: What has been seen in vitro and in vivo? *Regenerative Medicine*, 10(3), 305-315.

Ferris, D. J., Frisbie, D. D., Kisiday, J. D., McIlwraith, C. W., Hague, B. A., Major, M. D., et al. (2014). Clinical outcome after Intra-Articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Veterinary Surgery*, 43(3), 255-265.

Fortier, L. (2009). Current concepts in joint therapy. *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association. Guarujá (Brazil)*,

Fortier, L. (2012). Making progress in the what, when and where of regenerative medicine for our equine patients. *Equine Veterinary Journal*, 44(5), 511-512.

Frisbie, D. D., Kisiday, J. D., Kawcak, C. E., Werpy, N. M., & McIlwraith, C. W. (2009). Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(12), 1675-1680.

Frisbie, D., & Smith, R. (2010). Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal*, 42(1), 86-89.

Godwin, E., Young, N., Dudhia, J., Beamish, I., & Smith, R. (2012). Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*, 44(1), 25-32.

Halper, J., Kim, B., Khan, A., Yoon, J. H., & Mueller, P. O. (2006). Degenerative suspensory ligament desmitis as a systemic disorder characterized by proteoglycan accumulation. *BMC Veterinary Research*, 2, 12.

Hatsushika, D., Muneta, T., Nakamura, T., Horie, M., Koga, H., Nakagawa, Y., et al. (2014). Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(7), 941-950.

Koch, T. G., Berg, L. C., & Betts, D. H. (2009). Current and future regenerative medicine - principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Veterinaire Canadienne*, 50(2), 155-165.

Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 21(2), 216-225.

Murray, R., Dyson, S., Tranquille, C., & Adams, V. (2006). Association of type of sport and performance level with anatomical site of orthopaedic injury diagnosis. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 411-416.

Pacini, S., Spinabella, S., Trombi, L., Fazzi, R., Galimberti, S., Dini, F., et al. (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Engineering*, 13(12), 2949-2955.

Pigott, J., Ishihara, A., Wellman, M., Russell, D., & Bertone, A. (2013). Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 26(6), 453-460.

Poole, R., Blake, S., Buschmann, M., Goldring, S., Laverty, S., Lockwood, S., et al. (2010). Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, S10-S16.

Prockop, D. (2007). "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(3), 241-243.

Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vázquez, F. J., Remacha, A. R., Bernal, M. L., et al. (2011). Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of

mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(1), 147-154.

Rodríguez Pardo, V. M. (2005). Células madre: Conceptos generales y perspectivas de investigación. *Universitas Scientiarum*, 10(1), 5-14.

Schlueter, A. E., & Orth, M. W. (2004). Equine osteoarthritis: A brief review of the disease and its causes. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 1(04), 221-231.

Schnabel, L. V., Fortier, L. A., McIlwraith, C. W., & Nobert, K. M. (2013). Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *The Veterinary Journal*, 197(3), 570-577.

Schnabel, L. V., Pezzanite, L. M., Antczak, D. F., Felipe, M., & Fortier, L. A. (2014). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Res Ther*, 5(1), 13.

Smith, R., Korda, M., Blunn, G., & Goodship, A. (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal*, 35(1), 99-102.

Stashak, T. S. (2004). *Adams: Claudicación en el caballo* Inter-Médica.

Stewart, M. C., & Stewart, A. A. (2011). Mesenchymal stem cells: Characteristics, sources, and mechanisms of action. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27(2), 243-261.

Thorpe, C., Clegg, P., & Birch, H. (2010). A review of tendon injury: Why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine Veterinary Journal*, 42(2), 174-180.

Vázquez, F., Romero, A., & Rodellar, C. (2012). Medicina regenerativa: Aplicación en la clínica equina. *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias*, 6(2), 38-47.

Vidal, M. A., Robinson, S. O., Lopez, M. J., Paulsen, D. B., Borkhsenius, O., Johnson, J. R., et al. (2008). Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Surgery*, 37(8), 713-724.

Weil, B. R., Manukyan, M. C., Herrmann, J. L., Abarbanell, A. M., Poynter, J. A., Wang, Y., et al. (2011). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: Implications for surgical disease. *Journal of Surgical Research*, 167(1), 78-86.

ANEXOS

ANEXO I. Información sobre los animales.

Reseña					
CABALLO	SEXO	RAZA	EDAD	DISCIPLINA	LESIÓN
CABALLO 1	Macho entero	PRE	14	Doma clásica	TFDS de la EAD
CABALLO 2	Hembra	KWPN	7	Salto	TFDS de la EAD
CABALLO 3	Macho castrado	Cruzado	11	Doma	LSM de la EPD
CABALLO 4	Macho castrado	PRE	7	Doma clásica	LSM de la EPI
CABALLO 5	Macho castrado	Hanoveriano	14	Salto	Tenosinovitis de la vaina y TFDP de la EPD
CABALLO 6	hembra	CDE	5	Salto	TFDS de la EAI
CABALLO 7	Macho entero	CDE	14	Semental/ paseo	TFDS de la EAI
CABALLO 8	Macho castrado	PSI	3	Carreras	TFDS de la EAD y LSM de la EAI
CABALLO 9	Macho castrado	PSI	3	Carreras	LSM y rama lateral EAI, y cuerpo del LMS en la EAD
CABALLO 10	Macho castrado	Cruce	6	Paseo	Artrosis de las articulaciones interfalangiánas de la EAI asociadas a infosura crónica
CABALLO 11	Macho castrado	Lusitano	12	Rejoneo	Rotura del ligamento colateral lateral del menudillo EPD y subluxación de la articulación.
CABALLO 12	Macho castrado	KWPN	14	Doma clásica	Articulación interfalangiánas distal y ligamento colateral lateral de la EAD.
CABALLO 13	Macho Entero	PRE	3	Doma clásica	Articulación tarsocrural EPD
CABALLO 14	Macho entero	CDE	9	Doma clásica	Articulación interfalangiánas distal EPD
CABALLO 15	Macho entero	Trakenen	19	Doma clásica	Articulación tarsocrural

ANEXO 2. Número y tipo de tratamiento administrado por lesión.

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
LESION 1					
LESION 2					
LESION 3					
LESION 4					
LESION 5					
LESION 6					
LESION 7					
LESION 8					
LESION 9					
LESION 10					
LESION 11					
LESION 12					
LESION 13					
LESION 14					
LESION 15					
LESION 16					
LESION 17					
LESION 18					
LESION 19					

	PRP's / Sobrenadante M.O		PRPs / Sobrenadante M.O. + MSC Autólogas
	MSC Autólogas		PRPs / Sobrenadante M.O. + MSC Alogénicas
	MSC Alogénicas		
	PRPs / Sobrenadante M.O. + MSC		