

Antonio Romero Lasheras

Tratamiento de las tendinitis
inducidas en caballos: estudio
comparativo entre plasma rico en
plaquetas (PRP) y células madre
mesenquimales (MSCS)

Departamento
Patología Animal

Director/es
Rodellar Penella, Clementina
Gascón Pérez, Faustino Manuel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

TRATAMIENTO DE LAS TENDINITIS INDUCIDAS EN CABALLOS: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCS)

Antonio Romero Lasheras

Director/es

Rodellar Penella, Clementina

Gascón Pérez, Faustino Manuel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Patología Animal

2016



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

- Tesis Doctoral -

TRATAMIENTO DE LAS TENDINITIS INDUCIDAS EN CABALLOS: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs)

Autor de la memoria:

ANTONIO ROMERO LASHERAS

Directores:

CLEMENTINA RODELLAR PENELLA
FAUSTINO MANUEL GASCÓN PEREZ

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor por la Universidad de Zaragoza



Departamento de
Anatomía, Embriología
y Genética Animal
Universidad Zaragoza



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

Zaragoza, Noviembre 2015



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

- Tesis Doctoral -

TRATAMIENTO DE LAS TENDINITIS INDUCIDAS EN CABALLOS: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs)

Autor de la memoria:

ANTONIO ROMERO LASHERAS

Directores:

CLEMENTINA RODELLAR PENELLA
FAUSTINO MANUEL GASCÓN PEREZ

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor por la Universidad de Zaragoza



Departamento de
Anatomía, Embriología
y Genética Animal
Universidad Zaragoza



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

Zaragoza, Noviembre 2015

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra sólo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por ley. Dirígase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, www.cedro.org) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

© **Tratamiento de las tendinitis inducidas en caballos: estudio comparativo entre plasma rico en plaquetas (PRP) y células madre mesenquimales (MSCs)**

© **Antonio Romero Lasheras**

Editorial Watson CME, SL

Avda. Gómez Laguna 25, 1.ª Planta
50009 Zaragoza
www.watsoneditorial.com
watson@watsoneditorial.com

Gráficas Cometa

Ctra. Castellon, Km. 3'400
50013 · Zaragoza

Impreso en España



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

- Tesis Doctoral -

TRATAMIENTO DE LAS TENDINITIS INDUCIDAS EN CABALLOS: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs)

Autor de la memoria:

ANTONIO ROMERO LASHERAS

Directores:

**CLEMENTINA RODELLAR PENELLA
FAUSTINO MANUEL GASCÓN PEREZ**

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor por la Universidad de Zaragoza



Departamento de
Anatomía, Embriología
y Genética Animal
Universidad Zaragoza



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

Zaragoza, Noviembre 2015



Departamento de
Anatomía, Embriología
y Genética Animal
Universidad Zaragoza



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

Doña Clementina Rodellar Penella, Profesora Titular del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal, y **Don Faustino Manuel Gascón Pérez**, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal,

CERTIFICAN QUE:

La Tesis Doctoral titulada “Tratamiento de las tendinitis inducidas en caballos: estudio comparativo entre plasma rico en plaquetas (PRP) y células madre mesenquimales (MSCs)” que se recoge en la presente Memoria, de la que es autor **Antonio Romero Lasheras**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y se corresponde con el proyecto de tesis aprobado por el órgano responsable del programa de Doctorado, el dieciséis de junio de 2015, cumpliendo, por tanto, todos los requisitos exigidos para que su autor pueda optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza con la mención de “Doctor Europeo”.

Lo que suscribimos como directores del trabajo en Zaragoza a 10 de noviembre de 2015.

Fdo. Clementina Rodellar Penella

Fdo. Faustino Manuel Gascón Pérez

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes organismos y proyectos:

- *Terapia celular en veterinaria: caracterización de las células troncales mesenquimales equinas para su uso como implantes autólogos en el tratamiento de lesiones del aparato locomotor.* Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Fondo Europeo de Desarrollo Regional. AGL2008-02428. 2009-2011.
- *Evaluación del trasplante autólogo vs heterólogo de células madre mesenquimales en tendinitis inducidas artificialmente en caballos.* Financiado por el programa Aragonés de Medicina Regenerativa (PAMER) el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IC+S). Pipamer 09/019. 2010.
- *Terapia celular en el tratamiento de la artritis en caballos: capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria in vitro e in vivo de las MSCs de médula ósea.* AGL2011-28609. Fondos FEDER/MICIIN 01/01/2012-31/12-2014
- Grupo Consolidado de Aragón A-17. Financiado por el Gobierno de Aragón.

“ *La vida no se mide por el número de veces que tomamos aliento, sino por los extraordinarios momentos que nos lo quitan.* ”

Agradecimientos

Hace ya, muchos años, allá por diciembre del 91, haciendo el tercer curso de Veterinaria, comenzó para mí, una especie de segunda vida, que nació de la inquietud y de las ganas de conocer, de investigar...

Así empecé a conocer a **mis “padres científicos”, Isaías y Pilar** y allí en nuestra primera casa, en nuestro primer “hogar científico”, empezamos a descubrir este mundo.

Comenzamos a jugar, a observar, a mirar y, de la inquietud por aprender y la pasión por los caballos surgió nuestro “bautizo científico”, se llamó “Investigación desde la Aulas” y, ya en aquel momento, también fusionamos los caballos y la genética e incluso aprendimos a “romper la molécula”, y a conocer los polimorfismos bioquímicos.

Aquello nos iba enganchando, y muchas noches, al son de Cadena Dál y del cangrejo señal, seguíamos jugando a ser científicos.

Fueron años en los que confluyeron nuestra infancia científica y el comienzo de la tecnología del ADN, de la PCR y cuando llegó al laboratorio aquel primer termociclador, EL PERKIN-ELMER, fue todo un acontecimiento, un hito histórico, como cuando a principios del siglo XX, llegaba por primera vez la electricidad a un pueblo.

Preparándose para esta nueva era genética estaban **mis dos “hermanas mayores”, Txaro y Clemen**; Yo al principio no las conocía, pero escuchaba hablar de ellas, estaban preparándose en el INRA, eso debía ser importante. El otro hermano mayor, Manolo, ya estaba trabajando y viviendo aquí.

Poco a poco fui creciendo, y, junto a **mi “hermano gemelo” Paco**, hicimos nuestra “primera comunión científica”, la mía versaba sobre el BLAD y la de Paco sobre microsátélites del ADN, (aún recuerdo las aventuras y desventuras de aquellas “manip” y de aquellos geles de agarosa y de acrilamida), pero al final tuvimos que intercambiar el traje de comunión. No pasó nada éramos de la misma talla...

La pasión por los caballos era fuerte y fuimos creciendo y nos emancipamos de la “casa materna”. Después de tantos años cuando paseo por el Laboratorio y veo el viejo PCR BIOMETRA, el viejo GEIGER, es como cuando uno regresa a la casa de su infancia y observa arrinconados los juguetes con los que paso de niño tantos buenos ratos.

Los años fueron pasando y poco a poco, al estilo del hijo pródigo, fui acercándome al mismo barrio donde yo había nacido, y me instalé a vivir cerca de la “casa de mis padres”, en el mismo barrio, pero dos calles más abajo. Al poco tiempo de instalarme, tuve una **hermana pequeña, Arantza**, la típica hermana tardana, pero que siempre trae frescura y alegría cuando llega a la familia. Allí, en mi nueva casa conocí a mi vecino de enfrente, un hombre venido de tierras lejanas, **Americo, mi profesor Miyagi** particular y yo, su Daniel en Karate Kid.

Agradecimientos

Con el paso del tiempo, he conocido en el barrio un montón de amigos, las chicas de genética, Laura, Ana, Ana Cris, Carmen; Los chicos del Hospital, Neka, Sara, Jesús, y muy buenos vecinos Anachu, M^a José, Amaya, Silvia, Imanol, Olivia, Alicia, Celia, Olga y algunos que se han mudado.

Mis tíos, M^a Jesús y José Antonio también viven en el mismo barrio y eso nos permite hacer con frecuencia comidas familiares divertidas, aunque ya se sabe, como en todas las familias, cuando nos reunimos, —cada loco con su tema—. **Mis primos, Nacho y Niko**, siempre están ahí dándome consejos y apoyándome con mis problemas de ciencia.

Últimamente en las reuniones familiares, se ponían un poco pesados con el tema de mi “confirmación científica”, y no han parado hasta que no lo han conseguido; es lo que tienen las familias científicas, siempre se empeñan en que tengas la gracia sacramental.

Por eso, quiero daros a todos las gracias, por ser **una gran familia**.

Abreviaturas

A

ACI: Implantación de condrocitos autólogos
ACAN: Agrecan
ALP: Fosfatasa alcalina
AT-MSC: Célula madre mesenquimal derivada de tejido adiposo
AD-SVF: Fracción estromal vascular derivada de la grasa
AAEP: Asociación americana de veterinarios de caballos
APCs: Concentrados plaquetarios autólogos

B

BGN: Biglicano
BGLAP: Osteocalcina
BM-MSC: Célula madre mesenquimal derivada de médula ósea
BMP: Proteína morfogenética de hueso
BMA: Aspirado de médula ósea
BMMSNC: Células mononucleadas derivadas de médula ósea
B-2M: β mioglobulina
BID: Dos veces al día

C

CD: Clúster de diferenciación
cDNA: DNA complementario
CFU-F: Unidad formadora de colonia con morfología de fibroblasto
CPD: Doblae celular acumulado
COL1A1: Colágeno tipo I Alfa 1
COL3A1: Colágeno tipo III Alfa 1
COMP: Proteína oligomérica de la matriz del cartílago
CO: Orientación del colágeno
CDMP: Proteína morfogenética derivada del cartílago
cAMP: Adenosín monofosfato cíclico
CSA: Área de sección transversal
CN: Celularidad
CM: Medio completo

D

DMEM: Dulbecco Modified Eagle's Medium
DMMB: Azul de dimetilmetileno
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DAKO: Anticuerpo monoclonal de conejo IR504
DCN: Decorin

Abreviaturas

E

ESC: Célula madre embrionaria
ESWT: Terapia con ondas de choque extracorpóreas
EFG: Factor de crecimiento epidérmico
EDTA: Ácido Ethylendiaminotetracético.

F

FBS: Suero fetal bovino
FGF: Factor de crecimiento de fibroblasto
b-FGF: Factor de crecimiento de fibroblasto básico
FPS: Grado del patrón de alineamiento de fibras de colágeno
FMOD: Fibromodulina

G

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GVHD: Enfermedad de huésped contra injerto
GS: Sustancia amorfa
GAG: Glucosaminoglicano

H

HSC: Célula madre hematopoyética
HPF: Campo de alta resolución

I

IBMX: Isobutil-1-metilxantina
IGF-I: Factor de crecimiento insulínico tipo I
ISCT: Sociedad internacional de terapia celular
IFN: Interferón
IV: Intravenosa

L

LUM: Lumican
LSM: Ligamento suspensor del menudillo
LA-TFDP: Ligamento accesorio del tendón flexor digital profundo

Abreviaturas

M

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
MSC: Célula madre mesenquimal
MTT: Bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-lo)-2, 5-difeniltetrazol
MEC: Matriz extracelular
MMP: Metaloproteinasa
MIZ: Zona de máxima lesión

N

NF: Factor de normalización
NGF: Factor de crecimiento neural

O

OA: Osteoartrosis

P

PBS: Tampón fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PPAR γ : Receptor y activado por proliferador de peroxisoma
PHA: Phytohemaglutinina
PV: Peso vivo
PSGAG: Glucosaminoglicanos polisulfatados
PDGRF: Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PRP: Plasma rico en plaquetas
PBMSC: Células mononucleadas de sangre periférica

Q

QID: Cuatro veces al día

R

RNA: Ácido ribonucleico
RS: Suero de conejo
RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real
RL: Ringer lactato
RPWT: Terapia de ondas de presión radial

Abreviaturas

S

SVF: Fracción vascular estromal

SLRP: Proteoglicanos pequeños ricos en leucina

SCX: Scleraxis

T

TGF: Factor de crecimiento transformante

TNF: Factor de necrosis tumoral

TD-MSC: Células madre mesenquimales derivadas de tendón

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TES: Grado de ecogenicidad tendinosa

TM: Morfología tenocítica

TNC: Tenascina C

TNMD: Tenomodulina

TIVA: Anestesia intravenosa

TFDP: Tendón flexor digital profundo

TFDS: Tendón flexor digital superficial

TIMPS: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas plasmáticos

V

V: Vascularidad tendinosa

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

Índice

1. RESUMEN / SUMMARY	1
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	7
3. ANTECEDENTES	13
3.1. Tendones y ligamentos: estructura y función	15
3.1.1. Estructura básica de los tendones y ligamentos	16
3.1.1.1. Matriz del tendón	17
3.1.1.1.1. Matriz extracelular no fibrosa	17
3.1.1.1.2. Porción fibrosa	19
3.1.2. Endotenon, epitenon y paratenon	21
3.1.3. Vascularización	21
3.2. Fisiopatología de las lesiones tendinoligamentosas	21
3.2.1. Patogenia de las tendinopatías	21
3.2.2. Clasificación de las tendinopatías	24
3.2.2.1. Tendinopatía Aguda	24
3.2.2.2. Paratenonitis	24
3.2.2.3. Tendinopatía Crónica	24
3.3. Fisiopatología de la reparación/regeneración del tendón	25
3.3.1. Mecanismos fisiológicos (Reparación vs. regeneración)	25
3.3.1.1. Fase inflamatoria	27
3.3.1.2. Fase proliferativa	27
3.3.1.3. Fase de remodelación/maduración	28
3.3.2. Mecanismos moleculares	29
3.4. Diagnóstico de las lesiones tendinoligamentosas	31
3.5. Terapia convencional de las lesiones tendinoligamentosas	35
3.5.1. Terapias basadas en métodos físicos	35
3.5.1.1. Crioterapia y vendaje	35
3.5.1.2. Ultrasonidos	35
3.5.1.3. Ondas de choque	36
3.5.2. Terapias tópicas	37
3.5.3. Terapias médico-quirúrgicas	38
3.6. Terapia regenerativa de lesiones tendinoligamentosas	42
3.6.1. PRPs (plasma rico en plaquetas)	42
3.6.1.1. Definición y mecanismo de acción	42
3.6.1.2. Principales factores de crecimiento contenidos en el PRP	43
3.6.1.2.1. Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF)	44
3.6.1.2.2. Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β)	45
3.6.1.2.3. Factor de Crecimiento Insulínico (IGF)	47
3.6.1.2.4. Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF)	48

Índice

- 3.6.1.2.5. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF).....49
 - 3.6.1.3. Utilización de PRPs en el tratamiento de lesiones tendinológicas.....50
 - 3.6.1.4. Tratamiento con PRP: Consideraciones en torno a su aplicación y viabilidad plaquetaria.....52
 - 3.6.1.5. Efectos adversos asociados al uso terapéutico de los PRP.....52
 - 3.6.2. Células madre.....53
 - 3.6.2.1. Células madre mesenquimales.....56
 - 3.6.2.1.1. Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.....57
 - 3.6.2.1.2. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.....57
 - 3.6.2.1.3. Células madre mesenquimales derivadas de otros tejidos.....58
 - 3.6.2.2. Caracterización de las células madre mesenquimales.....58
 - 3.6.2.2.1. Potencial de autorrenovación y proliferación.....58
 - 3.6.2.2.2. Fenotipo de marcadores de superficie.....58
 - 3.6.2.2.3. Potenciales de diferenciación.....59
 - 3.6.2.2.3.1. Diferenciación adipogénica.....60
 - 3.6.2.2.3.2. Diferenciación osteogénica.....60
 - 3.6.2.2.3.3. Diferenciación condrogénica.....61
 - 3.6.2.2.3.4. Diferenciación a tenocito.....62
 - 3.6.2.2.3.5. Diferenciación a linajes de otras capas embrionarias.....62
 - 3.6.2.2.4. Propiedades inmunológicas.....62
 - 3.6.2.3. Células madre mesenquimales equinas.....65
 - 3.6.2.3.1. Potencial de autorrenovación y proliferación.....65
 - 3.6.2.3.2. Fenotipo de marcadores de superficie.....65
 - 3.6.2.3.3. Potencial de diferenciación.....66
 - 3.6.2.3.3.1. Diferenciación adipogénica.....66
 - 3.6.2.3.3.2. Diferenciación osteogénica.....66
 - 3.6.2.3.3.3. Diferenciación condrogénica.....67
 - 3.6.2.4. Aplicación de las células madre a la terapia regenerativa.....67
 - 3.6.2.4.1. Terapia en lesiones óseas.....69
 - 3.6.2.4.2. Terapia en lesiones cartilaginosas.....69
 - 3.6.2.4.3. Terapia en lesiones cardíacas.....69
 - 3.6.2.4.4. Terapia inmunomoduladora.....70
 - 3.6.2.5. Estado actual de la utilización de células madre en el tratamiento de lesiones tendinológicas.....70
 - 3.6.2.5.1. Consideraciones generales.....70
 - 3.6.2.5.2. Diferentes tipos de células utilizadas.....74
 - 3.6.2.5.2.1. Fracción estromal vascular derivada de tejido adiposo (AD-SVF).....74
 - 3.6.2.5.2.2. BM-MSCs.....74

Índice

3.6.2.5.2.3. AT MSCs.....	76
3.6.2.5.2.4. MSCs de otros orígenes.....	77
3.7.3. Consideraciones futuras de la utilización de MSCs en clínica equina.....	78
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
4.1. Animales.....	83
4.1.1. Muestras obtenidas.....	83
4.2. Diseño del experimento.....	84
4.3. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales.....	85
4.3.1. Obtención de muestras y aislamiento de mscs equinas.....	85
4.3.1.1 Aspirados de médula ósea del esternón.....	85
4.3.1.2. Tejido adiposo subcutáneo del área supragluteal cercana a la cola.....	86
4.4. Expansión y criopreservación de MSCs.....	87
4.5. Estudio de la proliferación de las MSCs.....	88
4.6. Diferenciación de MSCs.....	88
4.6.1. Diferenciación osteogénica.....	88
4.6.1.1 Método de inducción de la diferenciación.....	88
4.6.1.2. Tinción específica.....	89
4.6.2. Diferenciación adipogénica.....	89
4.6.2.1. Método de inducción de la diferenciación.....	89
4.6.2.2. Tinción específica.....	89
4.6.3. Diferenciación condrogénica.....	89
4.6.3.1 Método de inducción de la diferenciación.....	89
4.6.3.2. Tinción específica.....	90
4.7. Análisis de la expresión génica de marcadores de superficie.....	90
4.7.1. Extracción de rna a partir de MSCs.....	90
4.7.2. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-QPCR).....	90
4.7.2.1. Marcadores de superficie analizados.....	91
4.8. Capacidad de inmunosupresión de las MSCs.....	92
4.8.1. Obtención y aislamiento de PBMCs.....	92
4.8.2. Estimulación de PBMCs.....	92
4.8.3. Cocultivo de mscs con PBMCs.....	92
4.9. Obtención de PRPs.....	93
4.10. Ensayo clínico para tratamiento de lesiones inducidas en el tendón flexor digital superficial (TFDS).....	93
4.10.1. Inducción quirúrgica de la lesión.....	93
4.10.2. Inoculación de los productos biológicos para los diferentes tratamientos.....	94
4.10.3. Estudio de la efectividad de los tratamientos.....	95

Índice

4.10.3.1. Valoración clínica.....	95
4.10.3.2. Valoración de parámetros ecográficos.....	96
4.10.3.3. Valoración de parámetros histológicos.....	98
4.10.3.5. Análisis de la expresión génica en tendón.....	100
4.10.3.5.1. Extracción de RNA a partir de tendón.....	100
4.10.3.5.2. Marcadores analizados relacionados con la regeneración del tendón.....	100
4.11. Herramientas bioinformáticas.....	101
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
5.1. Aislamiento y proliferación de MSCs.....	105
5.2. Diferenciación de MSCs.....	105
5.2.1. Diferenciación osteogénica.....	105
5.2.2. Diferenciación adipogénica.....	106
5.2.3. Diferenciación condrogénica.....	106
5.3. Expresión génica de marcadores de superficie.....	107
5.4. Valoración de la capacidad inmunomoduladora de las MSCs.....	108
5.5. Obtención de PRPs.....	110
5.6. Inducción de la lesión quirúrgica en el TFDS.....	111
5.7. Valoración de la efectividad de los diferentes tratamientos.....	114
5.7.1. Parámetros estudiados “in vivo”.....	114
5.7.1.1 Resultados del análisis clínico.....	114
5.7.1.2. Resultados del análisis ecográfico.....	115
5.7.2. Parametros estudiados “in vitro”.....	121
5.7.2.1. Resultados del análisis histológico.....	121
5.7.2.2. Resultados preliminares de microscopia electrónica.....	128
5.7.2.3. Resultados de expresión génica.....	130
5.7.3. Consideraciones generales sobre los resultados obtenidos “in vivo” y la terapia celular en las tendinopatias.....	140
6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	147
7. BIBLIOGRAFÍA.....	151
8. ANEXOS.....	177

1. RESUMEN / SUMMARY

Las enfermedades más comunes en el caballo son aquellas que afectan a su aparato musculoesquelético, y dentro de ellas, destaca la tendinitis del tendón flexor digital superficial (TFDS), en la que la incidencia de recidiva es relativamente alta debido a que este tipo de tejidos sanan muy lentamente, y el tejido reparado no tiene las mismas características mecánicas biológicas que el tejido original.

Las técnicas más novedosas en el tratamiento de este tipo de patologías están basadas en la Terapia Regenerativa. Los dos abordajes terapéuticos más frecuentemente utilizados son los PRPs y las células madre mesenquimales (MSCs).

El tratamiento de tendinopatías tanto con PRPs como con células madre mesenquimales (MSCs) ha conseguido resultados prometedores en diversas especies, observándose un aumento de la calidad histológica y de las características biomecánicas del tendón regenerado, si bien hasta el momento, no está claro cuál de ellas sería la más eficaz.

En la presente tesis Doctoral se ha propuesto un ensayo “in vivo” con el objetivo general de evaluar y comparar el efecto de los PRP y las MSCs en el tratamiento de tendinitis inducidas quirúrgicamente en el TDFS. Para ello, se ha llevado a cabo el aislamiento, caracterización y diferenciación de las células madre mesenquimales equinas (MSCs) obtenidas a partir de distintos orígenes: médula ósea y tejido adiposo. Dichas células fueron caracterizadas mediante el estudio de marcadores de superficie mediante RT-qPCR, y se diferenciaron a los tres linajes mesodérmicos: adipocito, osteocito y condrocito, demostrando que cumplen los estándares requeridos por la ISCT para poder ser consideradas MSCs.

También se estudió la capacidad de inmunomodulación de las MSCs, valorando el efecto de las MSCs sobre la inhibición de la proliferación de las células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs), observando que las MSCs de ambos orígenes poseían un efecto inmunomodulador “in vitro”. No obstante las MSCs obtenidas de tejido adiposo mostraron un mayor efecto inmunosupresor que las obtenidas a partir de médula ósea.

Por último se realizó un ensayo preclínico con 12 animales a los que se les indujo una lesión mecánico-quirúrgica en el TDFS de ambas extremidades. Se establecieron 4 grupos en función del tratamiento aplicado: BM-MSCs, At-MSCs, PRP o RL (grupo control). A lo largo del experimento se realizó un seguimiento ecográfico de la evolución de las lesiones y tras el sacrificio de los mismos se desarrollaron estudios histológicos y de expresión génica.

Todos los parámetros ecográficos, ecogenicidad (TES), orientación de las fibras de colágeno (FPS) y porcentaje del área de sección lesionada (%CSA) mostraron una mejor evolución clínica en los animales tratados. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

Todos los parámetros histológicos analizados relacionados con la calidad del tejido regenerado morfología tenocítica (TM), grado de vascularización (V), sustancia amorfa (GS), orien-

tación del colágeno (CO) y celularidad (CN) presentaron menores valores en los tendones tratados que los observados en el grupo control, lo que es indicativo, de nuevo, de una mejor regeneración tisular.

Para comprobar los efectos de los distintos tratamientos aplicados en el presente trabajo se analizó la expresión de 9 genes relacionados con los mecanismos de remodelación del tendón y con la expresión fenotípica de los tenocitos. De todos los genes analizados, la variación observada en la expresión génica de COL1A1, COL3A1, ACAN, TNC y MMP3, aunque presenta una gran variabilidad individual, demostraría una mejor regeneración tisular en los tendones tratados que en el grupo control, lo que corrobora el efecto de los diferentes tratamientos observado a nivel histológico y ecográfico.

Summary

The most common diseases in horses are those that affect the musculoskeletal system, and within these, the tendinitis of the superficial digital flexor tendon (SDFT), in which the incidence of recurrence is relatively high due to this type of tissue heals very slowly, and the repaired tissue has not the same biological features that the original tissue.

The newest treatments in treating such diseases are based on regenerative therapy. The two most commonly used treatment approaches are PRP and mesenchymal stem cells (MSCs)

The treatment of tendinopathies with PRPs or mesenchymal stem cells (MSCs) has achieved promising results in several species, with an increase of histological grade and biomechanical characteristics of the regenerated tendon, although so far it is not clear which of them would be the most effective.

In this PhD thesis it has been proposed a trial “in vivo” with the overall objective to evaluate and compare the effect of PRP and MSCs in the treatment of surgically induced tendinitis in SDFT. To this, it was carried out the isolation, characterization and differentiation of equine mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from different sources; bone marrow and adipose tissue. These cells were characterized by studying surface markers by RT-qPCR and they were differentiated into the three mesodermal lineages: adipocytes, osteocytes and chondrocytes, showing that they meet the standards required by the ISTC to be considered MSCs.

Immunomodulation capacity of MSCs was also studied, evaluating the effect of MSCs on inhibition of proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), noting that both origins of MSCs had an immunomodulatory effect “in vitro”. However MSCs obtained from adipose tissue showed a greater immunosuppressive effect than those obtained from bone marrow.

Finally, a preclinical trial with 12 animals with induced mechanical surgical injury SDFT of both limbs was performed. Four groups were established according to the treatment applied: BM-MSCs, At-MSCs, PRP or RL (control group). Throughout the experiment, an ultrasound monitoring of the lesion evolution was performed and after animal slaughtering, histological and gene expression studies were developed.

All echographic parameters, echogenicity (TES), orientation of collagen fibers (FPS) and percentage of area injured section (% CSA) showed better clinical outcome in treated animals. However, no significant differences between treatments were observed.

All histological parameters analyzed related to the quality of the regenerated tissue, tenocyte morphology (TM), vascularization degree (V), ground substance (GS), orientation of collagen (CO) and cellularity (CN) showed lower values in treated tendons than those observed in the control group, indicating once again better tissue regeneration.

To test the effects of different treatments applied in this study, the expression of 9 genes related to the mechanisms of tendon remodeling and phenotypic expression of tenocytes were analyzed. The observed variation in gene expression of COL1A1, COL3A1, ACAN, TNC and MMP3, despite the great individual variability, would show better tissue regeneration in treated tendons than in the control group, corroborating the effect of different treatments observed at histological and ultrasound level.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La industria equina es un sector de un gran impacto económico tal y como lo demuestra el último estudio realizado por la auditora Deloitte en España, en el que se calcula que el impacto económico del sector ecuestre directo e indirecto en 2012, asciende a 5.300 millones de euros y representa el 0,51% del PIB español. Por otra parte, es importante destacar que el número de caballos censados en España asciende a 723.496 inscritos en 175.429 explotaciones que dan empleo a unas 61.000 personas.

Aunque la Comunidad Autónoma de Aragón no es un territorio donde estén arraigadas culturalmente las actividades ecuestres, nuestra región posee el 2% del total de la cabaña española representando el 2% del impacto económico del sector ecuestre en el país.

Las enfermedades más comunes en el caballo son aquellas que afectan a su aparato musculoesquelético. Estudios realizados en caballos de carreras demuestran que estas lesiones producen importantes pérdidas económicas, y representan cerca del 82% de los problemas por pérdida de rendimiento deportivo. Más concretamente, del total de lesiones que afectan al aparato locomotor, se estima que entre el 46 y el 53% corresponden a lesiones de tendones y/o ligamentos.

Dentro de las patologías tendinosas, la tendinitis del tendón flexor digital superficial (TFDS) es la lesión más común y la incidencia de recidiva es relativamente alta (Palmer *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 2014) debido a que este tipo de tejidos sanan muy lentamente y el tejido reparado no tiene las mismas características de elasticidad y fuerza tensil que el tejido original (Dowling *et al.*, 2000). Los mecanismos de reparación natural no permiten que los tendones y ligamentos lesionados se recuperen completamente y esto hace que los caballos afectados con estos problemas tengan una predisposición de recaída aproximadamente del 80% (Carmona y López, 2011).

Actualmente, se considera a las tendinopatías como una lesión por sobreuso o sobrecarga del tendón y se conocen multitud de factores de riesgo que predisponen al paciente a padecerla (Dakin *et al.*, 2014) (Hangody *et al.*, 2001).

Estas lesiones son frecuentes tanto en animales de alto rendimiento como los destinados al recreo y ocio.

Durante los últimos años, se ha incrementado el conocimiento de la fisiología del tendón y algunos aspectos biológicos del tejido conectivo pudiéndose esclarecer a nivel molecular varios procesos bioquímicos relacionados con la fisiopatología de estas lesiones. Esto ha permitido esclarecer, en parte, la causa de los fracasos obtenidos con la terapéutica convencional y ha abierto una nueva era en el tratamiento de estas lesiones, la era de la terapia regenerativa (Carmona y López, 2011).

El objetivo de la regeneración in vivo de los tendones en équidos es el de recuperar la funcionalidad del tejido a través de la restauración de las propiedades mecánicas y biológicas que tenía previamente a la lesión. Por tanto, el objetivo que se plantean las estrategias regenerativas para el

tratamiento de estas lesiones, es el de utilizar células y factores que ayuden a la regeneración de la matriz extracelular que conformará un tejido de la forma más próxima posible a la matriz que poseía el tendón originalmente (Frisbie y Smith, 2010).

Por diversas razones, uno de los tratamientos más extendidos que persiguen la regeneración tisular, es el uso de plasma rico en plaquetas (PRP): posee una concentración elevada de factores de crecimiento, su obtención es relativamente sencilla y es barato de obtener. Además de los factores de crecimiento, también contiene fibrina, fibronectina y vitronectina, proteínas que juegan un papel importante en la adhesión y la migración celular. Tras la administración de PRP, se observa un incremento de la infiltración de células en el lugar de la lesión (Horwitz *et al.* 1999).

El PRP también proporciona un aumento en la resistencia y la elasticidad del tendón (McCarrel *et al.*, 2014). A pesar de lo expuesto, la administración de PRPs ha dado lugar a resultados dispares (Brossi *et al.*, 2015). En algunos casos no se observó cambio alguno en la actividad, en el dolor ni en la curación final del tendón (Abate *et al.*, 2012) y en otros casos, la recuperación de la movilidad fue rápida y no hubo complicaciones de ningún tipo tras la lesión (Hangody *et al.*, 2001). Recientemente, el tratamiento de tendinopatías con células madre mesenquimales (MSCs) ha conseguido resultados prometedores en diversas especies, ya que se ha observado un aumento de la calidad histológica y de la fuerza biomecánica del tendón lesionado regenerado. (Goncalves *et al.*, 2014; Lopez y Jarazo, 2015)

Smith y colaboradores fueron los primeros en utilizar células mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea (BM-MSCs) suspendidas en sobrenadante de médula ósea autóloga en el tratamiento de “core lesions” no inducidas en el TFDS. Tras el tratamiento, no se observaron reacciones adversas ni formación de tumores (Frisbie, 2005). La eficacia de este tratamiento quedó demostrada en el seguimiento realizado tras la administración de las células, que mostró que, el 98, 2% de caballos de carreras con lesiones en el TFDS volvieron a competir con un bajo índice de recaída en la lesión (27, 4%) (Frisbie *et al.*, 2009). Diversos autores han descrito mejoras estructurales y funcionales en tendinopatías tratadas con diferentes productos biológicos englobados dentro de la medicina regenerativa (Smith *et al.*, 2003; Godwin *et al.*, 2012), células mononucleadas derivadas de médula ósea (BMMSNCs) (Crovace *et al.*, 2010), PRP (Bosch *et al.*, 2010), células mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSCs) vehiculadas con diferentes productos, sobrenadante de médula ósea (BMA) (Smith *et al.*, 2013), plasma rico en plaquetas (PRP) (Del Bue *et al.*, 2008), células mesenquimales derivadas de grasa (Carvalho *et al.*, 2011).

También se ha aplicado terapia celular con células procedentes de tejido adiposo. Nixon y colaboradores administraron SVF (fracción vascular estromal) derivadas de tejido adiposo en un modelo de lesión inducida con collagenasa. Aunque observaron pocos cambios ecográficos y de expresión de marcadores genéticos entre tendones control y tratados, la histología reveló diferencias significativas (Nixon *et al.*, 2008b). Watts y colaboradores en 2011 (Watts *et al.*, 2011b) en cambio optaron por la administración de células fetales embrionarias equinas en el mismo modelo de lesión, obteniendo también una mejora en la alineación de las fibras en los

tendones de los animales tratados pero, al igual que en casos anteriores, sin correspondencia en la expresión de genes marcadores relacionados con la regeneración tisular.

Por tanto, aunque los resultados que se van obteniendo presentan una mejoría respecto a los tratamientos convencionales para las lesiones del aparato locomotor, todavía quedan muchas incógnitas por resolver. De manera que los resultados positivos en terapia celular equina alien-tan para continuar realizando ensayos utilizando otras posibilidades con el fin de esclarecer los mecanismos y procesos que gobiernan la regeneración del tejido y cuál de ellos es el más eficaz (Lopez y Jarazo, 2015).

Con el desarrollo de las investigaciones que se nos proponemos realizar, esperamos aportar datos esclarecedores en la medicina regenerativa equina que puedan ser extrapolados a la clínica humana, debido a que el caballo es reconocido por la comunidad científica como uno de los mejores modelos animales (McIlwraith *et al.*, 2011; McIlwraith *et al.*, 2012) para estudiar tanto las tendinopatias como las artropatías humanas.

Por todo lo anteriormente expuesto se plantea el desarrollo de la Tesis Doctoral que lleva por título: “Tratamiento de las tendinitis inducidas en caballos: estudio comparativo entre plasma rico en plaquetas (PRP) y células madre mesenquimales (MSCs).”

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la comparación de la eficacia del tratamiento con PRP y MSCs obtenidas a partir de médula ósea y tejido adiposo en tendinitis inducidas mecánicamente en la especie equina.

Para conseguir dicho objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- I. Aislar, caracterizar y diferenciar las MSCs obtenidas a partir de distintos orígenes: médula ósea y tejido adiposo.
- II. Comprobar la capacidad inmunomoduladora de las MSCs, mediante la valoración del efecto inhibitorio de proliferación de las células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs).
- III. Crear lesiones homogéneas inducidas quirúrgicamente en el tendón flexor digital superficial (TFDS) del caballo.
- IV. Obtener PRP a partir de sangre venosa periférica para su aplicación y posterior estudio comparativo.
- V. Implantar de forma ecoguiada y comprobar la seguridad del PRP y las MSCs cultivadas previamente.
- VI. Realizar un ensayo preclínico para valorar de forma comparada la eficacia de los diferentes tratamientos aplicados mediante pruebas clínicas, ecográficas, histológicas y de expresión génica.

3. ANTECEDENTES

3.1. Tendones y ligamentos: estructura y función

La distinción entre tendones y ligamentos se ha basado fundamentalmente en aspectos anatómicos; los tendones se interponen en la unión músculo-hueso, mientras que los ligamentos intervienen en la unión hueso-hueso.

Los tendones y ligamentos pueden tener una función meramente posicional, tal es el caso del tendón extensor digital común (TEDC), o actuar como elementos elásticos que almacenan energía elástica para lograr una locomoción eficiente, como es el caso de los tendones flexor digital superficial (TFDS) y flexor digital profundo (TFDP) y el ligamento suspensor del menudillo (LSM). La energía acumulada se libera durante la fase de propulsión. Estos tendones, acumuladores de energía, cuentan con unos ligamentos accesorios que unen el tendón directamente al hueso, proporcionando un soporte en los momentos de carga máxima (Kasashima *et al.*, 2004) (Thorpe *et al.*, 2010).

Los ligamentos periarticulares, alinean y estabilizan huesos adyacentes y proporcionan una resistencia pasiva frente al movimiento y están sujetos a fuerzas con múltiples vectores direccionales dependiendo del grado de movilidad de la articulación (Dyson y Dik, 1995).

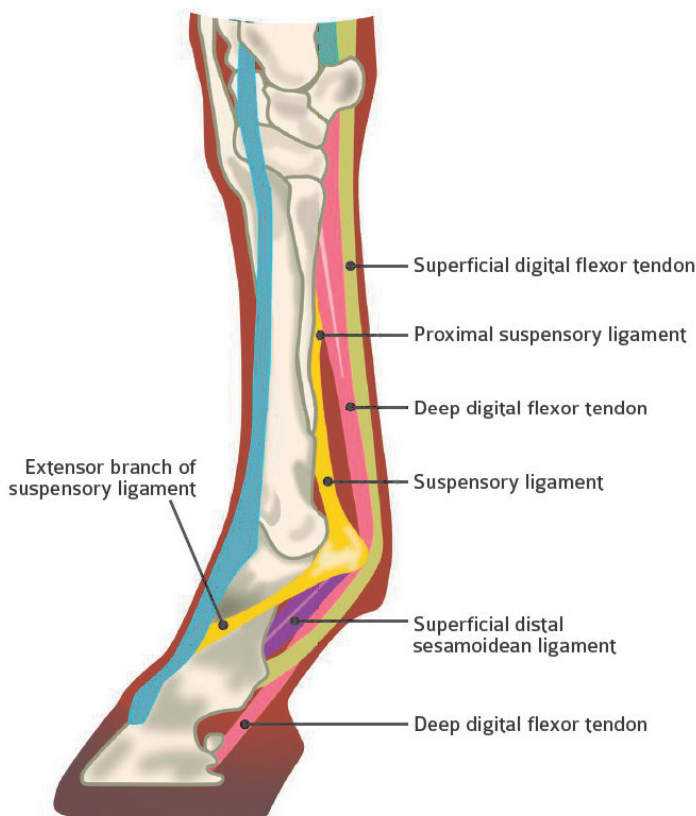


Figura 1. Esquema que representa los principales tendones y ligamentos de la mano del caballo (Novobrace TM 2014)

Estas distintas funciones llevan asociadas algunas especificidades en la composición química y en la estructura de estos tejidos (Batson *et al.*, 2003).

Por lo que respecta a los tendones, las cargas que soportan son muy distintas. Los tendones extensores sólo reciben cargas bajas, mientras que los flexores las reciben altas y de forma sostenida (7-10 kilonewtons en el TFDS; (Smith *et al.*, 2002a)). Los tendones extensores están menos hidratados y contienen más colágeno que los flexores. El contenido en COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) es más alto en los flexores que en los extensores, especialmente en

edades tempranas antes de llegar a la madurez del tendón (2 años de edad) y, en los adultos, en las zonas de compresión, donde hay un cambio de dirección del tendón (Smith *et al.*, 1997). Estas variaciones en la composición proteica de la matriz extracelular, no solo afecta a la COMP sino a otras proteínas estructurales que se describirán posteriormente (Smith *et al.*, 2002c). En lo que concierne a los ligamentos periarticulares, a pesar de presentar una composición similar a los tendones, son más complejos desde el punto de vista anatómico, con múltiples haces fasciculares que se tensan y relajan en distintas posiciones articulares, dependiendo del haz fascicular. Además de proveer un soporte para la articulación, también aportan información propioceptiva. La capsula articular fibrosa está muy vinculada a estos ligamentos y funciona de un modo muy similar, de forma que puede considerarse como un ligamento especial (Bowker *et al.*, 1997).

Las fibras de colágeno en los tendones siguen una disposición paralela, mientras que en los ligamentos se disponen en distintas direcciones para poder soportar de manera más eficiente las cargas multiaxiales. La composición bioquímica de los ligamentos varía de la de los tendones ya que contienen algo menos de colágeno total y con una mayor proporción de colágeno tipo III y Glicosaminoglicanos (GAG). Las células fibroblásticas que crean la matriz extracelular de los ligamentos, tienen también diferencias morfológicas con una forma más acuminada que los tenocitos maduros del tendón. (Souza *et al.*, 2010).

3.1.1. Estructura básica de los tendones y ligamentos

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

Estos fibroblastos son los responsables de la síntesis, secreción y mantenimiento de proteínas de la matriz, produciendo una estructura organizada de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas, encargándose de su remodelación en caso de que tenga que existir una reparación del tendón (Moller *et al.*, 2000).

Aunque al conjunto de células que conforman estas estructuras fibrosas se les conoce con el nombre generalista de tenocitos y tenoblastos, coexisten diferentes tipos celulares. Podríamos decir que los tenocitos son un tipo de fibroblastos especializados. Se han identificado 4 grupos: I, II, III y IV, este último en el endotendón. No se conoce bien la función específica de cada uno, ni tampoco están caracterizados genéticamente porque no hay marcadores específicos para cada tipo (Webbon, 1978; Kannus, 2000).

Además, hay otras células: los fibroblastos del endotendon, epitendon y paratendon y células sinoviales del epitendon en aquellas zonas en las que el tendón está incluido dentro de una vaina tendinosa.

El metabolismo del tenocito está regulado por los estímulos mecánicos y por las señalizaciones bioquímicas de las citoquinas. Así por ejemplo es fundamental la señalización del factor de crecimiento (TGF- β) para que respondan a estímulos tensiles. La síntesis y distribución del TGF- β en el TFDS varía con la edad; los niveles más altos se detectan en animales jóvenes y, sobre todo, en el endotendon (Maeda *et al.*, 2011).

3.1.1.1. Matriz del tendón

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

3.1.1.1.1. Matriz extracelular no fibrosa

La sustancia básica es un gel amorfo constituido por complejos de carbohidratos-proteínas (glicoproteínas estructurales no colágenas) y agua. Los tendones y ligamentos normales contienen un 65% a 70% de agua. Las proteínas no colágenas suponen el 5%-6% de la materia seca del tendón y ligamento y juegan un papel muy importante en las interacciones célula-célula y célula-MEC, así como en la fibrinogénesis del colágeno, el control del diámetro de las fibrillas de colágeno y la homeostasis del tendón ó ligamento (Smith *et al.*, 2002c).

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

- COMP: Los niveles de la COMP son más altos al nacer y van aumentando principalmente en las zonas de máxima tensión. Después de la madurez del tendón, los niveles de la COMP decaen en las zonas de tensión pero no en las zonas de compresión. Su principal función es unir y organizar el colágeno fibrilar durante las fases iniciales

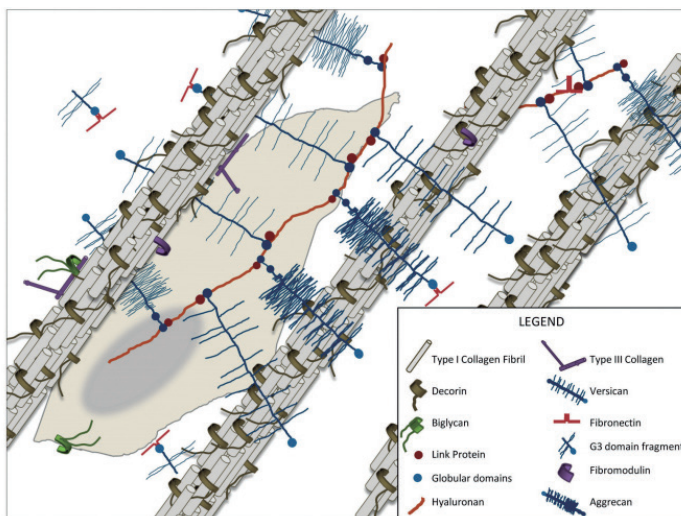


Figura 2. Ilustración que representa la arquitectura de los proteoglicanos más importantes de la matriz extracelular del tendón

de la creación de la estructura básica del tendón que es la fibrilla. No se une a fibrillas ya formadas (Smith *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2002c).

Otros estudios *in vitro* demuestran también que esta glicoproteína puede acelerar la fibrillogénesis y parece que actúa más como una molécula organizadora que estructural (Rosenberg K 1998). Esto podría explicar el hecho de que su presencia sea máxima durante la edad de crecimiento del tendón y que luego vaya decayendo con la edad ó la positiva correlación entre los niveles de la COMP y las propiedades mecánicas del TFDS durante la maduración esquelética (Smith *et al.*, 2002c).

- **PROTEOGLICANOS:** Pueden dividirse en dos grupos: los proteoglicanos grandes (agrecanos), y su equivalente en el tejido blando (versicanos) y los pequeños (Small Leucine-Rich Proteoglycan, SLRP). Los proteoglicanos grandes retienen agua y son más abundantes en las zonas de compresión. Una distribución y la proporción adecuada de proteoglicanos son esenciales para el correcto funcionamiento del tendón (ver Figura 2). La composición de proteoglicanos de los tendones se ve afectada por las fuerzas mecánicas a las que están sometidos; por ejemplo, en regiones que experimentan las fuerzas de tracción longitudinales, predomina el proteoglicano Decorina, del tipo SLRP, sobre otros componentes miembros de esta familia como byglican, lumican, keratocan y fibromodulina, también presentes en el tendón (Rees *et al.*, 2000; Rees *et al.*, 2009). Además de los SLRPs podemos encontrar proteoglicanos como el aggrecan, presente en las regiones de tracción ya que participa en la resistencia a la compresión en este tejido (Rees *et al.*, 2007). De forma similar, Versican también está presente en las regiones de tracción de tendones y ligamentos. Este proteoglicano modula la proliferación celular y la adhesión celular (Lemire *et al.*, 2007).

Entre las glicoproteínas más frecuentes en la matriz extracelular del tendón están: tenascina-C, fibronectina, laminina, fibrillina-2, trombospondina y tenomodulina. La primera, tenascina-C, contribuye a la estabilidad mecánica de la matriz extracelular a través de su interacción con las fibrillas de colágeno (Elefteriou *et al.*, 2001).

Esta glicoproteína se ha utilizado para detectar los primordios tendinosos tempranos y los tendones diferenciados, pero al expresarse a su vez en otros tejidos como nervios o cartílago (pericondrio), su uso como marcador específico resulta complicado (Rees *et al.*, 2007).

La glicoproteína tenomodulina se expresa, bajo la influencia del factor de transcripción scleraxis, en tejidos conectivos densos como ligamentos y tendones, y se asocia con la diferenciación de los tenocitos, siendo un buen marcador de tendones y ligamentos (Docheva *et al.*, 2005; Jelinsky *et al.*, 2011). Scleraxis suele utilizarse como marcador en tendones ya que la expresión de este gen es detectada en las poblaciones tempranas de precursores tendinosos y en su diferenciación a tenocitos (Brent y Tabin, 2004; Shukunami *et al.*, 2006; Espira *et al.*, 2009). Scleraxis aparece altamente expresado en los estadios más tempranos de especificación de linaje tendón/ligamento. Su función durante el desarrollo de los tendones está aún por clarificarse en detalle pero estudios recientes con ratones deficientes en Scleraxis apuntan a

papeles distintos en la diferenciación de los distintos tipos de tendones, ya que se detectaron diferentes alteraciones sufridas según el tipo de tendón (Li *et al.*, 2015).

Otras proteínas no colágenas que forman parte de la matriz extracelular son la fibronectina, trombospondina 4, ácido hialurónico, elastina y tenascina C, esta última es una proteína importante de la matriz del tendón y se presenta de forma abundante en el cuerpo del tendón y en las uniones osteotendinosas y miotendinosas (Espira *et al.*, 2009).

Esta proteína contiene una serie de dominios repetitivos de Fibronectina III que se expanden cuando el tendón es sometido al estrés tensil por lo que funciona como una proteína elástica (Jarvinen *et al.*, 2000).

A la tenascina C se le atribuye un papel fundamental en la alineación y orientación de las fibras de colágeno durante la fase reparativa del tendón (Li *et al.*, 2015). También contribuye a la estabilidad mecánica de la matriz extracelular a través de su interacción con las fibrillas de colágeno (Elefteriou *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003). Esta glicoproteína se ha utilizado para detectar los primordios tendinosos tempranos y los tendones diferenciados, pero al expresarse a su vez en otros tejidos como nervios o cartílago (pericondrio), no puede usarse como marcador específico (Rees *et al.*, 2007).

3.1.1.1.2. Porción fibrosa

La porción fibrosa está compuesta por colágeno y elastina. La elastina supone el 1%-2% de la sustancia seca y contribuye dotando de elasticidad a estos tejidos. El colágeno representa cerca del 80% de la materia seca. En los tendones el 95% del colágeno total es Colágeno tipo I, mientras que en los ligamentos este porcentaje es menor (85%). El resto del colágeno total está constituido por Colágeno tipo III y, en menor proporción, por otros tipos de colágeno (Riley *et al.*, 1994; Fukuta *et al.*, 1998).

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

Tropocolágeno > microfibrillas > subfibrillas > fibrillas > fibras > fascículos (forma ondulada)
> unión de fascículos por endotenon.

El endotendon continúa hacia la periferia del tendón, envolviéndolo con lo que se conoce como epitendon. En las zonas en las que el tendón no está incluido en la vaina sinovial, alrededor del epitendon se localiza otra capa fibrosa conocida como paratendon (Figura 3).

En los tendones y ligamentos existe una gran proporción de colágeno tipo I (95%) (Evans y Barbenel, 1975; Waggett *et al.*, 1998), aunque también se encuentran pequeñas proporciones de Col-II, III, IV, V y VI. El Col-III se encuentra particularmente en las zonas donde el tendón sufre fuerzas de compresión, tales como la región metacarpiana o a su paso entre los huesos

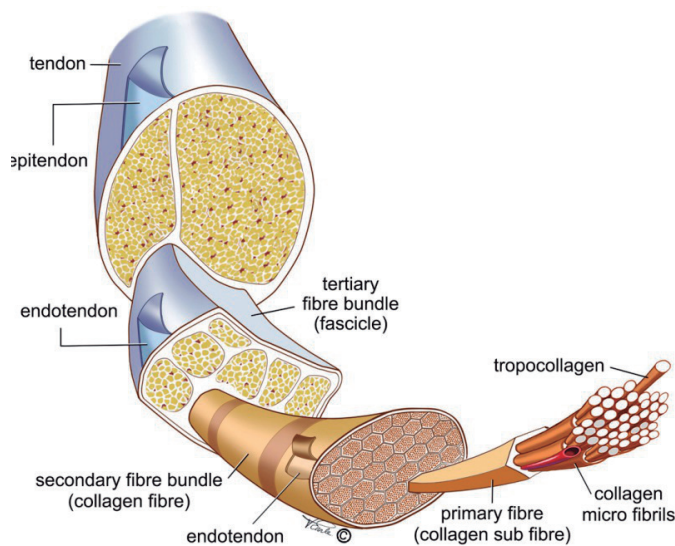


Figura 3. Estructura básica del tendón (Collagen Hierarchy; Vicky Earle. Medical illustration)

sesamoideos. Por otro lado, el Col-III predomina después de las lesiones y traumatismos, en procesos reparativos tempranos y forma microfibrillas de pequeño diámetro (Goodship *et al.*, 1994; Waggett *et al.*, 1998; Dowling *et al.*, 2000; Dowling y Dart, 2005).

El colágeno se organiza a manera de fibrillas. Las fibrillas de colágeno se unen unas con otras mediante entrecruzamientos covalentes, que en el caso del Colágeno tipo I se produce entre la lisina e hidroxiprolina. Otro tipo de entrecruzamiento es el no-covalente (electrostático), que se produce entre los proteoglicanos y glicoproteínas que envuelven las fibrillas de colágeno. Este tipo de enlace no es tan fuerte como el covalente, pero se produce en gran número y se supone que, finalmente, es el responsable más importante de las propiedades mecánicas del tendón. La organización depende de la colocación de cada haz en sentido hidrofílico e hidrofóbico y de las uniones entre cada molécula. Los proteoglicanos y las glicoproteínas influyen sobre la matriz de colágeno y sobre la agregación de las fibrillas de colágeno (Goodship *et al.*, 1994; Dahlgren *et al.*, 2005).

En estado de relajación, las fibrillas de colágeno presentan forma de espiral. El “rizado” imparte elasticidad al tendón en las fases tempranas de carga y este va disminuyendo con la maduración del tendón o con el trabajo (Dowling *et al.*, 2000). A los dos años de edad el tendón es morfológicamente maduro y presenta características mecánicas de mayor rigidez, disminución en el ángulo de elasticidad y disminución en el grosor de las fibras de colágeno (Dowling *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002a). Esta disminución en la elasticidad y aumento de la rigidez del tendón podrían favorecer la aparición de tendinopatías en el caballo. Por otra parte, el diámetro y el número de las fibrillas disminuye con la edad, lo que predispone a los caballos al aumento de lesiones tendinosas con la edad (Smith *et al.*, 2002a; Jones *et al.*, 2006; Caniglia *et al.*, 2012).

3.1.2. Endotenon, epitenon y paratenon

El endotendon contiene vasos y nervios y en él residen diferentes tipos celulares. El endotenon se continúa alrededor del tendón en lo que se conoce como epitenon (Figura X). Alrededor del epitenon, en las zonas sin vaina sinovial, existe una envoltura fibrosa y elongable, el paratenon puede aportar vasos sanguíneos y elementos celulares para la reparación. En aquellas zonas donde la trayectoria del tendón cambia de dirección, el tendón queda envuelto en una vaina que contiene líquido sinovial para facilitar el deslizamiento del tendón. En el interior de la cámara sinovial se encuentra el mesotendon, a modo de tabique que puede dividir la vaina en dos compartimentos completamente separados o no. Algunas veces el mesotendon acompaña a la vascularización para el tendón (ver Figura 3).

3.1.3. Vascularización

Los tendones se nutren por perfusión y por difusión. Por perfusión a partir del flujo sanguíneo intratendinoso, procedente de la unión músculo-tendinosa y de la inserción ósea, y a partir del flujo extratendinoso procedente de vasos que penetran en el tendón vía paratenon (en la zona sin vaina) o vía mesotendon (en la zona con vaina). El otro mecanismo es por difusión desde el líquido sinovial (en la zona con vaina) (Kraus-Hansen *et al.*, 1992).

3.2. Fisiopatología de las lesiones tendinoligamentosas

3.2.1. Patogenia de las tendinopatías

Los tendones son altamente ténsiles, fuertes, flexibles y elásticos y al igual que los ligamentos, exhiben características de deformación no lineales frente a la carga. Esto se traduce en que a pequeños incrementos en la carga se puede producir una gran extensión del tendón, hasta un límite o punto crítico. Después de cada incremento en la carga, se genera un cambio similar en la extensión. Si la carga cesa en ese punto, la estructura vuelve a su estado normal y elimina la energía en forma de calor. Si la carga continúa después del punto crítico, se produce el fenómeno llamado deformación plástica ó efecto residual y finalmente el tendón o ligamento fallan y se rompen (Goodship *et al.*, 1994; Dowling y Dart, 2005; Samiric *et al.*, 2009). Las lesiones por sobreesfuerzo se producen como consecuencia de dos posibles situaciones:

- a) Sobrecarga repentina que excede la capacidad de resistencia biomecánica

Todos los tendones y ligamentos tienen propiedades viscoelásticas, lo que significa que sus propiedades mecánicas varían a medida que se tensan. En la fase inicial de la tensión se produce una elongación otorgada por el alineamiento del rizado las fibrillas o “fase elástica” y en una segunda fase, la elongación se basa en la fuerza tensil estructural del tendón o ligamento y cuando se sobrepasa la resistencia tensil, la elongación continúa en base a la ruptura de los entrecruzamientos covalentes entre las fibrillas (ver Figura 3).

En esta fase (fase viscoelástica) se producen lesiones residuales y un punto de “no retorno”, de manera que si se sobrepasa este punto se produce la fase de rotura tendinosa, que en el caso del TFDS se produce aproximadamente al alcanzar los 12 KN (Riemersma *et al.*, 1988; Crevier-Denoix *et al.*, 1997; Dowling y Dart, 2005); (ver Figura 4).

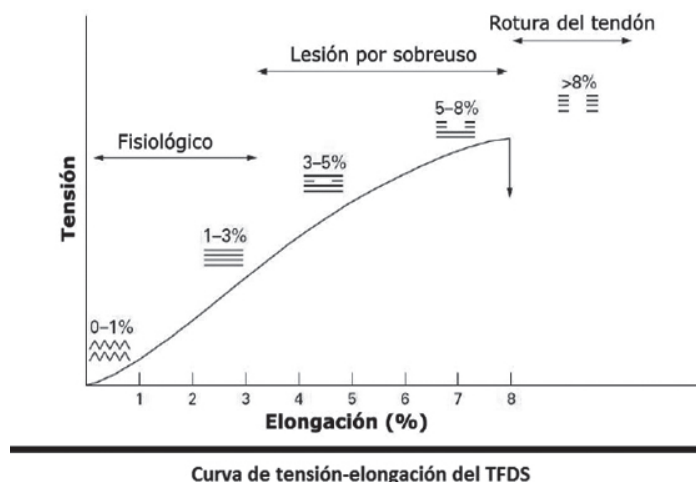


Figura 4

Figura 4. Relación entre la elongación y la tensión sufrida por el TFDS. Modificado de Kannus, P: Tendon pathology: basic sciences and clinical applications. Sports Exerc injury, 3:62, 1997)

b) Degeneración previa a la lesión.

La fase de degeneración se podría considerar como una etapa de cronificación de la fase viscoelástica mencionada anteriormente, donde se han producido daños estructurales en el tendón de una manera continuada. Durante esta fase algunos autores hablan de una inflamación molecular (Patterson-Kane *et al.*, 1997; Birch *et al.*, 1998; Dakin *et al.*, 2014) que no induce un proceso de reparación, sino que va debilitando el tendón de forma progresiva (Smith y Goodship, 2004).

Cuando la causa de la lesión obedece a microtraumatismos repetidos sobre el tendón se habla de lesiones por sobreuso. En este caso no podremos hablar de una lesión aguda sino crónica, y por tanto la podríamos denominar tendinitis crónica siempre y cuando se cumpla que la clínica que asienta en el tendón sea de predominio inflamatorio. Sin embargo esto no es así (Thorpe *et al.*, 2010). Existen opiniones contradictorias a este respecto ya que el análisis histopatológicos de las lesiones por sobreuso no se encuentran elementos inflamatorios a nivel tendinoso sino cambios degenerativos. Por tanto no podría ser utilizado el término tendinitis sino tendinosis para denominar a dicho cuadro clínico

Algunos autores mantienen una dualidad excesivamente marcada entre tendinitis y tendinosis, cuando en realidad no se puede excluir de forma absoluta una entidad cuando predomina la otra (Smith *et al.*, 2002b; Dakin *et al.*, 2014)

Existen varios mecanismos que pueden contribuir a la degeneración del tendón. Por una parte, se ha observado que con la edad disminuye la presencia de TGF- β en el endotendon a la vez que se observa un cierto grado de senescencia y apoptosis tenocítica que ralentiza la producción de matriz extracelular por lo que el tendón no puede hacer frente a los microtraumas producidos. El agotamiento o pérdida de células indiferenciadas en el endotendon o el declive en la señalización de algunos factores de crecimiento es la causa más probable de este fenómeno (Smith *et al.*, 2002b; Thorpe *et al.*, 2015). Durante los fenómenos inflamatorios tendinosos se ha comprobado que algunas citoquinas inflamatorias (IL- α , IL-1 β , TNF- α e IFN γ) se localizan básicamente en el endotendon y en las células epiteliales vasculares (Hosaka *et al.*, 2005). Por otra parte, las repetidas elongaciones y transferencias de energía que se producen durante el ejercicio acarrearán un calentamiento que puede degenerar las proteínas de la matriz debido a la propia hipertermia local y esto podría inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) por parte de los tenocitos; dichas citoquinas, a su vez, inducen la liberación de MMPs y comenzaría así un ciclo de degeneración progresiva estructural (Birch *et al.*, 1997; Hosaka *et al.*, 2005; Xu y Murrell, 2008).

Estos cuadros clínicos se pueden complicar aún más si añadimos la patología de la envoltura externa del tendón, es decir del paratenon. Por todo ello, se considera más conveniente utilizar el término “tendinopatía” para referirse a la patología del tendón (Smith *et al.*, 2002b).

Clásicamente, el dolor en la tendinopatía se atribuye a la inflamación. Sin embargo, las tendinopatías del tendón de Aquiles y las desmopatías de ligamentos rotulianos sin evidencias de inflamación suelen presentar dolor crónico, y por otra parte muchos tendones con lesiones intratendinosas detectados por resonancia magnética o mediante ecografía no son dolorosas (Dean *et al.*, 2015). El dolor puede provenir de una combinación de factores mecánicos y bioquímicos (Alfredson *et al.*, 2003). Algunos neurotransmisores pueden generar dolor en la tendinopatía y de hecho, se han detectado mediante procedimientos de microdiálisis niveles de lactato en tendones lesionados mucho más altos que los que presentaban los tendones normales (Alfredson y Lorentzon, 2002a; Alfredson *et al.*, 2002). En otro estudio realizado por (Alfredson *et al.* 1998), los pacientes con tendinopatía crónica del tendón de Aquiles y tendón rotuliano mostraron altas concentraciones del neurotransmisor glutamato, sin elevación significativa de la prostaglandina PGE2 proinflamatoria (Alfredson, 2005).

Estudios más recientes sobre las tendinopatías humanas han evidenciado en los tenocitos la producción localizada de señalizaciones tradicionalmente confinadas en las neuronas (Backman *et al.*, 2011). Estas sustancias incluyen acetilcolina, catecolaminas, sustancia P y glutamato. Estos hallazgos podrían sentar las bases para entender la influencia de estas señales en el dolor, la regulación vascular y/o los cambios tisulares en las tendinopatías (Alfredson y Lorentzon, 2002b; Tan y Chan, 2008; Thorpe *et al.*, 2015).

3.2.2. Clasificación de las tendinopatías

Para el diagnóstico y clasificación de las diversas formas de tendinopatía se debe considerar cuál es la parte del tendón afectada. En función de ello podemos clasificar las tendinopatías en los diferentes tipos que se describen a continuación.

3.2.2.1. Tendinopatía Aguda

Es la lesión aguda del tendón, también denominada tendinitis. Existe una respuesta celular inflamatoria dentro del tendón. Debe tener una evolución menor de 3 semanas. Este cuadro clínico siempre es doloroso.

3.2.2.2. Paratenonitis

Es la inflamación de las capas externas del tendón y engloba afecciones como la tenosinovitis o la tenovaginitis. En la fase aguda se produce un edema con células inflamatorias, seguido al cabo de horas o días de un exudado fibroso causante de crepitación y limitación del recorrido del tendón dentro de la vaina. Si este cuadro permanece en el tiempo aparece una marcada proliferación de fibroblastos, se desarrolla un tejido conectivo inmaduro y una red de fibrina organizada que constituyen lo que se denominan adherencias. Aparece en esta fase un deterioro del metabolismo anaeróbico, una hiperplasia vascular y una degeneración de las fibras de colágeno del tendón que pueden considerarse características de la tendinosis (Rees *et al.*, 2014).

3.2.2.3. Tendinopatía Crónica

Es la lesión crónica degenerativa del tendón también denominada tendinosis. En histopatología aparece un aumento del número de fibroblastos, colágeno fragmentado y desorganizado, hiperplasia vascular y en muchas ocasiones presencia de microcalcificaciones. La característica principal es que no aparecen células inflamatorias. Este cuadro clínico no siempre es doloroso (Thorpe *et al.*, 2015).

Pueden existir tendinosis con paratenonitis en las que se produce degeneración tendinosa sin respuesta celular inflamatoria dentro del tendón, asociada a una paratendonitis externa donde si existe inflamación. También pueden verse afectadas estructuras cercanas al tendón como son las bursas (Hago *et al.*, 1990).

La sobrecarga mecánica y los microtraumatismos de repetición parecen ser actualmente los factores etiológicos más aceptados en las tendinopatías crónicas. Sin embargo, Smith en 1999 (Birch *et al.*, 1999) describe otros factores intrínsecos y extrínsecos que tienen relación con la patología y que posiblemente sean factores predisponentes a ella, como son:

a) Factores Intrínsecos.

- Conformación de aplooms defectuosa
- Debilidad o desequilibrios musculares.
- Disminución de la flexibilidad muscular.
- Laxitud cápsulo-ligamentosa.
- Edad
- Nutrición-hidratación

b) Factores Extrínsecos.

- Errores de entrenamiento y calentamiento
- Tipo de pista que se utiliza para trabajar
- Velocidad y tiempo de trabajo

3.3. Fisiopatología de la reparación/regeneración del tendón

Existen dos procesos biológicos de cicatrización en el tejido blando: la reparación y la regeneración. La reparación es la restauración del tejido sin que conserve su arquitectura original ni su función, y por tanto modificando sus propiedades físicas y mecánicas. La regeneración de un tejido lesionado es la restauración del mismo con propiedades y características iguales al tejido original conservando así todas sus propiedades. En este sentido debe ir encaminada a facilitar la regeneración (tejido nuevo) frente a la reparación (cicatriz) (Voleti *et al.*, 2012).

Estos dos procesos se desarrollan simultáneamente ante cualquier lesión del tejido blando aunque la capacidad de regeneración está limitada sólo a determinados tejidos.

3.3.1. Mecanismos fisiológicos (Reparación vs. regeneración)

La capacidad de regeneración está limitada sólo a unos determinados tejidos. Se entiende por reparación de un tejido biológico a la restauración de dicho tejido sin que este conserve su arquitectura original ni tampoco su función. Al no recuperar su estado original, sus propiedades mecánicas y físicas son inferiores, esto es una transformación que ocurre espontáneamente y el resultado final es la cicatrización. Se entiende por regeneración, la restauración de dicho tejido cuando éste muestra propiedades indistinguibles del tejido original. A este respecto resulta esencial identificar las diferencias celulares y moleculares que existen entre regeneración (tejido nuevo) y reparación (cicatrización). Las circunstancias por las que un tejido cicatriza en vez de regenerarse, dependerá del contenido de células y señales estimuladoras necesarias para la regeneración (Voleti *et al.*, 2012).

Un requisito para la regeneración es el potencial de división celular, ya que las células se clasifican en lábiles, estables y permanentes basándose en su capacidad para dividirse y por lo tanto, no todas las poblaciones de células diferenciadas están sujetas a regeneración. Si se pierden las células permanentes, éstas no pueden ser sustituidas, tienen una vida larga y por

eso viven en entornos protegidos, es el caso de la mayoría de células nerviosas. Pero la mayoría de células diferenciadas no son permanentes sino que se renuevan. Las nuevas células se pueden originar de dos formas: por duplicación sencilla de las células preexistentes, que se dividen formando células hijas del mismo tipo, o bien se pueden regenerar a partir de células madres no diferenciadas por un proceso de diferenciación que implica un cambio del fenotipo celular (Chong *et al.*, 2009).

En muchos tejidos cuya cinética de renovación es muy lenta se pueden estimular para que produzcan nuevas células a más velocidad. Por ejemplo las células endoteliales de los vasos sanguíneos se renuevan por duplicación y aunque su “turnover” ó recambio es muy lento, se pueden regenerar muy rápido cuando sufren un daño. Es decir, la propia pérdida celular estimula la proliferación por un mecanismo homeostático. Los nuevos capilares se forman (angiogénesis) y el crecimiento de la red capilar está controlado por los factores liberados por lo tejidos de alrededor (Dakin *et al.*, 2014).

La médula ósea es la fuente de células precursoras con capacidad para diferenciarse en distintos tipos de células como osteoblastos, condroblastos, mioblastos, etc. Los distintos tipos de células diferenciadas se deben mantener en las proporciones adecuadas y en la posición correcta y para que se conserve este orden deben de existir señales de comunicación entre las diferentes células. La señalización celular viene determinada por ciertas citoquinas y los factores de crecimiento (Hosaka *et al.*, 2002) Estas proteínas son enviadas de una célula a otra para transmitir una señal concreta de migración, diferenciación y/o activación. Los factores de crecimiento desde una visión funcional los podemos diferenciar en dos tipos (Evans, 1999):

- a) Factores de crecimiento autocrino: interaccionan con los autoreceptores de la misma célula que los sintetiza.
- b) Factores de crecimiento paracrino: ejercen su acción en otra célula adyacente o distante.

Los factores de crecimiento (GFs) son los mediadores biológicos principales, que regulan acontecimientos claves en la reparación del tejido, acontecimientos como la proliferación celular, quimiotaxis (migración celular dirigida), diferenciación celular y síntesis de la matriz extracelular. La unión de los GFs a sus receptores específicos de membrana es lo que desencadena las acciones biológicas, convirtiendo este acontecimiento extracelular (la unión del ligando a su receptor) en un acontecimiento intracelular. Se transmite un estímulo al interior de la célula, donde se amplifica esta señal y se encauza de forma específica. La amplificación de esta señal implica un amplio espectro de enzimas con funciones especializadas (Molloy *et al.*, 2003a).

En la actualidad se reconoce a los GFs como multifuncionales, es decir, pueden por un lado estimular la proliferación de ciertas células y por otro lado inhibir la proliferación de otras y además causar efectos no relacionados con la proliferación en otro tipo de células (Molloy *et al.*, 2003a).

El proceso de curación se lleva a cabo en tres fases diferenciadas: fase de respuesta inflamatoria, fase de reparación fibroblástica y fase de remodelación/maduración. El proceso de curación de los tejidos blandos es una progresión continua. Las fases se superponen y no tienen puntos de comienzo ni final determinados (Voleti *et al.*, 2012).

3.3.1.1. Fase inflamatoria

La lesión en el tejido provoca una lesión celular, una alteración del metabolismo basal y una liberación de sustancias químicas que iniciarán la respuesta inflamatoria.

La respuesta inmediata a la lesión es una vasoconstricción capilar que dura de 5 a 10 minutos, para seguir con una vasodilatación provocada por la liberación de histamina que causa un éxtasis venoso con incremento de la permeabilidad de las células endoteliales vasculares. En este momento comienza la migración de leucocitos hacia la zona de la lesión.

Estos leucocitos (macrófagos y neutrófilos) no sólo fagocitan las sustancias de desecho, sino que además liberan factores de crecimiento necesarios para activar a los fibroblastos. Una vez instaurada la inflamación se va a producir una reacción vascular local que implica la formación de un tapón de plaquetas y el crecimiento de tejido fibroso, formándose un coágulo por la conversión de fibrinógeno en fibrina, de tal manera que se aísla el área lesionada. Esta fase inflamatoria es beneficiosa para el tejido lesionado, ya que en ella se produce una fagocitosis con la intención de eliminar elementos o sustancias producidas por la lesión, preparando el terreno para la regeneración tisular posterior (Manning *et al.*, 2014; Thomopoulos *et al.*, 2015).

Durante esta fase hay un efecto de reclutamiento celular (fibroblastos) que empiezan a sintetizar de forma activa matriz extracelular y comienza una neovascularización en torno a la zona dañada del tendón.

3.3.1.2. Fase proliferativa

Esta fase de crecimiento de fibroblastos se inicia pocas horas después de la lesión y puede durar entre 4 y 6 semanas. Durante este tiempo los síntomas y signos de la inflamación (calor, rubor, tumor y dolor) van remitiendo a medida que el proceso de cicatrización avanza (Thomopoulos *et al.*, 2015).

En este periodo la disminución de la presión de oxígeno que se produce se estimula la proliferación de los capilares hacia el lugar de la lesión, de tal manera que el tejido intenta curar en condiciones aeróbicas. Con este aumento de llegada de sangre se produce un incremento del suministro de oxígeno y los nutrientes necesarios para facilitar la proliferación fibroblástica, y por tanto, la síntesis de los elementos que forman la matriz extracelular. En las tendinopatías crónicas esta neovascularización es de calidad precaria, careciendo la lesión del sufi-

ciente aporte vascular debido a que se produce un mal desarrollo de las paredes de los vasos. Por tanto, el tendón será incapaz de progresar hacia la curación (Pufe *et al.*, 2005a).

Durante el 6º-7º día los fibroblastos comienzan a sintetizar fibras de colágeno principalmente tipo III y gran cantidad de componentes de la matriz extracelular que inicialmente se disponen al azar en el tejido. Éste es el momento clave en el que un estímulo mecánico óptimo favorecerá la alineación y remodelación del colágeno neoformado. A medida que aumenta la fuerza de tensión en el tejido colágeno disminuye el número de fibroblastos, lo que indica el inicio de la fase de maduración (Patterson-Kane y Firth, 2009; Thomopoulos *et al.*, 2015).

3.3.1.3. Fase de remodelación/maduración

En esta fase se lleva a cabo una reorganización o remodelación de las fibras de colágeno que constituyen el tejido cicatricial. En el tendón, a medida que recibe un aumento de tensión, las fibras de colágeno se disponen en paralelo y siguiendo los vectores de la fuerza de tracción. El tejido irá asumiendo una apariencia y un funcionamiento normal y alrededor de las 3 semanas se habrá formado una cicatriz resistente y avascular. Sin embargo es preciso tener en cuenta que la fase de maduración puede durar meses o incluso hasta un año (Sharma y Maffulli, 2006).

Se han propuesto diferentes teorías (mecanismos) para tratar de explicar la causa de la lesión central degenerativa del TFDS equino. Estos mecanismos se pueden dividir en físicos y bioquímicos. Las causas bioquímicas pueden incluir mecanismos por hipoxia-isquemia, reperusión, entre otros. Las causas físicas incluyen sobrecarga e hipertermia (Birch *et al.*, 1997).

Después de la lesión, el proceso de reparación del tendón o ligamento sigue los mismos patrones básicos que se observan en la mayoría de los tejidos corporales. La rotura fibrilar inicial es seguida por hemorragia y formación de un hematoma con la consecuente formación de una malla de fibrina, acompañado de edema e inflamación. Luego, llegan los macrófagos que eliminan los residuos del proceso inflamatorio y de manera superpuesta

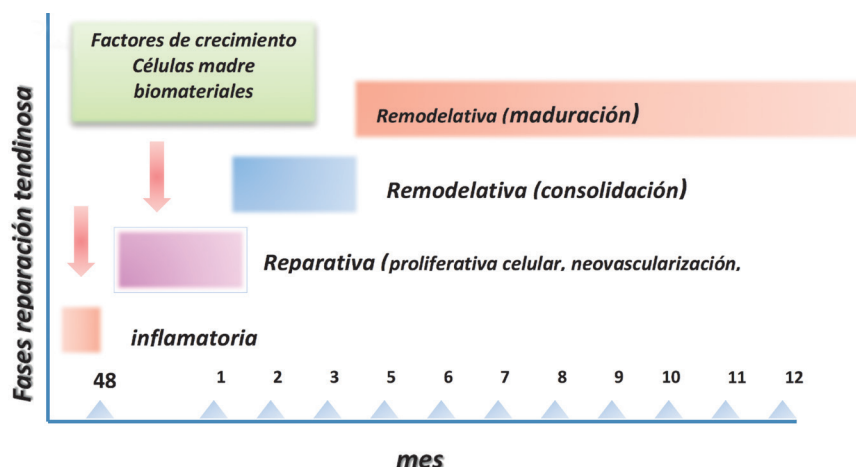


Figura 5. Mecanismos fisiológicos de la reparación/regeneración del tendón

los fibroblastos comienzan a formar una cicatriz. En el nuevo tejido de cicatrización se presenta una deposición inicial desorganizada de colágeno inmaduro (COL-III). Posteriormente, se presenta un proceso de maduración con incremento de fibrillas de (COL-I), que poseen mayor diámetro y son organizadas en distribución paralela, más parecida a la forma tendinosa original. Este proceso puede durar de semanas a meses (Sharma y Maffulli, 2006; Thomopoulos *et al.*, 2015). En la Figura 5 se muestra un esquema de las tres fases de reparación/regeneración descritas.

3.3.2. Mecanismos moleculares

Durante la reparación del tendón, varios factores de crecimiento juegan un papel fundamental en la activación y regulación de la respuesta celular. Estos factores o citoquinas se unen de manera específica a receptores que están presentes en la superficie celular activando una cascada de señalizaciones específicas intracelulares que conducen a la transcripción de genes reguladores específicos. La liberación de estos factores depende de las células que se encuentran en la zona lesionada durante la fase inflamatoria y de remodelación inducidos en parte por la carga mecánica a que es sometido el tendón lesionado (Hosaka *et al.*, 2002; Millar *et al.*, 2009).

El factor TGF- β (Transforming growth factor- β) es una de las señalizaciones biológicas que implica a las células responsables en el proceso de curación del tendón. Durante la fase inflamatoria inicial la expresión de TGF- β es elevada y estimula la proliferación y migración celular así como las interacciones celulares dentro de la zona lesionada (Kashiwagi *et al.*, 2004). La síntesis de Colágeno COL-I y COL-III se eleva durante las fases posteriores. Una de las isoformas del factor TGF- β es responsable de iniciar el proceso de cicatrización pero si este aumento de expresión continua muy elevado durante las fases posteriores de la cicatrización se produce una cicatriz hipertrófica de baja funcionalidad por lo que puede ser un regulador negativo en el proceso cicatrizante (Klein *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2004). Además TGF- β modula la producción de colágeno durante el proceso fisiológico del tendón sometido a estrés mecánico (Heinemeier *et al.*, 2003).

Durante el proceso de reparación inicial y después de fase aguda inflamatoria, la regulación positiva de factores de crecimiento y citoquinas tales como (IGF-1), (Insuline Grow Factor-1), estimulan también la migración y proliferación fibroblástica (Chen *et al.*, 2008; Lane *et al.*, 2013) e incluso en tendones no afectados pueden ser almacenados como precursores inactivos y tras la lesión, pueden liberarse para ejercer sus funciones biológicas. En la fase de remodelación IGF-1, estimula la síntesis de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular e incluso estudios realizados han demostrado su efecto dosis-dependiente (Dahlgren *et al.*, 2002). Estudios posteriores en modelo equino en tendinitis del tendón flexor superficial han demostrado que tanto la proliferación celular como la síntesis de colágeno aumentaban con el tratamiento intralesional de IGF-1 de forma que estos tendones tratados incluso se comportaban de manera más rígida y menos elástica (Dahlgren *et al.*, 2002).

El factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF (Platelet Derived Grow Factor) induce la expresión de otros factores de crecimiento tales como IGF-1 durante la fase inicial reparativa. Además la aplicación de este factor de crecimiento en lesiones inducidas en modelos animales aumenta la proliferación celular y la síntesis de colágeno incluidos otros componentes de la matriz extracelular de forma dosis-dependiente (Sakiyama-Elbert *et al.*, 2008; Thomopoulos *et al.*, 2009; Branford *et al.*, 2014). Otros estudios han demostrado que una liberación lenta y gradual de PDGF en el área de lesión es deseable para conseguir un tejido mejor regenerado y lo más funcional posible (Hsu y Chang, 2004).

Otro factor de crecimiento que está involucrado en la proliferación la angiogénesis y la actividad mitótica fibroblástica es el B-FGF (Basic Fibroblast Growth Factor) (Chan *et al.*, 2000)). Este factor ha sido inmunolocalizado en fibroblastos y células inflamatorias en la fase reparativa de la lesión (Khan et al 1996). B-FGF ha sido estudiado en modelos animales para tratamiento de heridas observándose una cicatrización significativamente más rápida en los animales tratados de forma periódica (Chan *et al.*, 2000; Molloy *et al.*, 2003a; Thomopoulos *et al.*, 2010). En este sentido, las células estromales de médula ósea (BMSCs) adicionadas con dosis bajas de bFGF mostraron una mayor proliferación celular y una mayor expresión de componentes de matriz extracelular por lo que se sugiere que el b-FGF puede jugar un papel importante en los procesos regenerativos en los que intervienen células madre mesenquimales obtenidas de la médula ósea (Hankemeier *et al.*, 2005).

El factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (Vascular Endotelial Grow Factor) es crítico en la neovascularización y fundamental para el establecimiento y mantenimiento de la vascularización presente en el endotendón y epitendón (Zhang *et al.*, 2003). La expresión del VEGF durante la fase de reparación tendinosa muestra una expresión bifásica en la mayoría de las células que se encuentran en la zona dañada (Molloy *et al.*, 2003a; Petersen *et al.*, 2004; Pufe *et al.*, 2005a).

La aplicación de la Proteína Morfogenética Ósea (BMP-12, 13 y 14 (también conocido como Factor de crecimiento / diferenciación (GDF-7, 6 y 5) o proteína morfogenética derivada de cartilago (CDMP-3, 2 y 1, respectivamente) conduce a la formación de tejido conectivo similar al tendón. En modelos animales se ha comprobado que el tratamiento de lesiones tendinosas con GDF también facilita la reparación del tendón (Forslund *et al.*, 2003; Eliasson *et al.*, 2008).

Así pues, podemos decir que existen numerosos factores de crecimiento/ diferenciación implicados en la reparación del tendón que regulan la síntesis y expresión tanto de los componentes de la matriz extracelular como del colágeno I y III (Molloy *et al.*, 2003a; Riley, 2005; Wang, 2006; Sun *et al.*, 2008; Millar *et al.*, 2009) y regulan la expresión de genes específicos que juegan un papel fundamental en la tendinogénesis (Figura 6).

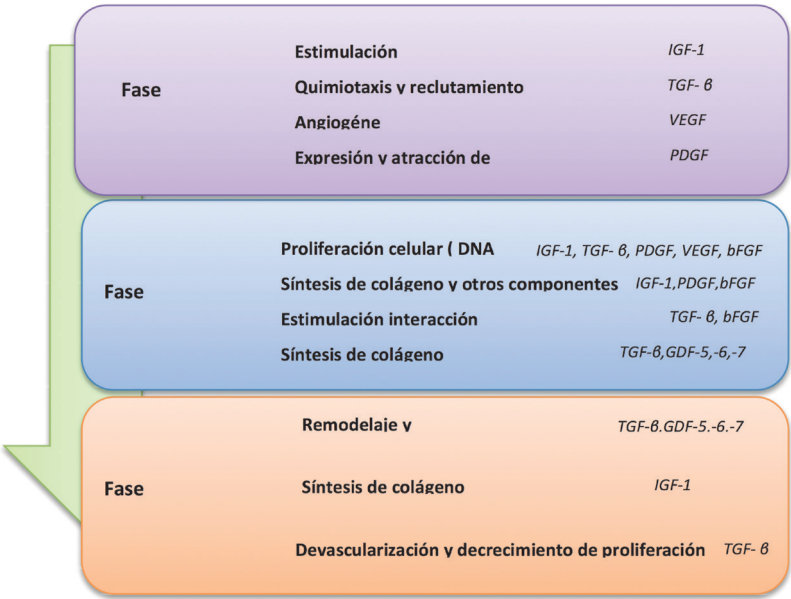


Figura 6. Factores de crecimiento que regulan la reparación del tendón. (Modificado de Molloy et al: The roles of growth factors in tendon and ligament healing; Sports.Med.2003 33.5)

3.4. Diagnóstico de las lesiones tendinoligamentosas

Los tejidos blandos están diseñados para resistir fuerzas de manera repetitiva y de distinta intensidad, sin sufrir cambios en su estructura y funcionamiento.

En el caso de los tendones y ligamentos, la capacidad de estiramiento viene dada por las cualidades elásticas del colágeno.

El aparato suspensor de la parte distal del miembro que está conformado por los tendones flexores y ligamentos como el suspensor del menudillo y los sesamoideos distales, ejercen un efecto de polea de tensión durante proceso tensil que sufren los tendones (Marcoux, 1999).

Las tendinitis generalmente se categorizan y diagnostican por los signos clínicos de calor, aumento de volumen y dolor a la palpación del tendón, unido a la presencia o no de claudicación. Los signos clínicos frecuentemente aparecen posterior a las lesiones de los tendones, y un caballo con signos clínicos leves puede estar en el umbral de una tendinitis que sea lo suficientemente severa como para evitar su retorno a la actividad deportiva (Marr *et al.*, 1993; Smith y Goodship, 2004).

En las dos últimas décadas, la ultrasonografía ha sufrido grandes avances en el diagnóstico de patologías en la especie equina, transformándose en una herramienta de gran importancia para la detección de alteraciones que no pueden ser detectadas por otros métodos de diagnóstico por imager. Esta técnica fue introducida en los caballos durante la década del 70, utilizándose inicialmente en reproducción de yeguas; y a partir de los años 80, se ha utilizado de forma cotidiana para la evaluación de lesiones en tendones y articulaciones.

El uso de la ultrasonografía o ecografía permite determinar a fondo la localización y la extensión de la lesión. Desempeña un papel fundamental también en el seguimiento de casos clínicos, ya que permite planificar el protocolo adecuado de rehabilitación según la evolución ecográfica de la lesión del caballo. En la gestión de planificación de la fase de rehabilitación, lo ideal sería realizar varios controles ecográficos seriados cada 2-3 meses (Smith y Davis, 2006). Para lograr el diagnóstico preciso del alcance de la lesión, el área lesionada, debe ser evaluada de 4-7 días después de la lesión inicial, ya que muchas lesiones tienden a expandirse pocos días después de la lesión primaria (Smith y Davis, 2006).

Dyson y Denoix recomiendan el uso de un transductor lineal ó convexo con una frecuencia entre 7.5 a 10 MHz para obtener imágenes ecográficas de buena calidad. La frecuencia del transductor tiene que ser capaz de permitir la visualización de toda la sección de la TFDP (Dyson y Denoix, 1995).

Por otro lado el transductor debe tener un contacto perfecto con la extremidad también para las exploraciones longitudinales y por esta razón la ventana de la sonda no debe ser demasiado amplia (Dyson y Denoix, 1995). Las estructuras que se encuentran en la región palmar del metacarpo pueden ser evaluadas adecuadamente mediante la colocación de la sonda en el aspecto palmar de la extremidad. El estudio de una lesión tendinosa debe realizarse mediante la toma de imágenes transversales y longitudinales a lo largo de todo el tendón tomando las medidas pertinentes principalmente de la longitud y del área de sección de la lesión.

El orden en el que se visualiza una imagen ecográfica de la cara palmar del metacarpo es el siguiente: La primera estructura cercana al transductor es la piel, la segunda estructura que se visualiza es la TFDS cuya estructura ecográfica es bastante homogénea. Este tendón presenta una forma redondeada en la región metacarpiana proximal y más aplanada conforme se va reconociendo el tendón distalmente. Entre la superficie palmar del tendón y la piel hay una delgada línea anecoica, que se corresponde con el líquido sinovial dentro de la vaina del tendón.

El TFDP es ligeramente más ecogénico y ovalado en comparación con el TFDS: sus porciones proximales y medias son de una mayor sección en el borde lateral que en el medial, mientras que la parte distal es más amplio. Medialmente al TFDP se pueden visualizar estructuras anecoicas que corresponden con vasos sanguíneos (arteria y vena mediana) que pueden ser diferenciadas de una lesión tanto para la presencia de flujo de sangre como por la localización, fuera de la delimitación de los bordes del tendón.

La brida carpiana (LA-TFDP) ó ligamento accesorio del TFDP se puede observar en el tercio proximal del metacarpo; se separa de la TFDP por una capa anecoica, que es el líquido sinovial dentro de la vaina carpiana. En condiciones normales, esta brida es la más ecogénica entre estas estructuras, especialmente en el tercio distal, donde se va haciendo más delgada en su sección para terminar fundiéndose con el TFDP. Entre entre la Brida carpiana (LA-TFDP)

y el Ligamento suspensor del menudillo (SL) se pueden visualizar las venas palmares medial y lateral del menudillo (Palmer *et al.*, 1994).

Las características lesionales que se puede evaluar mediante el estudio ecográfico son: el aumento de volumen, la modificación de la forma, las alteraciones de la ecogenicidad, el patrón de fibras, y la reacción inflamatoria perilesional.

La pérdida de ecogenicidad en un tendón lesionado puede deberse o bien a los daños a la estructura de fibrillas o bien debido al proceso inflamatorio subyacente (con hemorragia, edema e infiltración celular de las primeras etapas). En general, el aumento en el contenido de agua en el tejido provoca una disminución de la ecogenicidad.

En las tendinitis agudas, las características ecográficas pueden ser: aumento del volumen del tendón, ecogenicidad disminuida (ya sea en general o focal), reducción del patrón de la disposición fibrilar en la sección longitudinal, posición y bordes modificados ó poco definidos e incluso puede haber zonas completamente anecoicas.

En cambio las tendinopatías crónicas se presentan, con un aumento de volumen que varía ampliamente de la sección que corresponde al tendón normal, ecogenicidad poco homogénea y alteración del patrón de fibras en las secciones longitudinales.

Es muy útil para evaluar la dimensión, forma y apariencia ecográficas del tendón lesionado realizar un estudio comparativo del tendón contralateral de forma simultánea aunque esto es a veces complicado llevarlo a cabo, ya que muchas patologías generalmente son bilaterales (Smith y Davis, 2006).

El aspecto palmar del metacarpo está dividido en seis zonas, cada una más o menos 4 cm de largo (1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B). Zona 1 incluye el comienzo de inserción del LSM y la salida de los tendones flexores de la vaina carpiana. Zona 2 cubre el tercio medio del metacarpo e incluye las estructuras tendinosas distales, la porción distal de la (LA-TFDP) y la ramificación del LSM. La zona 3 corresponde al tercio distal del metacarpo incluyendo el menudillo. El metatarso es más largo y se divide así en ocho zonas (añadiendo 4A y 4B) (Rantanen *et al.*, 2003).

La dimensión de la lesión debe ser evaluada tanto en exploraciones longitudinales y transversales. La colocación de la sonda para realizar cortes ecográficos longitudinales debe ser proximal-distal a la lesión y en ellos se evalúa principalmente el grado de alineación de fibras a lo largo del tendón. La colocación de la sonda para realizar los cortes ecográficos transversales debe ser transversal al eje longitudinal de la estructura evaluada pudiendo medir en ellos el porcentaje de área dañada (%CSA) en relación al área total del tendón. El estudio ecográfico completo nos permite también comprobar si la afección tendinosa está dentro de la matriz del tendón (lesión central ó core lesión) o se extiende a los márgenes del tendón (lesión marginal) (Rantanen *et al.*, 2003).

Para caracterizar las lesiones de tendones y ligamentos deben ser evaluados los siguientes parámetros (Craychee, 1995):

- Región o sitio de la lesión
- Longitud de la lesión
- Modificación o cambios de la ecogenicidad (TES)
- Patrón de la ecogenicidad modificada (es decir, homogénea o no, focal o difusa)
- Alteración del patrón longitudinal de las fibras del tendón (FPS)
- Área de sección de la lesión respecto al área total en %. (%CSA)
- Los cambios en el aspecto de la lesión con el tiempo. Evolución ecográfica.

La clasificación de la lesión también se puede hacer mediante un sistema de puntuación basado en el patrón de ecogenicidad propuesto por Rantanen en 2003. (Rantanen *et al.*, 2003)

- Puntuación 0: isoecoicos
- Puntuación 1: escasamente hipoeogénica
- Puntuación 2: ecogenicidad mixta (50% anaechogenic isoecoicos y 50%)
- Puntuación 3: totalmente (o casi) anaechogenic.

La evaluación del área de sección transversal (%CSA) de la lesión es un parámetro importante para la cuantificación del daño y la gravedad de la lesión. Debe medirse en el punto de máxima extensión de la zona dañada, en la exploración transversal ecográfica (Smith, AAEP 2008):

- $\leq 10\%$ lesión leve
- 10%-40% lesión moderada
- $\geq 40\%$ lesión severa.

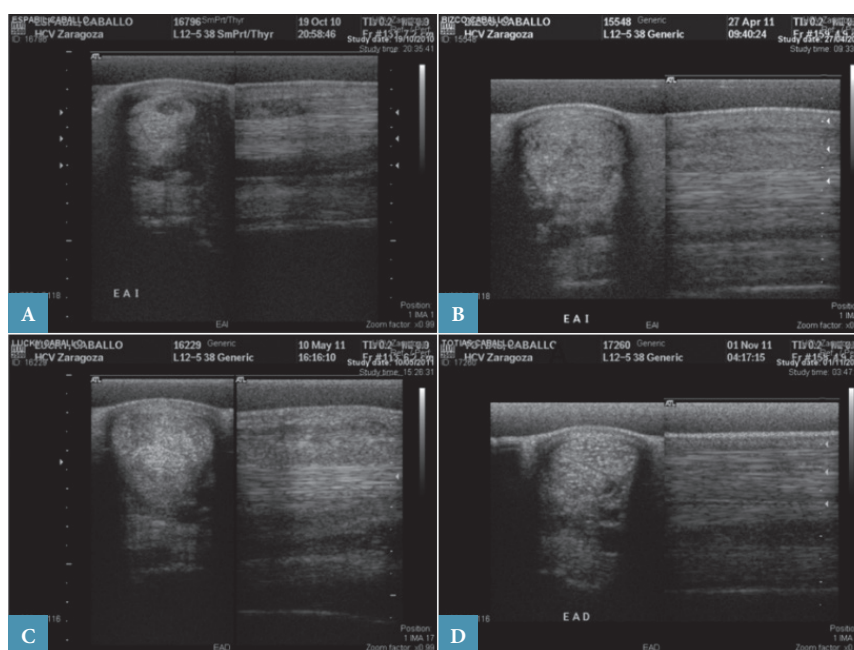


Figura 7. La imagen A, representa una lesión caracterizada ecográficamente (TES)3, FPS (3) y CSA moderada. La imagen B, representa una lesión caracterizada ecográficamente (TES)2, FPS (2) y CSA severa. La imagen C, representa una lesión caracterizada ecográficamente (TES)1, FPS (2) y CSA severa y la imagen D, representa una lesión caracterizada ecográficamente (TES)0, FPS (1) y CSA leve

También hay un sistema de puntuación para valorar el grado de alineación de las fibras del tendón mediante la exploración ecográfica longitudinal propuesto por Genovese y Rantanen en 1998 (Rantanen y McKinnon, 1998).

- Puntuación 0: >75% de las fibras son paralelas
- Puntuación 1: 50%-75% de las fibras son paralelas
- Puntuación 2: 25%-50% de las fibras son paralelas
- Puntuación 3: <25% de las fibras son paralelas.

3.5. Terapia convencional de las lesiones tendinoligamentosas

3.5.1. Terapias basadas en métodos físicos

3.5.1.1. Crioterapia y vendaje

La aplicación de crioterapia provoca vasoconstricción inicial, por tanto una disminución del aporte sanguíneo y del metabolismo celular, y la vasodilatación refleja si la aplicación se mantiene en el tiempo. Se debe tener en cuenta también que el hielo provoca un efecto analgésico sobre las terminaciones nerviosas y una reducción de la temperatura local.

Actualmente no existe consenso en la aplicación de crioterapia en cuanto al tiempo de aplicación, repeticiones o si aplicarlo en lesiones agudas o en lesiones crónicas. Lo que sí parece claro es que su uso debe buscar la vasoconstricción, luego debería realizarse en tiempos cortos. Algunos autores consideran la crioterapia indicada en la etapa post-esfuerzo (Smith y Davis, 2006).

Hoy en día hay nuevos productos comerciales que permiten la posibilidad de aplicar la presión en función del ciclo junto con el agua fría. Las compresiones cíclicas estimulan el drenaje linfático y transmiten el frío también a las capas más profundas (Dahlgren, 2009).

En la fase aguda de la lesión controlar la inflamación y el apoyo a la extremidad lesionada es esencial. Los vendajes aumentan la presión del fluido intersticial mejorando el drenaje linfático de los tejidos edematizados (Henninger, 1994). Por eso se suele recomendar en casos de tendinitis la aplicación de vendajes compresivos suaves. Este vendaje se puede cambiar todos los días o incluso más a menudo en el caso de la aplicación repetida de hielo / agua fría (Dahlgren, 2009).

3.5.1.2. Ultrasonidos

El ultrasonido tiene efecto sobre la reducción de la inflamación y sobre los procesos de reparación tisular. Se han descrito efectos positivos sobre la estimulación de la síntesis y la mejora de la alineación de las fibras de colágeno. También se le han atribuido beneficios en la estimulación de la división celular en periodos de proliferación.

La aplicación de ultrasonidos en los tendones equinos dañados quirúrgicamente reveló resultados histológicos muy positivos. Cuatro semanas después del tratamiento no se encontraron zonas degeneradas o signos de reacción inflamatoria. Tras 6 semanas post-tratamiento el tendón mostraba mejorías evidentes, quedando tan sólo una pequeña cicatriz (Morcos y Aswad, 1978).

3.5.1.3. Ondas de choque

Las ondas de choque se han convertido bien solas ó bien combinadas con tratamientos regenerativos en una herramienta popular en el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas equinas aunque los mecanismos físico-biológicos de actuación sobre los tejidos lesionados siguen siendo en parte desconocidos.

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

Bajo esta denominación, con frecuencia se incluyen dos tecnologías distintas: ESWT (Extracorporeal Shock-Wave Therapy) y RPWT (Radial Pressure-Wave Therapy).

En las primeras (ESWT), el mecanismo físico de producción es electrohidráulico, la emisión de energía es focalizada y hay una pérdida de energía mínima al profundizar en los tejidos porque son focalizadas, mientras que en las segundas (RPWT), el mecanismo de producción es neumático, produce ondas de presión mucho más débiles que las ESWT, su emisión es radial y no focalizada y su capacidad de penetración en los tejidos es menor.

Sus aplicaciones clínicas han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de estructuras tendinosas en el caballo, como la tendinitis del tendón flexor digital superficial (TFDS) (Kersh *et al.*, 2006) y desmitis del ligamento suspensorio (McClure *et al.*, 2004), pero en modelos animales experimentales estos resultados han sido más contradictorias.

Se ha demostrado que la terapia con ondas de choque aumenta la resistencia a la rotura de los tendones y aumenta la síntesis de hidroxiprolina en animales de experimentación (Chen *et al.*, 2004b) demostró que algunos Factores de crecimiento que juegan un roll importante en la reparación de los tejidos como son Factor de Crecimiento Transformante β 1 (TGF- β 1) y Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 (IGF-I), se incrementaron después de la aplicación de ondas de choque en el Tendón de Aquiles de las ratas.

Sin embargo Maier (Maier *et al.*, 2002) encontró un aumento de células inflamatorias y edema en el paratenon después de la aplicación de ondas de choque en el tendón de Aquiles en conejos ó después de una única aplicación.

Estos hallazgos sugieren que las ondas de choque puede promover la regeneración de los tejidos estimulando el metabolismo tendinoso y a la vez podrían ser potencialmente perjudiciales

para este tejido. La fase reparativa tendinosa se sabe que responde a estímulos mecánicos y la síntesis de colágeno aumenta mediante estimulación mecánica, lo que indica que el entorno biomecánico es probablemente un factor importante para la regeneración del tendón. Este hecho está en consonancia con los resultados obtenidos por (Malaviya *et al.*, 2000) que demuestra la capacidad de los tenocitos para alterar su morfología y la matriz de síntesis en respuesta a la carga mecánica (Awad *et al.*, 1999). Esta capacidad de responder a los estímulos mecánicos podría explicar el éxito descrito por diferentes autores.

McClure (McClure *et al.*, 2004) estudió los efectos de las ondas de choque en un modelo equino mediante inducción con collagenasa de una desmitis del ligamento suspensor del menudillo de las extremidades anteriores encontrando una mejoría de los ligamentos tratados frente a los controles tanto ultrasonográficamente como histológicamente (proliferación de fibroblastos y aumento de colágeno fibrilar).

Estos efectos anabólicos, mayor proliferación celular, expresión de citoquinas anabólicas como TGF- β 1, IGF-I, aumento de GAGs, que producen las ondas de choque parecen ser transitorios ya que a más largo plazo este efecto se diluye (Bosch *et al.*, 2007).

En algunas lesiones crónicas, la ESWT ha evidenciado un efecto analgésico local perceptible a las 8 horas y que aumenta hasta alcanzar un pico máximo alrededor de las 48 horas, siendo aún significativo al tercer día después de la aplicación (Dahlberg *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos con la RPWT no parecen tan evidentes (Bolt *et al.*, 2004).

Aparte de estas terapias físicas están otras muchas de las que se tiene poca información, al menos en clínica equina, como son las terapias basadas en laser, utilización de campos eléctricos y magnéticos y radiaciones ionizadas.

También, podemos nombrar en este apartado aunque no es objeto de nuestro estudio, la fisioterapia, un campo que está teniendo un notable éxito en la medicina deportiva equina y su aplicación está extendiéndose de forma generalizada sobre todo en caballos deportivos de élite.

3.5.2. Terapias tópicas

Existe una gran variedad de alternativas de uso tópico, tanto de frío (lodo, geles, hielo, hidroterapia) como de calor (pomadas rubefacientes, cataplasmas, blisters).

La aplicación de diferentes sustancias antiinflamatorias tópicas vehiculadas mediante dimetil sulfoxido DMSO es una práctica habitual en medicina equina y con resultados de eficacia demostrada a lo largo de los años. Al DMSO se le atribuyen funciones tanto antiinflamatorias, secuestrante de radicales libres así como vehiculante de diferentes productos debido a sus características químicas hidrofílicas. (Brayton, 1986; Caldwell *et al.*, 2004).

La aplicación de blisters (rubefacientes) de base mercurial ó a base de cantaridinas ha provocado algunas intoxicaciones descritas en la bibliografía (Schuh *et al.*, 1988).

3.5.3. Terapias médico-quirúrgicas

El tratamiento de la tendinitis deL TFDS puede resultar frustrante, debido a la dificultad de restaurar su función y estructuras previas. Aún si la cicatrización ha ocurrido, la probabilidad de lesionarse nuevamente es alta. La cicatriz tendinosa es muy poco elástica y está altamente predispuesta a sufrir nuevas lesiones. Sólo el 20% de los caballos de carreras con tendinitis corre nuevamente dos o más carreras después de la lesión inicial (Robinson *et al.*, 1998).

La selección del tratamiento para la tendinitis del TDFS depende de varios factores como la severidad de lesión, la edad, el tipo de trabajo que realiza y el valor del caballo.

La terapia inicial para la tendinitis aguda está dirigida a reducir la inflamación y el edema. Para ello, se recurre a una combinación de medidas tópicas y sistémicas.

Los medicamentos anti-inflamatorios: el uso de corticosteroides de corta acción en la fase hiper-aguda de la lesión (menos de 24 horas después de la lesión) parece reducir la reacción inflamatoria, pero no hay evidencias de un mejor resultado final con su uso. El uso de corticoides en la fase crónica / subaguda inhibe la retroalimentación fibroblástica que es esencial para la curación del tendón. El uso intralesional de corticosteroides puede causar daños como necrosis colagénica y hialinización.

El dymethylsulfoxide (DMSO) ha sido ampliamente utilizado para su actividad anti-inflamatoria. Tiene buena capacidad de entrar en membranas de las células e inactivar los radicales libres que son perjudiciales para el tejido circundanteperilesional.

El uso de medicamentos no esteroides antiinflamatorios (AINEs), como la fenilbutazona y el flunixin meglumine, ha dado resultados controvertidos en el tratamiento antiinflamatorio. Son útiles para reducir la inflamación, el edema y el dolor, cuando se utilizan dentro de las dos primeras semanas después de la lesión, aunque deben considerarse efectivos sólo por su poder analgésico. La prolongada utilización de estos fármacos provoca efectos colaterales tales como nefropatías, úlceras gástricas ó cólicos graves por colitis (Robinson *et al.*, 1998; Dahlgren, 2009).

Hialuronato de sodio: el ácido hialurónico es una sustancia natural presente en alta concentración en el líquido sinovial de las articulaciones y las vainas tendinosas. También tiene un papel estructural en los tejidos conectivos. Su uso para la inyección intralesional o peritendinosa como tratamiento para la tendinitis aguda presenta resultados contradictorios.

Los estudios preliminares en animales de laboratorio muestran que la alta viscosidad y el peso molecular del gel de hialuronato de sodio, inyectado entre el tendón y su vaina (uso peritendinoso) pueden favorecer la cicatrización del tendón y limitar las adherencias. Gaughan promovió un estudio en tendinitis equinas observando que los caballos tratados no desarrollaron adherencias significativas con los tejidos peritendinosos. También se obtuvieron buenos resultados en lo que respecta a la rapidez y la calidad del tejido reparado (Gaughan, 1994). Spurlock y colaboradores también obtienen buen resultado el tratamiento de 63 caballos con tendinitis del TFDS con Hilartil V: 60% de los caballos tratados mostraron curación ecográfica de la lesión en un lapso de tiempo medio de 6 meses (Spurlock *et al.*, 1999).

La inyección intra-lesional de hialuronato sódico no parece reducir la incidencia de recaídas sobre la base de la evolución clínica, cuando se comparan los casos de los caballos tratados y no tratados (Dahlgren, 2009). El uso de ácido hialurónico no es común debido a su alto costo y las dificultades de adquisición.

Glicosaminoglicanos polisulfatado (PSGAGs): Los glicosaminoglicanos (GAG) son un componente importante del cartílago. Los PSGAGs simplemente son GAG sulfatados. Este fármaco actúa inhibiendo enzimas ligadas a la destrucción del cartílago y reduce la inflamación sinovial. Los PSGAGs se han utilizado para el tratamiento de enfermedades degenerativas articulares durante varios años. En el tratamiento de la tendinitis se utilizan en el fase inicial inflamatoria y están destinados a reducir la inflamación y el dolor (Dahlgren, 2009). Así en un estudio realizado en varios caballos con una lesión inducida con colagenasa en el TFDS se pudo observar que el tratamiento con PSGAGs aceleró la recuperación del tendón con respecto a los caballos control. Estos resultados se evaluaron tanto ecográficamente como histológicamente (Oryan *et al.*, 2008).

En otro estudio realizado en caballos con tendinitis del TFDS y tratados con PSGAGs demostró que esta terapia permitió volver a la actividad deportiva a los caballos de forma más rápida que otros animales tratados con otras terapias conservadoras. En otro estudio llevado a cabo por Dow, se aplicaron PSGAGs en 150 caballos con tendinitis aguda del TFDS. En el 80% de los casos tratados en dicho estudio el tratamiento aplicado condujo a un resultado favorable con una tasa media de retorno a la actividad del 72% (Dow *et al.*, 1996).

Sin embargo en otro estudio de 140 caballos tratados para tendinitis del TDFS, se comparó la incidencia de recurrencia entre los animales tratados en forma tradicional (ejercicio controlado), el tratamiento con ácido hialurónico intralesional, glicosaminoglicanos intralesionales y sistémicos y glicosaminoglicanos sistémicos solamente. En este estudio ningún caballo debía iniciar su programa de ejercicios hasta 12 a 16 meses después de la lesión, dependiendo de la apariencia lesional en la evaluación ecográfica. No se observaron diferencias significativas en la incidencia de recurrencias de la lesión entre los caballos tratados tradicionalmente y los animales tratados con ácido hialurónico o glicosaminoglicanos polisulfatados (Dyson, 2004).

β -aminopropionitrilo fumarato (Baptan): Ha sido el medicamento más prometedor en el tratamiento de la tendinitis aguda desarrollado hasta la aparición de la medicina regenerativa. El mecanismo de acción y su participación en el curso del proceso de reparación han sido extensamente debatidos. Para algunos investigadores, este fármaco no acelera el proceso de reparación del tendón lesionado, sino que mejora la calidad del tejido cicatrizal formado. El Baptan reduce las fibras de colágeno que se depositan de manera desorganizada durante la fase de cicatrización temprana y favorece la disposición longitudinal de las mismas (Dahlgren *et al.*, 2001).

Este fármaco puede alterar la cicatriz en formación debido a que inhibe la enzima Lisil-Oxidasa, necesaria para la desaminación de la lisina, primer paso importante en la formación de la cicatriz y en la formación de enlaces cruzados que se establecen entre tejidos conectivos proteicos como el colágeno y la elastina. Esta interrupción en el depósito de puentes cruzados de colágeno durante la fase inicial de la cicatrización, crea una oportunidad de remodelar la cicatriz hacia un estado más fisiológico y funcional (Reef *et al.*, 1997).

Rehabilitación: La aplicación de un programa de rehabilitación adecuado es muy importante: Existen varios trabajos científicos que demuestran que la posibilidad de retomar la actividad deportiva sin incurrir en una recaída es muy bajo, por lo que el descanso y un período de rehabilitación no menor a 6 meses es de vital importancia (Dowling *et al.*, 2000).

Basados en el seguimiento ecográfico y la experiencia clínica, se realizó un estudio de 2800 caballos con lesiones tendinosas y/o de ligamentarias. El protocolo de rehabilitación propuesto en dicho estudio recomienda paseos de 15 minutos/día desde el primer mes, incrementando 15 minutos/día cada mes, sin sobrepasar los 40-60 minutos diarios. Sólo se permitieron paseos con jinete de 20 minutos en los casos leves, y no antes del tercer mes. Los casos exitosos requirieron de 8-9 meses de rehabilitación antes de retornar al trabajo previo que hacía el animal (Gillis, 1996).

Tratamientos quirúrgicos: En los casos de tendinitis del TFDS de grado moderado a grave o en aquellos casos en los cuales la terapia médica ha fallado (Ross, 1997). Existen básicamente 2 técnicas, la desmotomía del ligamento accesorio del flexor superficial y la tenotomía del cuerpo tendinoso. Adicionalmente, cuando el tendón flexor superficial se lesiona a nivel del menudillo y existe constricción del ligamento anular palmar, la desmotomía de dicho ligamento también está indicada (Dahlgren, 2009). La desmotomía del ligamento accesorio fue propuesta en 1986 para tratar algunas tendinitis del TFDS. Al seccionar el ligamento accesorio del TFDS el momento de máxima tensión aplicada en el TFDS se reduce y se traslada y aumenta la del músculo.

Los resultados obtenidos después de la desmotomía son muy variados. Un porcentaje que varía entre el 52% y el 82% de los caballos tratados vuelve a la competición al mismo o mayor nivel que antes (Dowling *et al.*, 2000).

En un estudio realizado sobre 62 caballos pura sangre, el 92% de los pacientes volvió a los entrenamientos y el 66% participó en sucesivas carreras. Sólo el 19% de los caballos tuvo una recurrencia de la tendinitis tratada mediante este procedimiento quirúrgico. Estos resultados fueron más satisfactorios en comparación a los obtenidos mediante tratamientos conservadores. Sin embargo el postoperatorio requiere de una rehabilitación adecuada ya que en un estudio retrospectivo, se ha demostrado que el ejercicio temprano post-desmotomía provoca un empeoramiento ecográfico de la tendinitis (Dowling *et al.*, 2000).

Se han publicado varios estudios del efecto a largo plazo de la desmonotomía del ligamento accesorio del TFDS. Si bien los datos son contradictorios, la gran mayoría de los autores son receptivos a este procedimiento. Así en un estudio de 38 caballos que se sometieron a dicha cirugía se observó que un 89% (33) completaron al menos 5 carreras después de la cirugía, en 6 de ellos reapareció la tendinitis, pero los otros 27 restantes no presentaron recaídas (Hawkins y Ross, 1995).

Es muy frecuente realizar la intervención en ambos miembros aunque solo exista tendinitis en uno de ellos (Hawkins y Ross, 1995).

Dentro de los tratamientos quirúrgicos, el “Splitting” del TFDS es una técnica relativamente simple que puede realizarse bajo sedación y anestesia local. En la mayoría de los casos se hace al mismo tiempo que la desmotomía del ligamento accesorio. Esta técnica se viene utilizando desde 1931, para el tratamiento de las tendinitis crónicas. Consiste en el corte longitudinal del tendón para reagudizar lesiones en la masa fibrótica de la cicatriz que se ha formado en el tendón. Estas lesiones se realizan un par de centímetros de distancia la una de la otra en uno o más planos paralelos al eje longitudinal del tendón.

El procedimiento se cree que conduce a una mejora de la vascularización, pero estudios recientes han demostrado que lo que se consigue es incrementar en la zona lesionada la producción de tejido de granulación; por lo que no se consigue mejorar la calidad de la cicatriz tendinosa formada.

El “splitting” se ha propuesto recientemente para el tratamiento de lesiones agudas. Esta técnica quirúrgica permite el drenaje de hematomas y la formación de edema intra-tendinoso, la reducción de la dimensión de la lesión y la mejora de la alineación de las fibrillas de colágeno (Dowling *et al.*, 2000). Un estudio clínico demostró cómo el “splitting” en tendones afectados por inflamación aguda y con lesión dentro del parénquima tendinoso “core lesión”, producía una reducción significativa de la sección de la lesión, y por tanto, de la clasificación de la lesión dentro de los primeros 8-10 días tras la cirugía. El 81% de los caballos tratados retomó la actividad deportiva y el 68% de ellos recuperó el mismo nivel competitivo que tenían antes de lesionarse. Estos resultados fueron bastante significativos considerando lesiones con un promedio del 80% de la CSA del tendón (White y Moore, 1998).

Otras técnicas quirúrgicas aplicadas a las lesiones tendoligamentosas, son la tenorrafia, la aplicación de implantes sintéticos (Smith y Davis, 2006) (Fibras de carbono, implantes de polipropileno) (Vaughan *et al.*, 1985), desmotomía del ligamento anular (Smith y Davis, 2006), fasciotomía (Smith y Davis, 2006).

3.6. Terapia regenerativa de lesiones tendinoligamentosas

3.6.1. PRPs (plasma rico en plaquetas)

3.6.1.1. Definición y mecanismo de acción

El primer factor de crecimiento (Nerve Growth Factor; NGF) fue descubierto en 1948 por Rita Levi Montalcini y el segundo (Epidermal Growth Factor; EGF) en 1952 por Stanley Cohen. Ambos fueron galardonados con el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en 1986, como reconocimiento a sus trabajos sobre los factores de crecimiento.

A finales de los 80, a raíz de los trabajos de Matras, se comenzó a utilizar la fibrina adhesiva en distintas aplicaciones de cirugía maxilo-facial. El objetivo principal era sellar e impedir el sangrado. Posteriormente se utilizó este adhesivo de fibrina en cirugía ortopédica como artroplastias (Akizuki *et al.*, 1997) y reparaciones meniscales (Ishimura *et al.*, 1997). A partir del año 2001, se empieza a utilizar rutinariamente en el tratamiento de patologías del aparato locomotor (Sanchez *et al.*, 2003).

Las plaquetas provienen de los megacariocitos, tienen una vida corta, circulando por el torrente sanguíneo durante sólo 7 a 10 días. Su número puede variar dentro de valores considerados normales desde 150.000 a 400.000. Contribuyen a evitar la pérdida sanguínea cuando se produce una lesión vascular. Además, las plaquetas transportan sustancias que influyen en los procesos de reparación tisular como la angiogénesis, inflamación y respuesta inmune. Esta actividad se debe a las diferentes proteínas contenidas en sus gránulos. Las plaquetas secretan estas proteínas con el proceso de agregación durante la formación del coágulo. El calcio es un cofactor necesario para la agregación y la formación de la fibrina, siendo también un regulador en la reparación tisular. Parece claro, que la propiedad de las plaquetas es la de secretar un conjunto de proteínas en el lugar mismo de la lesión, induce la reparación tisular y la remodelación de la matriz extracelular. En esta última década se han aprovechado las propiedades de las plaquetas, aplicandose en diversas lesiones y en diferentes especialidades médicas y quirúrgicas (Abellonet, I. 2009).

Se denomina Plasma Rico en Plaquetas (PRP) al plasma que contiene más plaquetas que la sangre periférica.

En los últimos años se han comercializado diferentes sistemas de concentración de plaquetas, existiendo en la actualidad más de 30 de dichos sistemas. Pocos de ellos se sustentan en trabajos de investigación básica o aplicada. Los diversos sistemas se comercializan bajo nombres y acrónimos diferentes, pero todos ellos bajo el concepto de PRP. Algunos de estos sistemas concentran las plaquetas por encima del millón, mediante una doble centrifugación que por otra parte podría dañar las plaquetas (Marx, 2004).

Se ha demostrado que una elevada concentración de plaquetas puede provocar un efecto contrario al deseado. Se sabe que dos de los factores de crecimiento son fundamentalmente plasmáticos factor de crecimiento insulínico y el factor de crecimiento hepático (IGF y HGF) por lo que su concentración permanece constante independientemente del número de plaquetas. Si concentramos mucho las plaquetas, rompemos el equilibrio entre los factores de crecimiento plaquetarios y los plasmáticos, alterando la actividad biológica del conjunto. No se conoce bien el efecto de la presencia de leucocitos en el PRP, pero si concentramos 4 ó 5 veces las plaquetas y leucocitos, podremos tener más de 40.000 leucocitos/cm³, lo que podría provocar efectos indeseados en el paciente tratado, ya que éstos son la principal fuente de metaloproteinasas (MMP), que destruyen el colágeno. Las plaquetas contienen también MMPs, pero además contienen simultáneamente inhibidores naturales de las metaloproteinasas, inhibidores tisulares de las metaloproteinasas en plasma (TIMPS). Este equilibrio MMP/ TIMP es importante para la actividad biológica de las plaquetas y se rompe con la presencia de los leucocitos. Marx (2004) señaló que la clave del efecto regenerativo de los APCs (Autologous Platelet Concentrates), acuñado por dicho autor como Plasma Rico en Plaquetas o PRP, está asociada más que con la concentración, con el número de plaquetas vivas que contenga el concentrado plaquetario (Marx, 2004).

En ese sentido, las plaquetas deben ser manipuladas cuidadosamente durante la extracción venosa y durante todo el procesado e inoculación del concentrado plaquetario. La inyección de una dosis superior a lo normal de plaquetas vivas en tejidos lesionados podría dar lugar a una respuesta similar a la inducida cuando ocurre una lesión tisular. Marx y colaboradores (Marx, 2004) recomiendan que el número de plaquetas concentradas en un PRP debería ser mayor de 106/ μ L, otros como (Anitua *et al.*, 2004; Mehta y Watson, 2008) han demostrado que concentraciones hasta de 300.000 plaquetas/ μ L pueden inducir un efecto terapéutico similar.

3.6.1.2. Principales factores de crecimiento contenidos en el PRP

En general, los factores de crecimiento pueden ser definidos como sustancias polipeptídicas solubles y que actúan como agentes reguladores de la proliferación, diferenciación y metabolismo celular a través de las interacciones que establecen con receptores específicos de la membrana de las células diana. Esto conduce a una serie de fenómenos intracelulares que afectan a la expresión de genes que codifican funciones metabólicas, tales como la división celular o la síntesis de determinadas proteínas. Además, los factores de crecimiento pueden inducir la migración de otras células hasta el lugar donde se encuentran, de modo que ejercen

un importante estímulo quimiotáctico para células tales como los leucocitos y fibroblastos, estirpes celulares de vital importancia en los procesos de reparación-regeneración tisular (Canalis, 1992; Murphy y Nixon, 1997).

Los factores de crecimiento son sintetizados por una amplia variedad de tipos celulares y pueden ejercer su efecto sobre el metabolismo celular a nivel local, o bien pasar a circulación sistémica. En circulación, los factores de crecimiento se pueden encontrar libres o unidos a proteínas, o bien se pueden encontrar en el interior de los gránulos α de las plaquetas, de los cuales serán liberados tras el proceso de activación plaquetaria (Canalis, 1992; Mehta y Watson, 2008). A nivel local, los factores de crecimiento pueden actuar de forma autocrina (sobre las mismas células que los producen) y/o paracrina (sobre otras estirpes celulares situadas en las cercanías), regulando las funciones celulares (Eppley *et al.*, 2004).

A menudo, el mismo factor de crecimiento puede ser sintetizado por varios tipos celulares diferentes (Canalis, 1992). Las acciones de cada uno de estos factores de crecimiento dependen de un buen número de variables. Entre ellas cabe incluir el tipo celular expuesto, el microambiente tisular (densidad celular, tensión de oxígeno), la concentración del factor de crecimiento y la presencia o ausencia de otros factores de crecimiento al mismo tiempo. Así pues, el efecto de los factores de crecimiento difiere en función de los tejidos y el momento fisiológico ó patológico en el que se aplica (Adler y Kent, 2002; Mehta y Watson, 2008).

En 1979 se consiguió aislar y estudiar las propiedades citoproliferativas de un factor de crecimiento derivado de las plaquetas humanas (Kaplan *et al.*, 1979).

Estudios más recientes han puesto de manifiesto que los gránulos α plaquetarios contienen una gran variedad de factores de crecimiento, que pueden ser específicos de las plaquetas, o bien pueden ser encontrados además en otras estirpes celulares. Los principales factores de crecimiento liberados tras la activación plaquetaria son IGF-I, VEGF, PDGF, NGF, TGF- β 1, TGF- β 2, EGF y HGF etc. (Rendu y Brohard-Bohn, 2001; Reed, 2002; Anitua *et al.*, 2005b; Christgau *et al.*, 2006).

A continuación pasamos a describir las principales funciones fisiológicas y su relevancia clínica de los más destacados factores de crecimiento.

3.6.1.2.1. Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF)

El PDGF fue aislado por primera vez del interior de la plaquetas, (Deuel *et al.*, 1981) y de ahí su nombre. Se encuentra principalmente en los gránulos plaquetarios α , donde es almacenado (Anitua *et al.*, 2004; Marx, 2004; Mehta y Watson, 2008), aunque también puede ser encontrado en macrófagos, células endoteliales, monocitos, células de músculo liso vascular, fibroblastos, matriz ósea y diversas estirpes de células neoplásicas. (Antoniades y Pantazis, 1989; Reed, 2002).

Se trata de una proteína dimérica y en la actualidad se reconocen cuatro tipos de subunidades diferentes: PDGF-A y PDGF-B PDGF-C y PDGF-D (Deuel *et al.*, 1981; Fredriksson *et al.*, 2004).

Todos los PDGFs comparten los mismos receptores tirosín-kinasa (Heldin *et al.*, 1981); el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas α (PDGFR- α) y β (PDGFR- β) (Dai, 2010).

a) Funciones biológicas de PDGF

El PDGF es un potente activador de las células de origen mesenquimal (Pierce *et al.*, 1991). Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto un destacado efecto mitogénico sobre fibroblastos, osteoblastos, células de músculo liso vascular y células de la glía (Ross *et al.*, 1986). Además de sus propiedades mitogénicas, el PDGF posee otros muchos efectos biológicos. Este factor de crecimiento tiene un potente efecto quimiotáctico sobre fibroblastos, células de músculo liso y células inflamatorias (Canalis *et al.*, 1989). El PDGF estimula la síntesis de diversos componentes de la matriz extracelular del tejido conectivo, como glicosaminoglicanos (ácido hialurónico) o proteoglicanos (Bowen-Pope y Ross, 1984; Hsu y Chang, 2004). Además de esto, el PDGF modula importantes procesos relacionados con la remodelación tisular, tales como la endocitosis o la migración celular (Canalis *et al.*, 1989).

Las investigaciones dirigidas hacia el esclarecimiento del papel que desempeña el PDGF en los procesos de reparación-regeneración son muy numerosas, en particular porque se trata de uno de los primeros factores de crecimiento detectables en el foco de lesión tras un daño tisular (Hsu y Chang, 2004).

b) El PDGF en la cicatrización tendinosa

El PDGF juega un papel importante durante los procesos de cicatrización tendinosa (Duffy *et al.*, 1995). Se ha propuesto que el PDGF desempeña su papel fundamentalmente durante las fases más precoces de la cicatrización tendinosa, induciendo la síntesis de otros factores de crecimiento, tales como IFG-I (Molloy *et al.*, 2003a; Branford *et al.*, 2014). Aunque estudios *in vitro* han evidenciado que el PDGF también desempeña un importante papel durante la fase de remodelación tisular (Canalis *et al.*, 1989; Grazul-Bilska *et al.*, 2003). El PDGF estimula la síntesis de colágeno y de otras proteínas de la matriz extracelular tendinosa de manera dosis dependiente (Molloy *et al.*, 2003a; Branford *et al.*, 2014).

Posteriormente, otros autores han demostrado que la aplicación de PDGF en el sitio de lesión ligamentosa incrementa la calidad de la cicatrización (Kang y Kang, 1999). Estudios más recientes han demostrado que la liberación de PDGF durante el proceso de cicatrización tendinosa mejora la funcionalidad del tendón reparado (Haupt *et al.*, 2006; Suwalski *et al.*, 2010).

3.6.1.2.2. Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β)

La familia TGF- β comprende un gran número de factores de crecimiento relacionados desde el punto de vista estructural, cada uno de los cuales tiene capacidad para regular importantes procesos celulares (Vogel y Hernandez, 1992).

Dentro de esta familia encontramos a su vez importantes subfamilias, como la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Nauth *et al.*, 2010), que desempeñan importantes funciones durante el desarrollo embrionario, y posteriormente en la etapa postnatal y adulta. En los mamíferos se han descrito tres isoformas del TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, (Chen *et al.*, 2008).

Los gránulos alfa plaquetarios resultan ser el mayor reservorio de TGF- β , encontrándose en las plaquetas concentraciones de 40 a 100 veces superiores en comparación con otros tejidos no neoplásicos. En el hueso también se han detectado concentraciones importantes de TGF- β .

El TGF- β también puede ser secretado por linfocitos, macrófagos (Branford *et al.*, 2014).

a) Funciones biológicas de TGF- β

El TGF- β es un péptido regulador de importantes funciones biológicas, tales como la proliferación, migración y metabolismo celular. Este factor de crecimiento puede tanto estimular como inhibir la diferenciación y proliferación celular, dependiendo de su concentración, del tipo celular al cual es expuesto y del ambiente tisular en el que se encuentra (Kiritsy y Lynch, 1993). En general, se considera que el TGF- β estimula las células de origen mesenquimal, mientras que produce la inhibición de las de origen ectodérmico (Mendias *et al.*, 2012). El TGF- β participa en el crecimiento y desarrollo tanto embrionario como adulto, en la respuesta inflamatoria y en los procesos de reparación tisular (Sprugel *et al.*, 1987). Este factor de crecimiento también desempeña un importante papel en la regulación del sistema inmune, ya que interviene en diversos procesos relacionados con la apoptosis, selección y activación de las células T (Shalaby y Ammann, 1988; Futosi *et al.*, 2013)

Además de este efecto estimulador/inhibidor de la proliferación celular, el TGF- β posee otras muchas e importantes funciones biológicas. El TGF- β estimula la síntesis de colágeno y fibronectina por parte de los fibroblastos en condiciones *in vitro* (Roberts *et al.*, 1986; Mendias *et al.*, 2012) al mismo tiempo que inhibe la producción de proteasas y estimula la secreción de sustancias inhibitorias de las proteasas. El TGF- β también regula las acciones de otros muchos factores de crecimiento, influenciando ya sea positiva o negativamente la dirección de sus efectos (Holley *et al.*, 1985; Rees *et al.*, 2009)

b) El TGF- β en la cicatrización tendinosa

El TGF- β participa de manera activa prácticamente durante todas las fases de la cicatrización tendinosa y desempeña importantes funciones en la zona de reparación tisular, tales como la estimulación de la migración de células extrínsecas, regulación de la actividad de las proteasas, estimulación de la producción de colágeno y cese de la proliferación celular (Millar *et al.*, 2009)

La expresión génica de TGF- β 1 aumenta drásticamente poco después de producirse un daño en el tendón, y se cree que este factor de crecimiento juega un papel importante en la respuesta inflamatoria inicial tras el daño tisular (Branford *et al.*, 2014).

Estudios *in vitro* en cultivo celular de epitendón y endotendón mostraron que las tres isoformas de TGF- β incrementaban significativamente la producción de colágeno tipo I y III (los tipos de colágeno más abundantes en el tendón) y la viabilidad celular (Klass *et al.*, 2009; Branford *et al.*, 2014).

Estudios *in vivo* sobre un modelo experimental de daño tendinoso han puesto de manifiesto que altas dosis de TGF- β 1 exógeno pueden llegar a producir efectos deletéreos sobre la reparación del tendón, como por ejemplo formación de adhesiones y fibrosis, lo cual conlleva una considerable disminución del rango de movilidad tendinosa (Molloy *et al.*, 2003b).

3.6.1.2.3. Factor de Crecimiento Insulínico (IGF)

La familia IGF está compuesta por dos miembros: el Factor de Crecimiento Insulínico tipo I (IGF-I) y el Factor de Crecimiento Insulínico tipo II (IGF-II). Tanto IGF-I como IGF-II son sintetizados por un gran número de tejidos en el individuo adulto, si bien IGF-II se sintetiza predominantemente durante el desarrollo fetal, la síntesis de IGF-I se mantiene a niveles altos en tejidos adultos tales como hígado, corazón, pulmón, etc (Fryszak *et al.*, 2015). Tras su síntesis, IGF-I puede actuar de manera local sobre los tejidos adyacentes (efecto autocrino/paracrino), o bien puede entrar en circulación y desempeñar su función sobre tejidos alejados (efecto endocrino) (Fryszak *et al.*, 2015).

La síntesis de IGF está regulada principalmente por la hormona de crecimiento (GH) que estimula la síntesis de IGF-I, principalmente a nivel hepático (Lindsey y Mohan, 2015). Tras la síntesis de IGF, sobre todo en el hígado, es liberado al torrente sanguíneo, donde es capturado por las plaquetas mediante un mecanismo de endocitosis, para posteriormente ser almacenado en el interior de los gránulos α (Reed, 2002).

Tanto IGF-I como IGF-II poseen receptores diferentes. Se conocen seis proteínas que se unen a IGF (IGFBPs) y presentan el IGF a sus receptores, o bien modulan su actividad biológica tras ligarse a las formas libres de IGF. El balance dinámico entre la forma libre y la forma unida a proteínas condiciona de manera importante los efectos biológicos de IGF (Jennische y Matejka, 1992).

a) Funciones biológicas de IGF

IGF son proteínas anabólicas con una amplia variedad de funciones biológicas. Entre éstas cabe resaltar la replicación celular, la síntesis de glucógeno, proteínas y glicosaminoglicanos, y el transporte de glucosa y aminoácidos a través de la membrana celular. El sistema locomotor es una de las principales dianas de la acción de IGF. Entre sus funciones cabe destacar el incremento en la formación de cartílago y hueso, así como el descenso en la degradación de la matriz extracelular de estos tejidos. Por tanto, IGFs son considerados importantes estimulantes del crecimiento esquelético y juegan un papel muy relevante en el mantenimiento de la masa ósea (Trippel, 1998; Lindsey y Mohan, 2015).

IGF-I es un potente agente quimiotáctico para células endoteliales. El IGF-I liberado por las plaquetas o producido por los fibroblastos puede promover la migración de células del endotelio vascular hacia las zonas de reparación-regeneración tisular, produciendo un incremento en el ritmo de neovascularización del área (Bennett y Schultz, 1993).

b) El IGF en la cicatrización tendinosa

IGF-I desempeña numerosas y variadas actividades durante la cicatrización tendinosa y muscular. (Molloy *et al.*, 2003). Su papel primordial es estimular la proliferación y migración de fibroblastos y otras células al tejido dañado, y de esta manera, incrementar la producción de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular durante las fases de remodelado (Musaro, 2005). Al igual que ocurre con otros factores de crecimiento, la actividad estimulante de IGF-I presenta sinergismo con otras moléculas, como por ejemplo PDGF (Molloy *et al.*, 2003b).

Diversos investigadores han intentado desarrollar aplicaciones terapéuticas de IGF-I para fomentar la cicatrización tendinosa, aprovechando sobre todo su actividad mitogénica sobre los tenocitos. En un modelo experimental de tendinitis inducida por colagenasa, la inyección de IGF-I produjo una mejoría en la cicatrización tendinosa, tanto desde el punto de vista histológico como biomecánico (Dahlgren *et al.*, 2002; Schnabel *et al.*, 2009).

3.6.1.2.4. Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF)

La familia FGF, también conocida como Factores de Crecimiento Ligados por Heparina (HBGF), está compuesta por un gran número de proteínas que van desde FGF-1 a FGF-23 entre los que destaca el factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF) (Moscatelli *et al.*, 1988).

Las células del endotelio vascular, los macrófagos y las plaquetas son las principales fuentes de bFGF (Kiritsy y Lynch, 1993). Una importante característica de los miembros de la familia FGF es su capacidad de ser ligados por la heparina y el heparán-sulfato, de modo que en muchas ocasiones el análisis inmunohistoquímico de los tejidos en busca de bFGF revela la asociación de este factor de crecimiento al heparán-sulfato de la matriz extracelular y de la membrana basal (Barrientos *et al.*, 2014).

a) Funciones biológicas de FGF

La familia FGF posee una importante actividad mitogénica, quimiotáctica y angiogénica sobre una amplia variedad de estirpes celulares. Tanto FGF-1 como bFGF poseen un marcado efecto mitogénico sobre células de origen mesodérmico y neuroectodérmico, siendo bFGF más potente que FGF-1 (Canalis, 1992). FGF posee propiedades angiogénicas, lo cual es de vital importancia para los procesos de neovascularización durante la reparación-regeneración tisular (Barrientos *et al.*, 2014).

b) El FGF en la cicatrización tendinosa

Con respecto a la reparación tendinosa, bFGF produce una estimulación en la proliferación de los fibroblastos del tendón. Los niveles de bFGF están incrementados hasta las 8 semanas tras el daño tendinoso, encontrándose en mayor concentración en los tenocitos del epitenon, y en las células inflamatorias y fibroblastos de la vaina tendinosa (Hsu y Chang, 2004).

Estudios *in vivo* en un modelo experimental de daño tendinoso en rata mostraron que la aplicación de bFGF conducía a un incremento en la proliferación celular y en la síntesis de Colágeno tipo III (Chang *et al.*, 1998).

El bFGF está implicado en la respuesta proliferativa y angiogénica del tendón tras sufrir un daño, pero también fomenta la síntesis de colágeno, lo cual puede contribuir a la creación de adherencias que limiten el deslizamiento del tendón a través de su vaina (Hsu y Chang, 2004).

3.6.1.2.5. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

VEGF fue descubierto a principios de los años 80, y se le llamó Vascular Permeability Factor. Se trata de una sustancia secretada por las células tumorales que incrementaba la permeabilidad de los vasos sanguíneos y que clínicamente producía el acumulo de líquido ascítico (Senger *et al.*, 1983).

Actualmente se conocen cinco isoformas de VEGF. Son numerosas las diferentes tipos celulares que secretan VEGF, y entre ellas cabe destacar: plaquetas, neutrófilos, células del endotelio vascular, queratinocitos, tenocitos y astrocitos (Hsu y Chang, 2004).

La actividad biológica de VEGF está mediada por la unión y activación de sus receptores (VEGFR). Se conocen tres isoformas de estos receptores: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. Estos receptores se expresan predominantemente en células endoteliales (Hsu y Chang, 2004)

a) Funciones biológicas de VEGF

VEGF juega un papel preponderante en el desarrollo embriológico del sistema cardiovascular, en la angiogénesis de la retina y en otros procesos que requieren fases de neovascularización (Dvorak *et al.*, 1995). Además de participar en los procesos normales de angiogénesis, VEGF está implicado en los estados de angiogénesis patológicos, tales como el crecimiento tumoral (Connolly *et al.*, 1989).

Tras la unión a los receptores correspondientes, VEGF induce la síntesis de enzimas tales como colagenasa y gelatinasa, las cuales ayudan a romper la membrana basal vascular (uno de los primeros pasos en los procesos de angiogénesis). Además de esto, también induce la expresión de α -integrinas (fundamentales en los procesos de neovascularización), y acaba provocando una vasodilatación y un aumento en la permeabilidad vascular, así como en la migración de células endoteliales y monocitos (Dvorak *et al.*, 1995).

VEGF, al igual que el resto de factores de crecimiento, es fundamental en los procesos de reparación-regeneración tisular. El VEGF desempeña un papel importante en las fases precoces de migración y proliferación celular, es un factor de crecimiento más activo y determinante en las fases proliferativas y de remodelado, donde se muestra como un potente agente estimulante de la angiogénesis (Molloy *et al.*, 2003a).

b) El VEGF en la cicatrización tendinosa

VEGF ha sido detectado en diferentes fibroblastos y tenocitos, y parece ser que juega un papel importante en la angiogénesis del tendón. Los niveles de VEGF son insignificantes en el tendón de Aquiles intacto, sin embargo sus niveles se incrementan tras la ruptura tendinosa (Pufe *et al.*, 2005a).

Un incremento en los niveles de VEGF dentro del lugar de la lesión se correlaciona con un patrón de crecimiento vascular de los vasos sanguíneos desde el endotendon hacia

el foco de lesión, proporcionando células extrínsecas, nutrientes y factores de crecimiento en el área lesionada.

El mecanismo terapéutico del VEGF que se le atribuye, es la aceleración del proceso de cicatrización tendinosa mediante un aceleramiento en los procesos de angiogénesis (Pufe *et al.*, 2005a).

3.6.1.3. Utilización de PRPs en el tratamiento de lesiones tendinoligamentosas

Probablemente el uso clínico más extendido de los PRPs tanto en medicina equina como en humana es en el tratamiento de lesiones tendoligamentarias.

El tendón es un tejido pobremente vascularizado, por lo que el proceso de cicatrización en este tejido es siempre lento e incierto. Al igual que el tejido cartilaginoso, los tendones son un tipo de tejido con una baja tasa metabólica. Este hecho hace que el tejido tendinoso soporte perfectamente condiciones de tensión durante largo periodo de tiempo, pero por el contrario hace que los procesos que requieren gran actividad metabólica, como el proceso de cicatrización, ocurran más lentamente (Sanchez *et al.*, 2009). El efecto que el PRP ejerce sobre el proceso de cicatrización tendinosa es similar al que ocurre en la cicatrización de cualquier otro tejido. Las plaquetas contenidas en plasma enriquecido, una vez activadas, liberan el contenido de sus gránulos plaquetarios.

Como hemos descrito anteriormente, estos gránulos contienen gran cantidad de diferentes factores de crecimiento, que desempeñan un papel destacado en el proceso de cicatrización del tendón (Molloy *et al.*, 2003a).

Algunos de estos factores de crecimiento tienen potentes efectos quimiotácticos y proliferativos sobre fibroblastos, y a la vez estimulan la síntesis de matriz extracelular por parte de estas células. Además del aporte de estos factores de crecimiento, las terapias con PRP proporcionan otras muchas proteínas bioactivas y estructurales, como por ejemplo fibrina, fibronectina o vitronectina, que facilitan la adhesión intercelular y forman una matriz tridimensional en el lugar de la lesión, que resulta fundamental para una correcta cicatrización del tendón (Anitua, 2001).

Estos mismos autores estudiaron el efecto del PRP sobre la proliferación celular *in vivo*. Para ello, realizaron tratamientos de PRP en el tendón de Aquiles en un modelo ovino. Los inyectados con PRGF presentaron un incremento significativo en la celularidad y una mayor neovascularización que los tendones control (Anitua *et al.*, 2006).

Existen una serie de estudios *in vitro* que han puesto de manifiesto el efecto positivo que ejerce el PRP sobre los procesos anabólicos de los tenocitos. Schnabel y colaboradores (2007) demostraron *in vitro* que explantes procedentes del TDFS de caballo expuestos a PRP sobreexpresaban genes responsables de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (colágeno tipo I, colágeno tipo III) y de proteína oligomérica de matriz del cartílago (COMP)

(Smith *et al.*, 2006; Schnabel *et al.*, 2007) (Smith y col 2006, Schnabel y col 2007, 2008). Además, también se observó que los cultivos celulares de tendón expuestos a PRP presentaban un patrón de expresión de genes más favorable para los procesos de reparación tendinosa que los cultivos expuestos a aspirados de médula ósea (McCarrel *et al.*, 2014).

Ultimamente se ha podido observar que el uso de PRPs en cultivos de células mesenquimales de diferentes orígenes, mejoran las tasas de proliferación y expansión de las mismas (Huang y Wang, 2010; Liao *et al.*, 2015) e induce a la diferenciación osteogénica tanto *in vitro* como *in vivo* (Huang y Wang, 2012).

El efecto del PRP ha sido evaluado en la especie equina tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrando efectos positivos en tendón equino *in vitro*, (Haupt *et al.*, 2006) e *in vivo*, (Dahlgren *et al.*, 2002).

Bosch y colaboradores (2010) evaluaron el efecto del PRP sobre la cicatrización del tendón, usando para ello un modelo experimental equino donde se inducía quirúrgicamente una lesión en el TDFS. Veinticuatro semanas tras la inducción de la lesión se realizó un estudio bioquímico, biomecánico e histológico de los tendones tratados. El estudio demostró que la aplicación de PRP en el tendón lesionado provocó un incremento en la actividad metabólica del tejido cicatrizado, con propiedades biomecánicas e histológicas mejores que los tendones control (Bosch *et al.*, 2010).

Sobre este mismo modelo experimental, los autores demostraron que los tendones tratados con PRP presentaron al final de estudio, un mayor grado de neovascularización frente a los control tras una única administración de PRP (Bosch *et al.*, 2011a). Estos mismos autores aplicaron un análisis computerizado de las imágenes ecográficas del tendón a lo largo del periodo de estudio para monitorizar el proceso de cicatrización. Empleando esta metodología, se observó que los tendones tratados con PRP presentaron un aspecto ecográfico de cicatrización más próximo al fisiológico que los tendones control (Bosch *et al.*, 2011).

Se ha descrito el uso de PRP en casos de tendinopatías (Abellanet, 2009) y desmopatía del ligamento suspensorio (Waselau *et al.*, 2008). Abellanet llevó a cabo un estudio clínico controlado en el que se evaluó el uso de PRP obtenido mediante el método del doble centrifugado en tubo (Arguelles *et al.*, 2006), en 72 caballos con tendinopatía del TDFS, 10 con tendinopatía del TFDP y 16 con lesiones del ligamento suspensorio. Los caballos con tendinopatía del tendón flexor digital superficial presentaron una mejoría clínica del 80% vs 45% para el grupo control (n=9). De los caballos que fueron tratados con PRPs presentaron recidiva el 22% en comparación con el 80% del grupo control. Los caballos con tendinopatía del flexor digital profundo presentaron mejoría del 100% en comparación con el 0% del grupo control (n=4) y una recidiva del 17% en los caballos tratados. Los caballos con desmopatía del ligamento suspensorio presentaron mejoría clínica el 90% vs 0% del grupo control (n=16) y tuvieron una tasa de recaída del 10%.

Carmona *et al.* (2009) realizaron un estudio *in vitro* sobre explantes de membrana sinovial equina preacondicionada con lipopolisacáridos en el que se compara dos tipos de PRPs, uno con leucocitos y otro puro. Los resultados sugieren que las respuestas conjuntas anabólicas y anti-inflamatorias dependen de la concentración de leucocitos y plaquetas de la preparación de PRP y del volumen de PRP aplicado. Además, es posible que los preparados de PRP leucorreducidos sean más eficaces en el tratamiento médico de los pacientes con OA y sinovitis inflamatoria que los tratados con PRP puros (Rios *et al.*, 2015).

3.6.1.4. Tratamiento con PRP: Consideraciones en torno a su aplicación y viabilidad plaquetaria

Según la literatura revisada y particularmente por los resultados obtenidos tanto *in vivo* en modelos experimentales (Bosch *et al.*, 2010; Bosch *et al.*, 2011) y en estudios clínicos con lesiones naturales (Abellanet, 2009) existe una buena respuesta terapéutica al uso de PRP a partir de dosis de plaquetas tan bajas como 300.000/ μ L (Arguelles *et al.*, 2008) Abellanet 2009) y tan altas como más de 106/ μ L (Waselau *et al.*, 2008) (Waselaw y col 2008).

Los resultados de Abellanet (Abellanet, I. 2009) confirman, especialmente para lesiones de tejidos blandos, que a mayor número de aplicaciones de PRP, se observa una mejor respuesta clínica y un menor número de recaídas y que la aplicación de 3 e incluso 4 dosis con un intervalo de 10-15 días es un esquema posológico adecuado (Abellanet, 2009). Este mismo autor indica que algunos biomarcadores anabólicos declinan 15 días después de la aplicación intraarticular o intrasínovial de PRPs en caballos. Así pues y como conclusión podemos decir que el PRP constituye un excelente tratamiento analgésico y antiinflamatorio para las lesiones agudas de tendones, ligamentos y articulaciones y sólo existen limitaciones teóricas, que sugieren su aplicación únicamente en la fase proliferativa de la lesión, especialmente tendinosa (Schnabel *et al.*, 2007).

3.6.1.5. Efectos adversos asociados al uso terapéutico de los PRP

En los estudios clínicos publicados hasta este momento no se han detectado efectos secundarios importantes asociados a la aplicación local de PRP en el tratamiento de lesiones musculotendinosas.

Algunos autores plantearon la hipótesis que la aplicación de PRP podría inducir una fibrosis excesiva debido a que se incrementaba la concentración de TGF- β 1 en la zona de la lesión, y este factor de crecimiento se ha asociado a la formación mas activa de tejido fibroso (Anitua *et al.*, 2007). Sin embargo, el empleo de PRP sobre modelos experimentales *in vivo* ha puesto de manifiesto que esto no es así, probablemente porque dentro de la compleja formulación de sustancias bioactivas existente en el PRP puedan existir otras moléculas que modulen el efecto fibrótico del TGF- β 1 (Anitua *et al.*, 2006).

A pesar de los efectos beneficiosos descritos todavía existe controversia en la comunidad científica acerca de la utilidad clínica de las aplicaciones del PRP en el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas (Engebretsen *et al.*, 2010; Kon y Filardo, 2011; Paoloni *et al.*, 2011).

Como hemos visto, a pesar que la mayoría de los estudios experimentales demuestran que el PRP fomenta los procesos de cicatrización tisular, los estudios clínicos que se han publicado hasta la fecha presentan resultados muy variables. Probablemente, esta variabilidad en los resultados clínicos sea achacable a la falta de homogeneidad a la hora de procesar la sangre autóloga para obtener el PRP. A día de hoy existen tanto en medicina humana como en veterinaria una gran cantidad de protocolos para el aislamiento del PRP, que varían en cuestiones tan importantes como son el volumen de sangre necesario para el aislamiento, el protocolo de centrifugado, el número de centrifugaciones, el volumen de PRP aislado o la metodología de fraccionamiento (Hessel *et al.*, 2015).

En pacientes equinosse han realizado más de 1.000 inyecciones de APCs, obtenidos mediante el método de doble centrifugado en tubo sin ningún tipo de complicación, aunque algunos caballos afectados por enfermedad articular desarrollaron un ligero derrame sinovial durante las primeras 48 horas después de la inyección (Arguelles *et al.*, 2008; U Carmona *et al.*, 2013).

Es posible que estas efusiones sinoviales transitorias estén relacionadas con la presencia de leucocitos en el PRP. Sin embargo, el PDGF liberado durante la activación plaquetaria también podría contribuir con este problema, ya que es un poderoso factor de crecimiento quimiotáctico para leucocitos periféricos (Nimni, 1997).

(Álvarez *et al.*, 2010) demostraron que los PRP obtenidos mediante el método del tubo no sufren contaminación bacteriana, siempre y cuando se realice un adecuado protocolo de desinfección de la piel del sitio de la venopunción y que éstos sean preparados en un cuarto cerrado y sin corrientes de aire. Por otra parte, es necesario considerar que el PRP tienen una potente acción antimicrobiana contra las bacterias de la piel de los caballos tales como *Staphylococcus aureus* (Bielecki *et al.*, 2007).

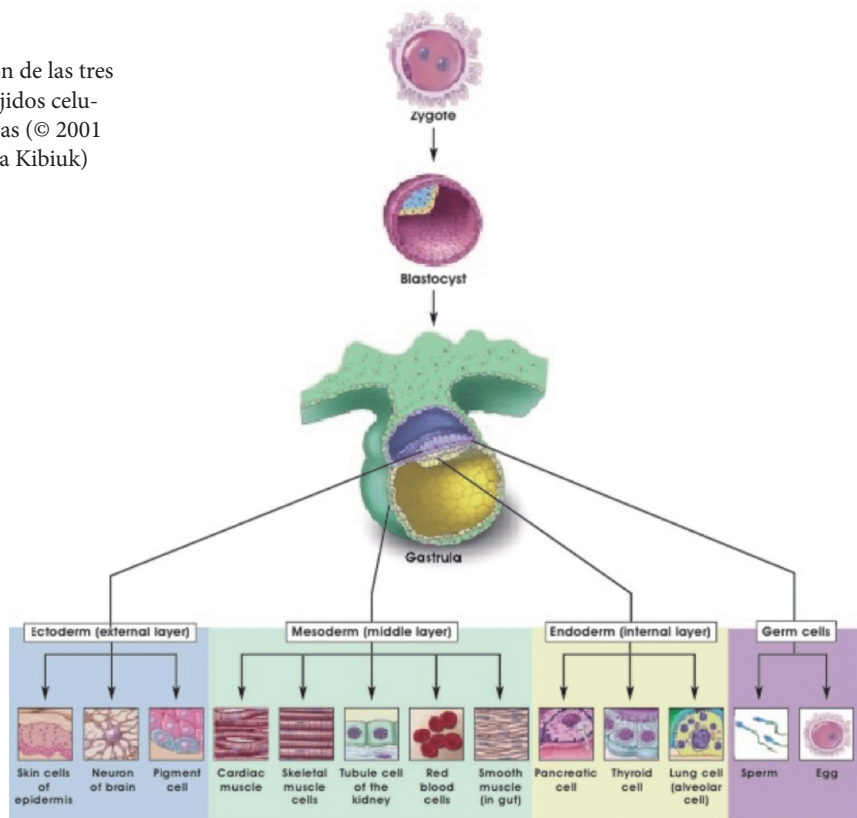
3.6.2. Células madre

Las células madre son aquellas células no diferenciadas, que tienen la doble capacidad de autorrenovarse (formar células idénticas a sus progenitoras), y, diferenciarse (generar uno o más tipos de células maduras con funciones específicas).

Dichas células pueden clasificarse en función de diferentes criterios. Uno de ellos es de acuerdo al potencial de diferenciación que posean, según el cual, las células madre pueden ser:

- **Totipotenciales.** Pueden generar organismos completos, tanto tejidos embrionarios, como extraembrionarios, es decir, pueden formar todos los tipos celulares.

Figura 8. Distribución de las tres capas germinales y tejidos celulares derivados de éstas (© 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk)



- **Pluripotenciales.** Son capaces de diferenciarse en cualquier célula de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo). Por tanto, no pueden formar organismos completos, pero sí linajes celulares.
- **Multipotenciales.** Tienen la habilidad de diferenciarse a sólo uno de los linajes celulares, generar sólo tejidos de la capa embrionaria de la que provienen.
- **Unipotenciales.** Muestran la capacidad de diferenciarse en sólo un tipo de células. También reciben el nombre de células progenitoras.

Otro método de clasificación de las células madre es teniendo en cuenta el origen del que proceden:

- **Células madre embrionarias.** Proviene de la masa celular interna del blastocisto, presentes en las primeras etapas de desarrollo del embrión. Tienen la capacidad de proliferar continuamente gracias a un perfil transcripcional único que las mantiene en un estado indiferenciado (Evans y Kaufman, 1981). Presentan marcadores de pluripotencia, que van a regular la supresión de los genes que promueven la diferenciación (Chen y Daley, 2008). Se consideran células pluripotentes ya que presentan la capacidad de diferenciarse a tejidos de las tres capas embrionarias (Verfaillie, 2002). Además presentan la característica de pasar desapercibidas por el sistema inmune debido al estado de desarrollo en la que se encuentran (Ichiryu y Fairchild, 2013).
- **Células madre germinales.** Aisladas de los esbozos gonadales de embriones, localizados en la cresta gonadal que dará lugar a óvulos y espermatozoides. Son células con una capacidad de diferenciación similar a las células madre embrionarias.

- **Células madre fetales.** Se encuentran en los tejidos y órganos fetales (sangre, hígado, pulmón) y presentan características similares a sus homólogos en tejidos adultos. Su procedencia no está del todo clara, y, por lo tanto tampoco su capacidad de diferenciación.
- **Células madre adultas.** Presentes en los tejidos y órganos de los individuos adultos. Estas células pueden encontrarse en la mayoría de los órganos, no obstante, el tejido considerado por excelencia como la mayor fuente de éstas es la médula ósea (Toma *et al.*, 2001). Se conocen cerca de 20 tipos celulares, entre las que se encuentran las células madre hematopoyéticas (responsables de la generación de todas las células sanguíneas y del sistema inmunitario) y las células madre mesenquimales. Se encuentran en espacios denominados nichos y presentan la capacidad de autorrenovación y de mantenimiento de la homeostasis celular en el tejido a través de procesos de diferenciación. Se trata de células que se ha demostrado presentan pluripotencia.

Algunas células madre adultas no sólo se especializan a células del mismo tejido en el que residen, sino también a otras células que derivan de la misma capa embrionaria de la que proceden (Prockop, 1997). De modo que, por ejemplo, células madre procedentes de la capa ectodérmica van a ser capaces de especializarse a células epiteliales, o células procedentes del endodermo podrán dar lugar a células pancreáticas (Figura 9).

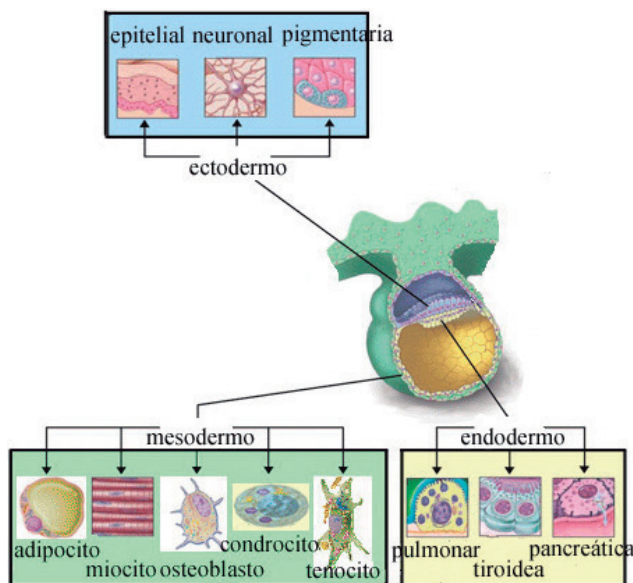


Figura 9. Diagrama de la distribución de las tres capas germinales y los tipos celulares que derivan de cada una de ellas. (© 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk)

En algunos casos, parece que la plasticidad que presentan las células madre adultas no se detiene en la diferenciación a células de su misma capa embrionaria, ya que, por ejemplo, células derivadas de la capa mesodérmica han demostrado ser capaces de diferenciarse a células del endodermo, como los hepatocitos (Weissman *et al.*, 2001).

En mamíferos, la principal fuente de células madre adultas es la médula ósea. Este tejido está compuesto por una red tridimensional de estroma y muchos tipos celulares distintos (Figura 2).

En la médula ósea se encuentran las células madre hematopoyéticas (Hematopoietic Stem Cells, HSCs), que son las responsables de la generación de todas las células sanguíneas y del sistema inmunitario. Desde el descubrimiento de las propiedades regenerativas de las HSCs hace 50 años (Lagasse *et al.*, 2000), se han caracterizado y utilizado en trasplantes para el tratamiento de diversas patologías como leucemias, linfomas, anemias aplásicas, inmunodeficiencias primarias y enfermedades hereditarias que afectan a células hematopoyéticas.

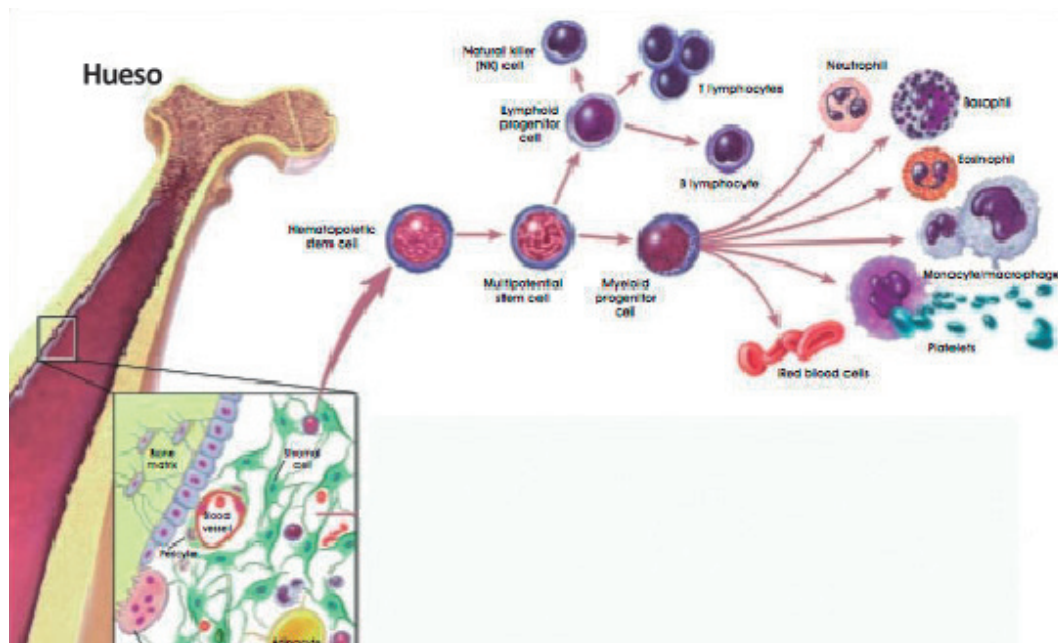


Figura 10. Distribución de las tres capas germinales y tejidos celulares derivados de éstas (© 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk)

3.6.2.1. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales son células madre adultas que derivan de la capa embrionaria del mesodermo (Figura 9), por lo que van a ser capaces de diferenciarse a células que conforman los tejidos derivados de esa misma capa, como son hueso, cartílago, músculo, estroma medular, tendones, ligamentos, grasa y otros tejidos conectivos (Weissman *et al.*, 2001). Aunque la capacidad de diferenciación de estas células no parece limitarse a estos tejidos, ya que también se ha demostrado capacidad de diferenciación a células de otras capas, como por ejemplo tejido neurogénico (Bronzi *et al.*, 2010) células pancreáticas (Karnieli *et al.*, 2007).

Además, estas células presentan también la propiedad característica de las células madre de autorrenovación, aunque a diferencia de las embrionarias, esta habilidad es finita y parece que las células acaban por detener su crecimiento *in vitro* tras largos periodos en cultivo (Ksiazek, 2009).

3.6.2.1.1. Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea

Las HSCs no son las únicas células madre que se encuentran en la médula ósea. En 1970 Friedenstein (Friedenstein *et al.*, 1970) y colaboradores descubrieron una población de células con morfología de fibroblasto y capacidad de formar colonias sobre la superficie de las placas de cultivo (Ksiazek, 2009). Por este motivo, inicialmente fueron denominadas como CFU-F (unidades formadoras de colonias de morfología de fibroblasto), aunque han sido varios los nombres que este tipo de células han recibido a lo largo del tiempo: células estromales de la médula, células precursoras estromales o células madre mesenquimales. Para clarificar la nomenclatura de estas células, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso aplicar el acrónimo MSC (Mesenchymal stem/stromal cell) para referirse a ellas (Horwitz *et al.*, 2005). Sin embargo, las MSCs no están formadas solamente por una población de células, sino que son una mezcla heterogénea de poblaciones (ver figura 10). Este hecho, sumado a que no existe un único marcador de superficie para su identificación positiva entre los otros tipos celulares de la médula ósea, lleva a que sea difícil definir las MSCs. Por ello, la ISCT definió en 2006 (Dominici *et al.*, 2006), una serie de estándares que las células aisladas de médula ósea humanas deben cumplir para que puedan ser denominadas MSCs:

1. Capacidad de adherencia al plástico del material de cultivo.
2. Expresión de ciertos marcadores de superficie: más de un 95% de las células en cultivo deben mostrar en su superficie las moléculas CD105 (endoglina), CD73 (SH2 y SH3) y CD90 (Thy-1); y menos de un 2% de las mismas deben ser positivas en la detección de CD45 (antígeno común de leucocitos), CD34 (marcador de células precursoras de células hematopoyéticas), CD14 ó CD11b y CD79α ó CD19 ó HLA-DR.
3. Multipotencialidad de diferenciación a osteoblasto, adipocito y condrocito.

La proporción de MSCs en la médula ósea es baja respecto del total de células nucleadas (Mafi *et al.*, 2011) y disminuye a medida de que avanza la edad del individuo. En el caso de humanos la proporción de células varía desde 1/10.000 (MSCs/células de médula ósea) en los recién nacidos hasta 1/2.000.000 en personas de la tercera edad. Esta disminución en la proporción de MSCs sería una de las causas de la lentitud a la hora de reparar tejidos dañados en las personas de avanzada edad, como por ejemplo roturas de huesos. El origen del control de la proporción de MSCs y su disminución con el tiempo en la médula ósea se desconoce.

3.6.2.1.2. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

Durante mucho tiempo, la médula ósea fue la principal fuente de obtención de células madre mesenquimales (BM-MS). Sin embargo, estudios realizados durante la pasada década revelaron el tejido adiposo como fuente alternativa de células madre mesenquimales (AT-MS) (Zuk *et al.*, 2001). Las AT-MS, de la misma manera que sus equivalentes de médula ósea, se pueden establecer en cultivos *in vitro* y también son capaces de diferenciarse hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico (Liu *et al.*, 2007) así como a tejidos procedentes de otras capas germinales como tejido neurogénico (Bunnell *et al.*, 2008).

3.6.2.1.3. Células madre mesenquimales derivadas de otros tejidos

La médula ósea y el tejido adiposo son los principales tejidos de donde se obtienen MSCs, pero no son los únicos, durante los últimos años han sido descritos el aislamiento y caracterización de células mesenquimales de otros tejidos adultos como sangre periférica (Zvaifler *et al.*, 2000), pulmón (Lama *et al.*, 2007), músculo (Adachi *et al.*, 2002), pulpa dental (Estrela *et al.*, 2011). Además de en estos tejidos, también se han aislado MSCs de tejidos no adultos como sangre del cordón umbilical (Robinson *et al.*, 2011) tejido del cordón umbilical (Mitchell *et al.*, 2003), líquido amniótico y placenta (Klein y Fauza, 2011).

3.6.2.2. Caracterización de las células madre mesenquimales

Todavía no se conocen en profundidad las propiedades que presentan estas células y las diferencias que presentan cuando son obtenidas de diferentes fuentes. Por ello, antes de ser utilizadas de forma masiva en el tratamiento de pacientes es necesario el desarrollo de estudios básicos para su caracterización y el desarrollo de metodologías adecuadas para su expansión y cultivo (Pittenger *et al.*, 1999).

3.6.2.2.1. Potencial de autorrenovación y proliferación

La autorrenovación es la habilidad de las células para generar idénticas copias de ellas mismas durante mucho tiempo y sin perder su estado no diferenciado. Debido a la heterogeneidad de poblaciones que presentan las MSCs, los resultados de los estudios sobre la capacidad de proliferación han sido muy variables, aunque todos ellos demuestran que las MSCs son capaces de mantenerse largos periodos de tiempo en cultivo *in vitro* sin diferenciarse. En la especie humana se ha descrito que las BM-MSC pueden doblarse aproximadamente 38 veces en cultivo, lo que correspondería con unos 15 pases (Bruder *et al.*, 1997). Aunque la tasa de proliferación de las AT-MSCs es mayor en la misma especie (Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006), el tiempo que llegan a permanecer en cultivo es similar, ya que se han conseguido expandir también hasta el pase 15.

De forma habitual las MSCs se cultivan *in vitro* utilizando medios de cultivo, como por ejemplo *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementados con suero fetal bovino como sustrato para el crecimiento. Pero si a los cultivos de MSCs, derivadas tanto de médula ósea como de tejido adiposo, se les añaden factores de crecimiento que potencien la división mitótica, como el factor de crecimiento de fibroblástico 2 (FGF-2), el potencial de crecimiento de las MSCs aumenta y las células puede llegar a superar los 70 doblajes en las derivadas de médula (Bianchi *et al.*, 2003) y hasta 150 en las derivadas de tejido adiposo (Zaragosi *et al.*, 2006).

3.6.2.2.2. Fenotipo de marcadores de superficie

Las MSCs pueden ser seleccionadas positivamente dentro de la médula ósea por la presencia en su superficie del marcador CD34 (Baksh *et al.*, 2004). Sin embargo, no existe un marcador único en la superficie para selección de las MSCs (Gronthos *et al.*, 2003), por lo que se recurre a la

confección de un perfil de expresión mediante una batería de marcadores, completándose además por la ausencia de antígenos relacionados con las células hematopoyéticas o endoteliales.

Entre las moléculas habituales que se examinan se encuentran integrinas (CD49a-f, STRO-1, CD29), cadherinas (CD144), enzimas (CD73, CD13), receptores de superficie (CD44), glicoproteínas (CD105), moléculas de adhesión (CD54, CD106, CD166, CD146), y los complejos mayores de histocompatibilidad MHC-I y MHC-II. Aunque la batería de marcadores positivos que se analizan varía entre distintos trabajos, la mayoría de ellos coinciden en la elección de los marcadores de HSCs CD34 y CD45 como negativos.

Existen diversos factores que parecen influenciar la presencia de estos antígenos en la superficie celular de las MSCs. Entre ellos se encuentra el suero utilizado para suplementar el medio de cultivo o la variabilidad entre individuos (De Schauwer *et al.*, 2011).

3.6.2.2.3. Potenciales de diferenciación

Las MSCs al derivar de la capa embrionaria del mesodermo presentan la capacidad de diferenciarse a células especializadas de tejidos que también derivan de ella. Tanto *in vivo* como *in vitro* se ha demostrado la capacidad de diferenciación de las MSCs a hueso (Bruder *et al.*, 1997), cartílago (Kadiyala *et al.*, 1997), tendón (Awad *et al.*, 1999), músculo (Galmiche *et al.*, 1993) tejido adiposo (Pittenger *et al.*, 1999) y estroma de la médula ósea (Prockop, 1997) (Figura 11).

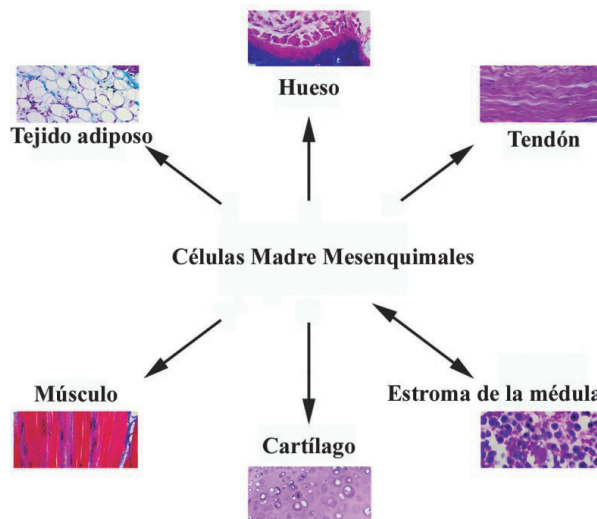


Figura 11. Esquema de los diferentes linajes que resultan de la diferenciación de las BM-MSCs

La heterogenicidad de poblaciones de las MSCs también se ve reflejada en la capacidad de diferenciación a los diferentes linajes. Estudios realizados en la especie humana han demostrado que un tercio de los clones iniciales que se adhieren a la placa de cultivo después del aislamiento de las células muestran capacidad de diferenciación hacia los tres linajes (osteogénico, condrogénico y adipogénico) (Pittenger *et al.*, 1999). Sin embargo, alrededor de aproximadamente

un 80% de los clones presentan la bipotencialidad de diferenciarse hacia condrocito y osteoblasto. A medida que el cultivo de MSCs va avanzando en el número de pases, los potenciales de multidiferenciación *in vitro* se pierden, siendo comúnmente las capacidades de diferenciación hacia linajes adipogénicos y condrogénicos las que desaparecen, quedando la osteogénesis como único linaje al que las MSCs son capaces de diferenciarse (Muraglia *et al.*, 2000).

3.6.2.2.3.1. Diferenciación adipogénica

La inducción de las MSCs en cultivo hacia el linaje adipogénico se consigue a través de la utilización de sustancias agonistas como suplemento en el medio de cultivo. Estas moléculas van a activar distintas vías metabólicas. Por ejemplo, la dexametasona estimula la adipogénesis vía receptor de glucocorticoides, el 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) promueve la diferenciación vía de la proteína-quinasa dependiente de cAMP y la potencia la adipogénesis a través de la unión al receptor IGF-1 que activa diferentes señales de transducción para la formación de grasa (Wang *et al.*, 2012).

El seguimiento de la diferenciación adipogénica de las MSCs se puede realizar a través del análisis de la presencia de los diferentes marcadores comentados anteriormente a nivel proteico o a nivel de transcritos. Además, existen tintes con afinidad específica hacia los ácidos grasos (como rojo oleoso ó rojo nilo) que proporcionan tinciones específicas que permiten visualizar la formación de gotas lipídicas en el interior de las células diferenciadas.

3.6.2.2.3.2. Diferenciación osteogénica

Aunque no está del todo claro el proceso por el cual las MSCs se diferencian hacia osteoblasto, se conocen los genes que se regulan positivamente durante el proceso de mineralización de la matriz extracelular. La proteína estructural de la matriz extracelular es el COL1A1 (colágeno tipo I) y su presencia en la matriz extracelular aumenta a medida que la diferenciación progresa. La ALP (fosfatasa alcalina) se considera un marcador intermedio y está relacionada con la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato para liberar el fosfato. El calcio presente en el medio se une al fosfato precipitando y dando lugar a la formación de nódulos de hidroxipatita. Otras moléculas involucradas en el proceso de mineralización de la matriz extracelular son la OC o BGLAP (osteocalcina) y la BMP-2 (proteína morfogénica ósea 2) (Frank *et al.*, 2002).

La inducción de la diferenciación hacia linaje osteogénico de MSCs en cultivo se consigue a través de la exposición de las células a la dexametasona, que se une a los factores de transcripción relacionados con la osteogénesis y al ácido ascórbico que desempeña su función en el metabolismo del colágeno (Franceschi, 1992) y al β -glicerofosfato, que promueve la mineralización de la matriz extracelular aportando fosfato y modulando la actividad metabólica (Chung *et al.*, 1992).

Para analizar la diferenciación *in vitro* hacia osteoblasto se llevan a cabo tinciones específicas (Von Kossa, rojo de alizarina) que muestran afinidad por el calcio depositado en la matriz extracelular por las células diferenciadas. Pero este método resulta insuficiente a la hora de

cuantificar la diferenciación (Bonewald *et al.*, 2003), por ello se analiza también la expresión de los genes sobreexpresados durante la osteogénesis descritos anteriormente o se determina la actividad de la fosfatasa alcalina.

3.6.2.2.3.3. Diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica de las MSCs conlleva la rápida biosíntesis de glicosaminoglicanos y la generación de una matriz extracelular, todo ello acompañado con una alteración de la morfología celular. El factor de transcripción desencadenante de estos procesos es SOX9, que va a regular la expresión del resto de genes relacionados con la condrogénesis.

La proteína de mayor presencia en este tipo de tejido es el COL2A1 (colágeno tipo II) (Barry *et al.*, 2001), sin embargo se considera como marcador tardío de diferenciación ya que se expresa más tarde que otros componentes de la matriz. En la matriz extracelular van a estar presentes diversos proteoglicanos como el agregano, con función estructural para resistir la compresión, y cuya expresión aparece desde los primeros días de la diferenciación y también va en aumento paulatinamente (Haleem-Smith *et al.*, 2012). Acompañando al agregano, se encuentran otros proteoglicanos como es el caso de la fibromodulina, la decorina o el biglicano, que se encargan de unir las fibras de colágeno de la matriz. Otra proteína que se encuentra asociando las fibras de colágeno y los agreganos es la COMP (proteína oligomérica de la matriz del cartílago), cuya expresión se detecta desde los primeros días de la diferenciación (Haleem-Smith *et al.*, 2012). El colágeno tipo X comienza a expresarse más tarde que el resto de colágenos y está asociado a condrocitos hipertróficos (Rucklidge *et al.*, 1996) ya que suele aparecer durante las últimas etapas de formación de hueso *in vivo* a partir del cartílago.

A diferencia de las inducciones adipogénica y osteogénica que se llevan a cabo en células cultivadas en monocapa, la diferenciación condrogénica, habitualmente, se desarrolla en tres dimensiones. El objetivo de realizar la diferenciación en este sistema de micromasas, es el de generar un ambiente de hipoxia, ya que el cartílago está pobremente vascularizado y por lo tanto contiene niveles muy bajos de oxígeno (Solursh, 1991; Xu *et al.*, 2007). La presencia de factores de crecimiento de la familia TGF- β (factor de crecimiento transformante) es determinante para promover la condrogénesis en las MSCs (Barry *et al.*, 2001), siendo las isoformas 2 y 3 las que causan mayor efecto, induciendo de una forma más rápida la acumulación de proteoglicanos y COL2A1. La familia de las BMP (proteínas morfogénicas de hueso) son capaces de potenciar el efecto que generan los TGF- β , siendo más efectivo el efecto de la isoforma 2 que de la 6 (Sekiya *et al.*, 2005).

Al igual que en la diferenciación a los otros linajes, existen distintas formas de analizar y cuantificar la diferenciación condrogénica. Mientras que tinciones como azul alcian, azul de toluidina y safranina O, tiñen los glicosaminoglicanos (GAG) de la matriz extracelular, que se pueden cuantificar también a través de la reacción con DMMB (azul de dimetilmetileno), las técnicas inmunohistoquímicas permiten determinar las moléculas COL2A1 y otras glicoproteínas de la matriz extracelular (Xu *et al.*, 2007).

3.6.2.2.3.4. Diferenciación a tenocito

Se han utilizado diferentes factores para estimular la diferenciación de las BM-MSCs a ligamento y tendón. Se han realizado co-cultivos con fibroblastos o estimulación con diferentes factores de crecimiento desarrollando el cultivo en dos o tres dimensiones (Lee *et al.*, 2007).

También se ha conseguido inducir la diferenciación de las MSCs a tenocitos mediante la exposición a bone morphogenetic protein 12 (BMP-12) (Violini *et al.*, 2009), a bajas dosis del factor de crecimiento (bFGF). Se ha demostrado también que el GDF-5 aumenta la expresión de Colágeno tipo 1 y escleraxis (SCX) en las MSCs (Farng *et al.*, 2008). Estas dos proteínas están involucradas en proceso de diferenciación tenocítica.

Además y puesto que el microambiente que rodea a las células es fundamental para la diferenciación de las MSCs a diferentes linajes celulares, se han publicado recientemente ensayos de cocultivos de células para inducir la diferenciación mediante la estimulación por factores paracrinicos secretados por las células. En caballos el cocultivo de BM-MSCs con explantes de tendón proveniente de caballos sanos estimula la expresión de marcadores específicos de tendón como decorin, tenomodulin, tenascin C y colágeno Tipo 1 por parte de las MSCs, manteniendo un fenotipo similar a tenocitos en cultivo monocapa (Lovati *et al.*, 2012).

3.6.2.2.3.5. Diferenciación a linajes de otras capas embrionarias

En los últimos años se están explorando cada vez más la posibilidad de que las MSCs no sólo se diferencien a los linajes que proceden de la misma capa embrionaria de las que ellas derivan, sino que presentan el potencial de diferenciación para dar lugar a células presentes en tejidos que derivan de las capas embrionarias endodérmica y ectodérmica, en un proceso denominado transdiferenciación.

Una de las diferenciaciones de las MSCs sobre la que más se investiga es la diferenciación hacia tipos celulares neurales (derivados del ectodermo) debido a la aplicación que podrían tener para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Deng *et al.*, 2006).

También ha sido descrita la capacidad de las MSCs de diferenciarse hacia linajes celulares derivados del endodermo, como es el caso de diferenciaciones hacia células pancreáticas (Karnieli *et al.*, 2007) o hepatocitos (Ishikawa *et al.*, 2010)

3.6.2.2.4. Propiedades inmunológicas

Otra de las características de las MSCs que se están estudiando en la actualidad es la relación de estas células con el sistema inmune.

Las MSCs muestran un efecto inmunomodulador sobre las células del sistema inmunitario a través de la interacción con linfocitos B y T, células NK, células dendríticas, macrófagos y neutrófilos (Brandau *et al.*, 2010). La Figura 12 muestra un esquema de como las MSCs realizan

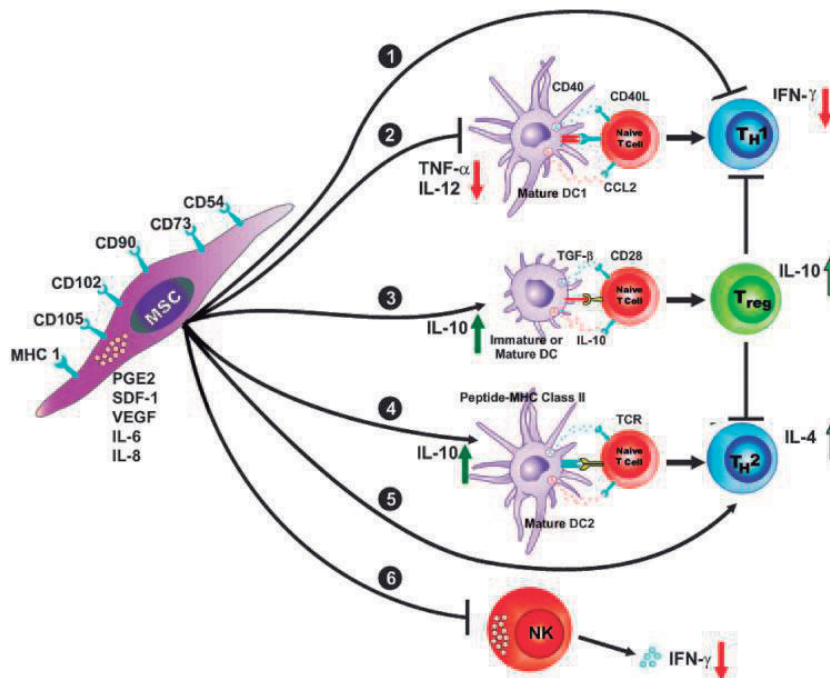


Figura 12. Esquema de los mecanismos de inmunoregulación de las MSCs sobre diferentes células del sistema inmunológico. Figura original de Pittenger, M. F, 1999 & Aggarwal, S. 2005

estos efectos inmunosupresores a través de la inhibición de la proliferación de las células T, de la producción de TNF-α e IFN-γ y aumentando los niveles de IL-10, ya sea por medio de la secreción de moléculas o por medio del contacto celular (Aggarwal y Pittenger, 2005).

Las MSCs se han considerado como “inmunoprivilegiadas”, ya que se consideraba que no expresaban en su superficie el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) (Romieu-Mourez *et al.*, 2007; Castro-Manrreza y Montesinos, 2015), molécula implicada en el rechazo de trasplantes (Cao *et al.*, 2015). Su interés clínico creció vertiginosamente después del descubrimiento de sus propiedades inmunomoduladoras en especies como los humanos y los ratones (Aggarwal y Pittenger, 2005; Vyas *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Esta característica sugiere que las MSC podrían desempeñar roles específicos como inmunomoduladores en el mantenimiento la tolerancia de trasplantes, la autoinmunidad, y la tolerancia materno-fetal (Fibbe *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2008), entre otros procesos.

En los seres humanos y ratones, las MSCs ejercen un profundo efecto inhibitor *in vivo* e *in vitro* sobre la proliferación de células T y muestran efectos similares sobre las células B, células dendríticas y células asesinas naturales (Tyndall *et al.*, 2007), a pesar de no inducir apoptosis (Zappia *et al.*, 2005). La inmunosupresión parece ocurrir más eficazmente cuando MSCs están en contacto físico con las células inmunológicas, que posteriormente liberan factores solubles, incluyendo la interleucina (IL) -10, IL-6 y IL-2, interferón (IFN-γ) y factor de necrosis tumoral (TNF-α) (Aggarwal y Pittenger, 2005). Sin embargo, algunos aspectos de este proceso como el papel de algunas moléculas solubles y si el aumento de las células T reguladoras es necesario para la inmunomodulación de las MSCs siguen

sin estar claros (Aggarwal y Pittenger, 2005). Aunque las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs equinas pueden tener profundas implicaciones terapéuticas en el tratamiento de muchas enfermedades mediadas por lesiones inflamatorias y procesos autoinmunes, hay muy pocos trabajos que se hayan centrado en el análisis de estas propiedades (Carrade *et al.*, 2012; Carrade y Borjesson, 2013).

Recientemente, se ha publicado que las MSCs alogénicas pueden provocar una respuesta inmune que puede provocar rechazo y aunque las MSCs no pueden considerarse verdaderamente inmuno-privilegiadas, aunque el rechazo de las MSCs alogénicas se produce más lentamente que el rechazo de otros tipos de células alogénicas. El momento y la gravedad del rechazo MSC parece ser fuertemente dependiente del ambiente y viene dado por un equilibrio entre la expresión de factores inmunogénicos e inmunosupresores de las propias MSCs. Este hecho podría explicar la falta de supervivencia observada tras su aplicación *in vivo* (Ankrum *et al.*, 2014). Utilizando diferentes técnicas se ha comprobado que la supervivencia de las MSCs alogénicas humanas, murinas y de rata mueren en un alto porcentaje tras 48 h de su introducción en el individuo.

La idea de que las MSCs tienen potentes propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras y que por tanto las MSCs alogénicas provenientes de individuos incompatibles para el MHC pueden ser utilizadas terapéuticamente con la misma eficacia que si se tratara de células autólogas o histocompatibles, está siendo cuestionada. Aunque, por otro lado, parte de la comunidad científica sigue aplicando y aceptando la hipótesis del donante universal. Griffin en 2003. (Griffin *et al.*, 2013) llevaron a cabo una revisión de las investigaciones realizadas que demuestran que la inmunogenicidad de las MSCs se activa por los estímulos a los que son sometidas cuando son introducidas en tejidos dañados.

En los estudios publicados recientemente en los que se demuestra la inmunogenicidad *in vivo* de las MSCs existe una gran variabilidad que depende de: especie, patología, ruta de administración, dosis, etc. Isakova en 2014 (Isakova *et al.*, 2014) demuestran que existe respuesta inmune tras la aplicación de MSCs alogénicas de forma intracraneal en macacos, mientras que no detectan dicha respuesta cuando administran células autólogas por la misma vía. Además, el grado de respuesta aumenta significativamente en función del grado de inmunocompatibilidad (MHC-I y MHC-II) entre el donante y el receptor, observando una relación inversamente proporcional entre la dosis y el grado de injerto o inserción en el tejido, por lo que recomiendan que la compatibilidad de los donantes sea evaluada cuando se utilicen MSCs en pacientes humanos para no comprometer su eficacia. En este mismo sentido, Gu *et al.* en 2014 (Gu *et al.*, 2015) afirman que aunque muchas investigaciones muestran el efecto terapéutico de las MSCs en procesos agudos, a largo plazo los efectos no han sido confirmados y la inmunogenicidad puede ser un factor limitante de la efectividad de las MSCs en patologías crónicas. Las MSCs alogénicas trasplantadas en ratas sanas y diabéticas presentan una baja inmunogenicidad cuando son introducidas en animales sanos y ejercen un efecto inmunosupresor, incluso en animales enfermos en las fases iniciales. Sin embargo, las MSCs que llegan

a expresar insulina, expresan también MHC-II, generando una fuerte respuesta inmune en animales enfermos. Contrariamente, investigaciones muy recientes siguen manteniendo que las MSCs de numerosas especies son hipoinmunogénicas, al expresar bajos niveles de MHC-II en la mayoría de las condiciones.

La producción de anticuerpos (Ac) frente a las MSCs alogénicas ha sido estudiada recientemente en caballos. Pezzanite *et al.* (Pezzanite *et al.*, 2015) demuestran que las MSCs alogénicas son capaces de generar una fuerte reacción inmunológica con producción de Ac *in vivo* en el animal que las recibe, limitando la efectividad de las aplicaciones repetidas en el mismo animal.

3.6.2.3. Células madre mesenquimales equinas

La terapia celular es de suma importancia para el tratamiento de lesiones en caballos que de otra manera tienen un mal pronóstico de recuperación.

En los últimos años debido al creciente interés por su utilización en terapia celular para el tratamiento de lesiones, el número de publicaciones orientadas hacia el análisis de las propiedades *in vitro* de las MSCs equinas ha aumentado aportando información sobre sus características.

Las MSCs equinas, de igual forma que las humanas, pueden obtenerse de diferentes tejidos, siendo los principales la médula ósea (Vidal *et al.*, 2006) y el tejido adiposo (Vidal *et al.*, 2007). En todos estos casos la selección de las células se ha realizado por medio de la capacidad de adherencia al plástico que poseen. Una vez en cultivo la morfología que adquieren las MSCs equinas es la típica de forma de huso extendiendo procesos y mostrando un crecimiento en monocapa (Arnhold *et al.*, 2007).

3.6.2.3.1. Potencial de autorrenovación y proliferación

Las MSCs equinas son capaces de formar colonias cuando se siembran a densidades bajas confirmando así su capacidad de autorrenovación (Arnhold *et al.*, 2007). Tienen una capacidad de expansión similar a las MSCs humanas, pudiéndose doblar más de 30 veces, incrementando este número si el cultivo se suplementa con FGF-2 (Colleoni *et al.*, 2009). Entre las MSCs obtenidas de diferentes orígenes en el caballo, las derivadas de tejido adiposo son las que presentan mayor potencial de proliferación, mientras que las derivadas de sangre periférica son las de menor, ya que su capacidad de expansión se limita a 5 ó 6 pases, y además muestran una elevada sensibilidad a la tripsinización (Koerner *et al.*, 2006).

3.6.2.3.2. Fenotipo de marcadores de superficie

Los criterios de mínimos propuestos por la ISCT son válidos para la definición de las MSCs humanas, sin embargo, hasta la fecha no existen criterios universales para la caracterización de las MSCs de todas las especies. El principal problema que presenta la caracterización del fenotipo de las MSCs equinas es el de la falta de anticuerpos comerciales que muestren reactividad con los epítomos de las moléculas de superficie de esta especie (Ibrahim *et al.*, 2007).

Cómo técnica alternativa a la citometría de flujo, la PCR cuantitativa permite determinar la expresión de los genes correspondientes a los marcadores de superficie cuando no se encuentran anticuerpos comerciales disponibles (De Schauwer *et al.*, 2011). Por medio de esta técnica se han confirmado resultados obtenidos por la citometría de flujo para las moléculas CD90, CD105 y CD45 (Braun *et al.*, 2010), y hallado la expresión de otras como CD73 para la que la citometría daba un resultado negativo (de Mattos Carvalho *et al.*, 2009; Pascucci *et al.*, 2011). Por este motivo hay que tomar con precaución los resultados negativos que se puedan obtener por medio de citometría de flujo, ya que falta de especificidad de los anticuerpos comerciales por los epítomos equinos puede conducir a falsos negativos.

3.6.2.3.3. Potencial de diferenciación

Las MSCs equinas pueden ser inducidas hacia linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, requisito de la ISCT para definir las MSCs humanas, aunque el potencial de diferenciación de las MSCs equinas varía en función del origen del cual proceden las células.

3.6.2.3.3.1. Diferenciación adipogénica

La inducción *in vitro* hacia este linaje es la más difícil de conseguir en el caso de las MSCs equinas, los protocolos estandarizados para la diferenciación de MSCs humanas (con IBMX, indometacina, insulina y dexametasona) no son eficaces para generar la diferenciación a adipocito. Aunque la inducción se ha conseguido en las MSCs procedentes de todos los tejidos, para algunos orígenes como la sangre periférica (Koerner *et al.*, 2006) o las encías (Mensing *et al.*, 2011), y en algunos de los trabajos publicados (Radcliffe *et al.*, 2010) sólo se ha logrado la diferenciación en una etapa temprana del proceso, en la cual se puede apreciar un cambio morfológico acompañado por la formación de pequeñas gotas lipídicas en el interior de las células pero sin llegar a fusionarse entre ellas para generar otras más grandes.

La valoración del potencial de diferenciación se lleva a cabo de igual forma que lo señalado anteriormente para las MSCs humanas, por medio de la tinción de los ácidos grasos almacenados en el interior de las células con rojo oleoso O. Además también se observa el aumento en la expresión de los genes relacionados con la adipogénesis PPAR γ y LPL.

3.6.2.3.3.2. Diferenciación osteogénica

La diferenciación hacia osteoblasto ocurre de forma más rápida a la descrita en otras especies (Vidal *et al.*, 2006). Las células se empaquetan en múltiples capas dando lugar a nódulos, lo cual está asociado a una mayor formación de matriz extracelular. Los factores que se utilizan para conseguir la inducción son los mismos que los utilizados en la especie humana: dexametasona, β -glicerofosfato y ácido ascórbico. Las células procedentes de médula ósea parecen ser las que poseen mayor capacidad osteogénica (Toupadakis *et al.*, 2010), aunque las derivadas de tejido adiposo también muestran una habilidad de diferenciación notable (Mambelli *et al.*, 2009), si bien algo más lenta. Las MSCs procedentes de sangre periférica, cordón umbilical y sangre de cordón umbilical también son capaces de diferenciarse hacia linaje osteogénico aunque su potencial es menor que el de los dos casos anteriores (Toupadakis *et al.*, 2010; Ahern *et al.*, 2011).

La monitorización de la diferenciación se realiza por las tinciones habituales de la matriz extracelular con rojo de alizarina o von Kossa, y para la cuantificación se han estudiado varios genes relacionados con la osteogénesis, como la osteopontina, el colágeno tipo I (Braun *et al.*, 2010) o la osteonectina (Colleoni *et al.*, 2009)

3.6.2.3.3. Diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica requiere unos tiempos similares a los descubiertos para la especie humana y se realiza con el mismo sistema de pellets. El inductor principal de la condrogénesis es también el mismo, el TGF- β . Tanto la isoforma TGF- β 1 como la TGF- β 3 son capaces de inducir la condrogénesis en MSCs procedentes de médula ósea y tejido adiposo (Radcliffe *et al.*, 2010). El potencial condrogénico parece ser mayor en las BM-MSCs que en las AT-MSCs (Vidal *et al.*, 2007) aunque las MSCs derivadas de cordón umbilical muestran en otro estudio mayor potencial que las derivadas de médula (Berg *et al.*, 2009).

Las tinciones que se utilizan son Safranina O, azul de alcian y azul de toluidina también son las habituales para determinar la diferenciación condrogénica de los pellets de las MSCs equinas. La cuantificación del potencial se puede determinar a través de inmunohistoquímica de las moléculas nombradas con anterioridad del colágeno tipo II y otras glicoproteínas de la matriz extracelular (Stewart *et al.*, 2008) la cuantificación de los GAG generados (Vidal *et al.*, 2008), o por medio del análisis de la expresión de genes relativos a la condrogénesis (Braun *et al.*, 2010).

3.6.2.4. Aplicación de las células madre a la terapia regenerativa

La terapia celular se define como el trasplante de células vivas a un organismo con el propósito de reparar un tejido o funciones perdidas. Las células que son utilizadas en este tipo de terapia son empleadas como agentes terapéuticos para la reparación de grupos de células o de tejidos que han sufrido algún daño y se plantean como alternativa de terapia para aquellos procesos que no poseen tratamientos en la actualidad o los que existen no son efectivos.

En los últimos años las células madre están siendo objeto de estudio para su utilización en terapia celular. Las células madre embrionarias se han considerado como las más interesantes para su utilización por su capacidad de diferenciarse a todos los tejidos adultos. Sin embargo su utilización se encuentra limitada por los problemas de carácter ético y moral que conlleva el trabajar con ellas, además de por el riesgo de formación de teratomas al inyectar estas células como terapia (Koch *et al.*, 2006; Knoepfler, 2009). Por ello, las células madre adultas suponen una alternativa al uso de las embrionarias. Además presentan la ventaja de que se pueden obtener del mismo individuo al que se va a tratar. Alternativamente a las células madre adultas, las células madre derivadas de tejidos no adultos suponen también una fuente de células importante para su utilización de forma alogénica, debido a que se encuentran en un estado más primitivo que las adultas y no plantean serios problemas éticos (Klein y Fauza, 2011).

Las MSCs han demostrado ser una gran herramienta en la terapia celular debido a su potencial de diferenciación y a su capacidad de autorrenovación. La plasticidad que presentan estas células a la hora de diferenciarse las hace idóneas para reparar y regenerar tejidos dañados, siendo sobretodo la habilidad de diferenciación a tipos celulares de tejidos conectivos la que hace que las MSCs sean las candidatas ideales como fuente de células para la terapia celular de enfermedades relacionadas con el sistema musculoesquelético. La autorrenovación permite la obtención de las grandes cantidades de células que son necesarias para la aplicación en terapia. Además las MSCs también presentan la propiedad de pasar desapercibidas para el sistema inmunológico, ya que el huésped no genera ninguna respuesta frente a ellas, lo cual permite el trasplante de estas células de forma tanto autóloga y como alogénica, es decir, entre pacientes o incluso entre especies diferentes de los que proceden las células (xenotrasplante) (Grinnemo *et al.*, 2004; Takenaka, 2015). Además debido a las propiedades inmunológicas que presentan las MSCs, éstas están siendo utilizadas en ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Kyrzcz-Krzemien *et al.*, 2015) como la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) o la enfermedad de Crohn (Ciccocioppo *et al.*, 2015).

Desde que se aislaron por primera vez las MSCs, se ha estudiado cómo estas células son capaces de reparar los tejidos de forma natural. A pesar del éxito de la utilización de las MSCs como agente terapéutico en animales modelos para el tratamiento de lesiones de tejidos, el nivel de inserción de las MSCs y la capacidad de diferenciarse *in vivo* en el tejido dañado es reducido (Picinich *et al.*, 2007). Parece que la habilidad de regeneración de las MSCs a través de la inserción-diferenciación en el tejido es secundaria, por lo que el principal sistema por el cual las células llevarían a cabo el proceso de regeneración sería alterando el microambiente del tejido a través de la secreción de factores solubles. El mecanismo que gobernaría en la regeneración no está del todo claro, pero parece ser que las MSCs trasplantadas secretarían factores bioactivos que inhibirían la cicatrización y la apoptosis del tejido y estimularían la angiogénesis y la mitosis de las células madre o progenitoras intrínsecas del tejido dañado para regenerarlo. Esta actividad de secreción de factores por parte de las MSCs se denominaría actividad trófica (Koch *et al.*, 2009).

Hasta el momento y debido a que la capa de origen embrionario de la que proceden las MSCs es el mesodermo, las mayores aplicaciones para tratamientos clínicos de estas células radican en su utilización para la regeneración de tejidos que derivan también de esa misma capa, como hueso, cartílago, músculo o tendón. Sin embargo, las MSCs han demostrado también su eficacia en numerosas estrategias terapéuticas en el tratamiento de diversos desórdenes, no solamente relacionados con tejidos del sistema musculoesquelético.

A continuación se detallan algunos ejemplos de patologías en las que se ha aplicado terapia celular utilizando diversas fuentes de células excluyendo las lesiones tendinoligamentosas que se tratarán en un Apartado posterior y tratando en mayor profundidad aquellos realizados con MSCs.

3.6.2.4.1. Terapia en lesiones óseas

Uno de las terapias con MSCs más importantes realizados hasta hoy es el uso de este tipo de células como terapia en la osteogénesis imperfecta. Ésta es una enfermedad congénita caracterizada por la malformación de los huesos y otros tejidos causada por la mutación del gen del colágeno tipo I, como consecuencia de ello los enfermos que padecen esta enfermedad sufren frecuentes fracturas de huesos. Los primeros estudios de tratamiento con MSCs realizados en un modelo murino mostraron tras de la infusión de las células una recuperación funcional del hueso y el cartílago (Pereira *et al.*, 1995). Este tipo de terapia se ha llevado a cabo con éxito en la especie humana. La aplicación de MSCs alogénicas en niños con esta enfermedad, produjo nueva formación de hueso, un aumento de la mineralización y una disminución en la frecuencia de las fracturas solamente tres meses después del tratamiento (Horwitz *et al.*, 1999).

3.6.2.4.2. Terapia en lesiones cartilaginosas

El cartílago tiene una capacidad limitada de reparación intrínseca, pequeños daños se pueden reparar espontáneamente a través de la producción de cartílago hialino, pero los defectos grandes se reparan por medio de la formación de tejido fibroso o fibrocartílago cuyas propiedades bioquímicas y biomecánicas son diferentes al hialino. Como consecuencia de esta sustitución de tejido, el cartílago presenta una degeneración que puede derivar en osteoartritis (Shelbourne *et al.*, 2003).

Los tratamientos habituales para lesiones en el cartílago de las articulaciones están basados en: métodos quirúrgicos para promover la estimulación de células de la médula ósea y potenciar la secreción de citoquinas en el tejido (Lotz, 2001), autotrasplantes de injertos de cartílago sano del propio paciente (mosaicoplastia) (Hangody *et al.*, 2001) o la implantación de condrocitos autólogos (ACI) (Komarek *et al.*, 2010). Sin embargo estas técnicas o son invasivas, como en la estimulación y en el ACI, o requieren grandes cantidades de cartílago sano que suele ser escaso en el individuo como en la mosaicoplastia. Además el cartílago resultante de estos tratamientos tampoco llega a alcanzar las características del cartílago nativo (Tins *et al.*, 2005).

La terapia celular basada en la utilización de las MSCs es menos invasiva, ya que se realiza mediante inyección intraarticular (Mizuno *et al.*, 2008). Los resultados en animales modelos como la cabra son positivos, en ellos se observa una regeneración del menisco y una disminución de la degeneración del cartílago (Hatsushika *et al.*, 2014). Sin embargo, en los ensayos clínicos realizados en pacientes de osteoartritis los resultados obtenidos no muestran mejora clínica significativa, aunque los síntomas de los pacientes parecen disminuir (Koga *et al.*, 2009).

3.6.2.4.3. Terapia en lesiones cardíacas

El músculo cardíaco es un tejido con una pobre capacidad de regeneración tras haber sufrido isquemia. Este fenómeno produce la muerte de cardiomiocitos tras sufrir un infarto lo que puede terminar derivando en un fallo cardíaco. Debido a esto existe un elevado interés en encontrar células capaces de restaurar el tejido sano del miocardio y con ello mejorar la función

del corazón. Se ha estudiado la posibilidad de utilizar varios tipos celulares para el tratamiento de defectos en el corazón, como el trasplante autólogo de células musculares satélite (Kessler y Byrne, 1999) o el de mioblastos (Menasche *et al.*, 2001). Sin embargo las células ideales para aplicar al tratamiento serían aquellas en un estadio menor de diferenciación para que pudieran dar lugar a una diferenciación cardiomiogénica completa. Las MSCs derivadas de médula ósea podrían ser estas candidatas ya que han demostrado la habilidad de diferenciarse hacia linaje miogénico *in vivo* (Saito *et al.*, 1995). Estudios realizados en ratón revelan la capacidad de las MSCs para introducirse en el tejido dañado y adquirir el fenotipo de cardiomiocito (Toma *et al.*, 2002). En ensayos realizados en humano la infusión de MSCs autólogas ha mejorado la función contráctil del corazón 3 meses después del tratamiento (Chen *et al.*, 2004a), aunque parece que estas mejoras se deben más a la actividad trófica de las células que a su diferenciación, ya que muy pocas células parecen capaces de integrarse en el tejido (Toma *et al.*, 2002).

3.6.2.4.4. Terapia inmunomoduladora

La enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) es una de las complicaciones más frecuentes asociadas al trasplante alogénico de médula ósea. En esta patología las células del injerto atacan a las células del huésped como resultado de la activación de las células T del injerto. Con los tratamientos inmunosupresores convencionales no siempre se puede controlar esta respuesta, por lo que hay que encontrar medios adicionales para disminuir la reactividad de las células T, como la eliminación de la población de células T del injerto a trasplantar (Horowitz *et al.*, 1990) o únicamente de las alorreactivas (Dickinson y Cant, 2002). Recientemente, el descubrimiento de las propiedades inmunosupresoras de las MSCs *in vivo* e *in vitro*, acompañadas de la capacidad de evasión de los mecanismos de inmunogeneicidad que presentan estas células (Le Blanc, 2003), ha hecho que se empiecen a utilizar en ensayos clínicos para el tratamiento de esta enfermedad. Cuando se realiza el trasplante de médula ósea en los pacientes se co-trasplantan también MSCs procedentes del mismo donante para que controlen la actividad de las células T y así evitar la aparición GVHD (Le Blanc *et al.*, 2004).

Existen más ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inmune en el que se están aplicando terapias basadas en MSCs. Uno de ellos es el lupus eritematoso sistémico, en que se han llevado a cabo trasplantes de MSCs alogénicas en ratones modelos, obteniendo una inhibición *in vivo* de la proliferación y función de linfocitos B y T (Deng *et al.*, 2005). Otro patología sería la enfermedad de Crohn, en la que la piel dañada por la aparición de fístulas se podría regenerar por medio de terapia celular (Ciccocioppo *et al.*, 2015).

3.6.2.5. Estado actual de la utilización de células madre en el tratamiento de lesiones tendinoligamentosas

3.6.2.5.1. Consideraciones generales

Hasta el momento y debido a que la capa de origen embrionario de la que proceden las MSCs es el mesodermo, las mayores aplicaciones para tratamientos clínicos de estas células radican

en su utilización para la regeneración de tejidos que derivan también de esa misma capa, como hueso, cartílago, músculo o tendón. Sin embargo, las MSCs han demostrado también su eficacia en numerosas estrategias terapéuticas en el tratamiento de diversos desórdenes, no solamente relacionados con tejidos del sistema musculoesquelético. A continuación se detallan algunos ejemplos, centrándonos en las tendinopatías que son el objeto de la presente tesis Doctoral y en las que se ha aplicado terapia celular utilizando diversas fuentes de células, tratando en mayor profundidad aquellos realizados con MSCs.

Los tratamientos que se han estado llevando a cabo para curar este tipo de lesiones se han basado en autotrasplantes, alotrasplantes, xenotrasplantes de partes de tendón sano y prótesis, pero todos estos métodos han fallado a la hora de devolver la funcionalidad y las propiedades mecánicas adecuada al tendón a largo plazo (Goh *et al.*, 2003).

Las terapias actuales que se está llevando a cabo están obteniendo resultados positivos en modelos animales. El objetivo de estos estudios es que el tendón recobre las propiedades mecanobiológicas que poseía antes de que apareciera la lesión. La utilización de factores de diferenciación y factores de crecimiento tales como IGF, con actividad mitogénica para reparar el tejido, han mejorado la capacidad de regeneración de tendones en conejos por medio de un aumento en la proliferación de tenocitos en el tendón, y de la síntesis de COL1A1 y proteoglicanos (Dahlgren *et al.*, 2002). En tendones de Aquiles de rata lesionados de forma artificial han incrementado la fuerza de tracción biomecánica del tendón semanas después de la administración (Dines *et al.*, 2007).

El tratamiento de tendinopatías con MSCs ha dado resultados prometedores en el conejo, ya que se ha observado aumento de la calidad histológica y de la fuerza biomecánica del tendón lesionado y tratado (Chong *et al.*, 2009). Las MSCs autólogas son capaces de recuperar un 20% de las funciones nativas del tendón aunque de forma dependiente de la dosis (Awad *et al.*, 1999). Además, también se ha observado una mejora del 37% en la biomecánica y la arquitectura del tejido en tendones de Aquiles (Young *et al.*, 1998). Si las MSCs se cultivan *in vitro* con factores como el BMP-12, implicado en la tenogénesis, la capacidad de regenerar el tendón se ve incrementada por medio del aumento del número de células con fenotipo de tenocito, la elongación y el alineamiento de las fibras, y una mayor deposición de componentes de la matriz extracelular (Lee *et al.*, 2011a).

Si nos referimos a la especie equina, el caballo es un animal que se utiliza como modelo para la investigación en terapia celular, especialmente para aquellos tratamientos orientados hacia la regeneración de lesiones de los tejidos musculoesqueléticos. Este animal es considerado como modelo para el estudio de defectos en las articulaciones debido a que el grosor del cartílago articular y la composición molecular es similar al del cartílago humano (Frisbie *et al.*, 2006). También es considerado como animal modelo para el estudio de lesiones que se producen en tendones y ligamentos (Fiester *et al.*, 2004), la naturaleza de estas lesiones son similares a las que se producen en atletas humanos, siendo los problemas

del tendón de Aquiles los de mayor similitud con los de los tendones que comúnmente se lesionan en los caballos (Frisbie y Smith, 2010). Otra de las razones para considerar el caballo como modelo animal es que el caballo, al igual que las personas, puede ser sometido a periodos de rehabilitación posteriores a la terapia.

Sin embargo, el caballo no sólo sirve como animal modelo para el tratamiento de enfermedades relacionadas con humanos, sino que debido a su importancia económica constituye también un paciente para la terapia celular.

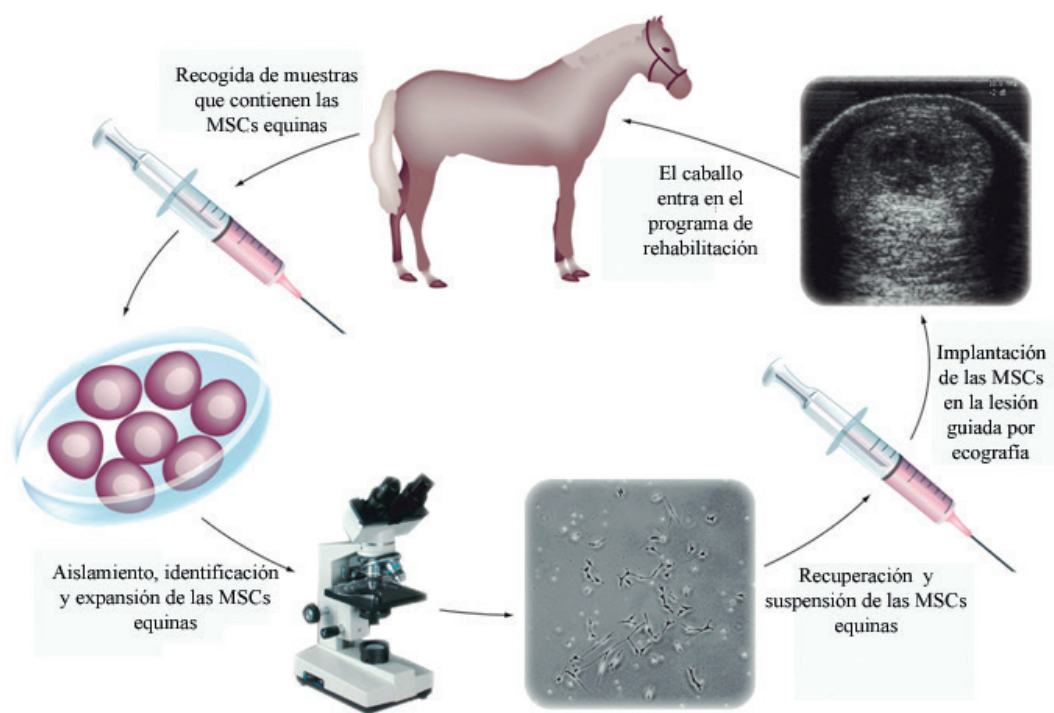


Figura 13. Esquema que representa las diferentes etapas necesarias para el tratamiento con terapia celular en las tendinopatias del caballo

El uso de células madre en medicina veterinaria equina se ha expandido en los últimos años a un ritmo tan rápido que ha superado con creces los avances científicos en este tema y las evidencias clínicas aportadas en el campo de la terapia celular (Frisbie y Smith, 2010; Clegg y Pinchbeck, 2011; Fortier, 2012; Smith *et al.*, 2013).

A pesar de la generalización del uso de células madre mesenquimales para el tratamiento de afecciones musculoesqueléticas en caballos, tenemos todavía pocos estudios a largo plazo que proporcionen datos científicos concluyentes sobre el uso clínico de estas células, ya que algunos de estos estudios han carecido de grupos de control adecuados o se han utilizado enfoques terapéuticos multimodales (MSCs y PRP, MSCs y sobrenadante de médula ósea etc), que complican las conclusiones del estudio.

A esto hay que añadir la dificultad, que ni en Europa ni en EEUU, se ha desarrollado una legislación acorde al uso y explotación de este tipo de terapia e incluso existen normativas sanitarias y comerciales que limitan la aplicación clínica de las MSCs (Nobert, 2011).

Los dos tipos de células madre más comúnmente utilizados en medicina equina son las obtenidas a partir de médula ósea denominadas BM-MSCs y a partir de grasa subcutánea denominadas AT-MSCs (Frisbie y Smith, 2010; Fortier y Travis, 2011; Gutierrez-Nibeyro, 2011) (ver Figura 13)

Las células obtenidas de cualquiera de estas fuentes se pueden utilizar tras un breve procesamiento o tras un cultivo por un periodo de aproximadamente dos o tres semanas (ver figura 13).

El aspirado de médula se suele realizar en el esternón (a nivel de 3-5 espacios esternales) o del hueso ilíaco utilizando una aguja de Jamshidi (Taylor y Clegg, 2011; Adams *et al.*, 2013).

Este aspirado de médula ósea se puede cultivar durante aproximadamente 2-3 semanas para obtener las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC) o inmediatamente centrifugarse para producir un concentrado de médula ósea (BMC). Las células madre mesenquimales de este concentrado de médula ósea, representan una fracción muy pequeña de la población total de células nucleadas (Pittenger *et al.*, 1999).

Algunos estudios sugieren que después de la centrifugación del aspirado de médula ósea para eliminar los glóbulos rojos, granulocitos, precursores mieloides y plaquetas maduras, solo entre 0,001% a 0,01% de las células mononucleares, son células madre mesenquimales (Taylor y Clegg, 2011).

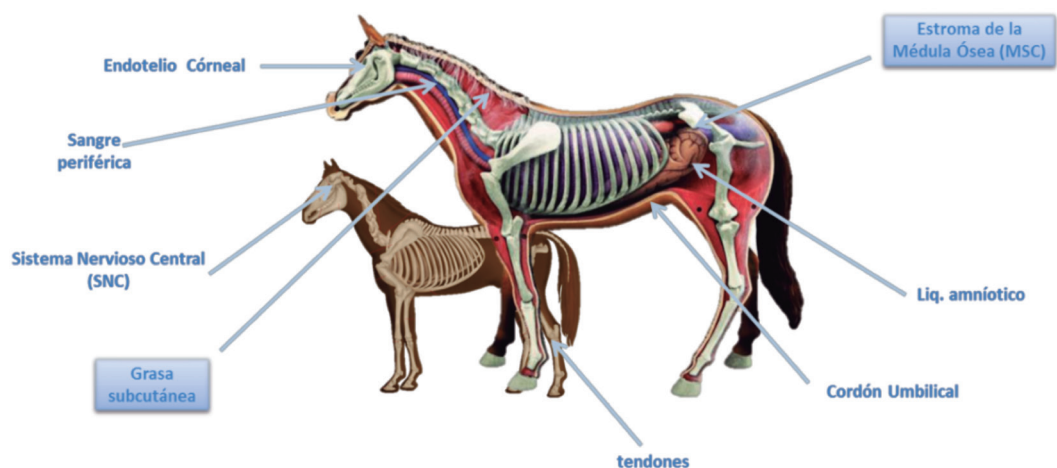


Figura 14. Esquema representativo de las diferentes fuentes de obtención de MSCs en el caballo

3.6.2.5.2. Diferentes tipos de células utilizadas

3.6.2.5.2.1. Fracción estromal vascular derivada de tejido adiposo (AD-SVF)

La fracción estromal vascular (AD-SVF) fue descrita originalmente como una fuente mitóticamente activa de los precursores de adipocitos por Hollenberg *et al.* en 1968, (Hollenberg y Vost, 1969). Estas células se parecían morfológicamente a fibroblastos y se demostró su capacidad para diferenciarse *in vitro* en pre-adipocitos y tejido adiposo funcional (Gaben-Cogneville *et al.*, 1983) Mas tarde se sugirió que la diferenciación no adiposa de la AD-SVF puede ocurrir bajo condiciones específicas y la noción de "células madre derivadas de tejido adiposo" no fue ampliamente reconocida hasta que en 2001, Zuk *et al.* demostraron que la AD-SVF contiene un gran número de células madre mesenquimales (MSC) que podrían ser inducidas a diferenciarse a linajes adipogénicos, condrogénicos, miogénicos, y osteogénicos (Zuk *et al.*, 2001). La fracción estromal vascular derivada de tejido adiposo (AD-SVF) se han utilizado para mejorar la reparación de tendones y ligamentos, con aparentemente buenos resultados.

Sin embargo, es importante señalar, que debido a que en este producto (AD-SVF), las células no son expandidas, sólo una fracción (2-4%) de las células AD-SVF son células madre mesenquimales (Vidal *et al.*, 2007).

En un estudio realizado *in vivo* que comparaba en un modelo de tendinitis del TFSD inducido con collagenasa tendones tratados con AD-SVFC intralesionalmente frente a los controles tratados con solución salina, se comprobó a las 6 semanas post-tratamiento que la organización histológica de los tendones tratados frente a los controles era significativamente mejor y además se encontró perilesionalmente una reducción de infiltrado de células inflamatorias. Este producto celular obtenido se denomina fracción estromal vascular derivado de tejido adiposo (AD-SVF) y se comercializa para su uso clínico (Gutierrez-Nibeyro, 2011).

La muestra de grasa se envía para su procesado, después en el laboratorio, el tejido adiposo se digiere y se centrifuga para aislar las células regenerativas. La fracción estromal vascular de células se resuspende y tampona en solución fisiológica y se envía al veterinario en 3 jeringas separadas que contiene entre 106 y 17 106 células (Nixon *et al.*, 2008a; Frisbie *et al.*, 2009).

Los resultados de estudios clínicos recientes que evalúan la eficacia de AD-SVFCs aislados por el método de Vet-Stem son alentadores, (Cawthorn *et al.*, 2012) y se puede encontrar en www.vet-stem.com.

3.6.2.5.2.2. BM-MSCs

El uso clínico de células mesenquimales cultivadas a partir de médula ósea BM-MSC para el tratamiento de la tendinitis equina viene avalada desde hace tiempo por diferentes estu-

dios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* (Pacini *et al.*, 2007; Fortier y Smith, 2008; Schnabel *et al.*, 2009; Crovace *et al.*, 2010; Godwin *et al.*, 2012). Actualmente existen numerosas publicaciones con datos clínicos referidos a BM-MSCs pero muchos menos referidos a otros tipos de células madre (Del Bue *et al.*, 2008). Smith y colaboradores en 2003, describen por primera vez el proceso de cultivo y uso de BM-MSCs para el tratamiento de lesiones naturales del tendón flexor digital superficial en un solo caso de un caballo de polo (Smith *et al.*, 2003). Este mismo autor en 2013 (Smith *et al.*, 2013) realiza un estudio clínico en 12 caballos con lesiones tendinosas no inducidas tratados con BM-MSCs y vehiculadas en sobrenadante autólogo de médula ósea, encontrando mejoras significativas con respecto a las lesiones no tratadas en todos los parámetros bioquímicos morfológicos y biomecánicos medidos.

Otro de los estudios controlados en el uso de BM-MSCs para el tratamiento de lesiones naturales en el TFDS, fue descrito por Pacini *et al.* (2007), en el que 11 caballos tratados con BM-MSCs se compararon con 15 caballos control tratados por métodos tradicionales utilizando en ambos grupos el mismo protocolo de rehabilitación. En este estudio, 9/11 (82%) de los caballos BM-MSCs tratados retomó la competición entre 9-12 meses sin recaídas durante los 2 años posteriores al tratamiento. Sin embargo en el grupo control tratado convencionalmente, la totalidad de la 15 caballos habían experimentado alguna recaída dentro del 1er año de competición (tiempo de una nueva lesión mediana de 7 meses) (Pacini *et al.*, 2007).

Godwin y cols 2012, (Godwin *et al.*, 2012) encontraron una reducción significativa en la tasa de recidiva de la lesión en caballos del National Hunt tratados con BM -MSCs en comparación con las tasas de recaída para caballos tratados con otras terapias, (25, 7% en comparación con el 56% descrito por otros autores. (Dyson, 2004; O'Meara *et al.*, 2010).

Los estudios para determinar el número óptimo de células madre para el tratamiento de lesiones de tendón / ligamento en el caballo aún no se han realizado. La cantidad más habitual de BM-MSCs descrita por diferentes autores para el tratamiento de afecciones tendinosas es de 10×10^6 BM-MSCs por lesión. (Pacini *et al.*, 2007; Schnabel *et al.*, 2009; Crovace *et al.*, 2010; Godwin *et al.*, 2012). Es posible que el nivel de la respuesta terapéutica sea dosis-dependiente por lo que es necesario estudiar el rango más adecuado en la dosis de MSCs a implantar para optimizar la respuesta terapéutica de las mismas.

Si bien en toda la bibliografía encontrada sobre el uso de BM-MSCs para el tratamiento de la tendinitis se han basado en una única inyección, es común en la práctica clínica realizar dos o más inoculaciones en función de la evolución de la lesión. Fortier y colaboradores en 2013 (Schnabel *et al.*, 2013) describe que sus pautas de tratamiento son una inyección inicial y a los 30 días postinyección si no encuentran una mejoría clínica y ecográfica de la lesión del 50% entonces aplican una segunda inyección. Godwin y colaboradores (Godwin *et al.*, 2012), señala que frente al reposo en box del animal durante largos periodos de tiempo es importante establecer un protocolo de rehabilitación a la hora de conseguir una recuperación clínica adecuada implementando un programa de ejercicios graduales y progresivos.

Es común en la práctica clínica administrar PRP ó sobrenadante de médula ósea en el momento en el que se diagnostica la lesión y una vez que las MSCs autólogas se han expandido realizar una única inoculación de BM-MSCs y PRP. Algunos autores (Kol *et al.*, 2013) señalan que las MSC y el PRP no debe mezclarse en la misma jeringa ya que el PRP puede coagular durante el proceso de inyección.

Siguiendo con el uso clínico de las MSCs, algunos autores plantean que deben realizarse más estudios para determinar si el uso de BM-MSC es más o menos eficaz que el uso de plasma rico en plaquetas (PRP) para el tratamiento de la tendinitis o incluso si sus efectos son sinérgicos si se utilizan de forma simultánea. Martinello y colaboradores (Martinello *et al.*, 2013) realizan otro ensayo comparando el uso de células mesenquimales derivadas de sangre periférica PB-MSC con PRP y MSCs en tendinitis inducidas en ovejas concluyendo que el producto combinado PB-MSCs y PRP, no produce la mejoría esperada frente a las PB-MSCs por lo que deduce, que el PRP no tiene un efecto sinérgico terapéutico cuando se usa conjuntamente con las MSCs.

Otros autores utilizan otros productos con capacidad anabólica y regenerativa como vehículos a la hora de inocular MSCs. Smith y colaboradores (Smith *et al.*, 2013) realiza un ensayo clínico sobre trece caballos con lesiones naturales y realiza un único tratamiento con BM-MSCs y sobrenadante de médula ósea encontrando un clara mejoría clínica, bioquímica e histológica de los tendones tratados frente a los controles aunque los propios autores se preguntan qué parte de esta mejoría es atribuible a las MSCs implantadas y que parte al sobrenadante.

Hasta el momento, y en la búsqueda bibliográfica realizada hasta este momento no se ha encontrado ningún estudio comparativo en caballos entre el uso clínico de los PRPs frente BM-MSCs u otro tipo de células mesenquimales.

3.6.2.5.2.3. AT MSCs

Hasta el momento existen pocas publicaciones con datos clínicos sobre el uso de células mesenquimales derivadas de la grasa AT-MSCs en el tratamiento de tendinitis equinas tanto naturales como inducidas. Como hemos comentado anteriormente el uso de AD-SVF ha sido más utilizado clínicamente hasta ahora que las AT-MSCs debido a su disponibilidad comercial y la rapidez de obtención. Las AD-SVF “células mononucleares derivadas de tejido adiposo”, contienen además de AT-MSCs, fibroblastos y otras células nucleadas e inducen la alineación fibrilar, y una recuperación de la arquitectura tendinosa en lesiones tendinosas inducidas mediante collagenasa (Nixon *et al.*, 2008a).

Dell Blue *et al* 2008 realizó un ensayo clínico con 16 caballos tratados con AT MSCs alogénicas cultivadas en presencia de lisado plaquetario autólogo y vehiculadas con PRP dentro de la lesión tendinosa. Después de un período de recuperación 14 de los 16 caballos volvieron a retomar su actividad deportiva sin recidivas durante los dos años de seguimiento realizado. (Del Bue *et al.*, 2008).

Resultados similares también se obtuvieron en otro estudio llevado a cabo en 8 caballos a los que se les indujo una lesión mediante colagenasa en el TFDS. Las lesiones fueron tratadas con AT-MSCs y resuspendidas en PRP autólogo antes de ser implantadas. El análisis ecográfico y las biopsias realizadas a las 16 semanas mostraban mejorías histopatológicas en los tendones tratados frente a los controles pero no observaron diferencias significativas en la expresión génica de los marcadores (type I collagen (COL1A1), type III collagen (COL3A1)), tenascin-C (TNC), tenomodulin (TNMD), and scleraxis (SCX) (Carvalho *et al.*, 2011).

En otro estudio realizado recientemente utilizando un modelo equino de tendinitis inducida quirúrgica se ha podido comprobar que el uso de AT-MSC en lesiones tendinosas mejora la vascularización tendinosa durante la etapa reparativa del tendón encontrando mejoras significativas frente a los controles (Conze *et al.*, 2014).

La seguridad y eficacia de las terapias basadas en la utilización de AT-MSCs alogénicas (ASC) en combinación con plasma rico en plaquetas (PRP) se ha estudiado en 19 caballos afectados por (TFDS) aguda o subaguda. Tras su inoculación se pudo demostrar que la aplicación de las AT-MSCs alogénicas resuspendidas en PRP autólogo no indujo reacciones tisulares adversas agudas o crónicas, ni la formación de tejido anormal a largo plazo. Por lo tanto, la combinación de ASC alogénicos y PRP puede ser considerada como una estrategia segura y eficaz para el tratamiento de la tendinitis SDF en el caballo (Ricco *et al.*, 2013).

Aparte del escaso uso descrito en la bibliografía de las AT_MSC en la regeneración del tendón, hasta el momento no hemos encontrado publicaciones relacionadas con la aplicación de las AT-MSCs equinas en regeneración cartilaginosa. Tan solo se ha publicado un solo trabajo sobre el efecto beneficioso a largo plazo del tratamiento intraarticular de AT-MSC en la patología del esparaván óseo en comparación con el tratamiento habitual de las inyecciones de esteroides (Nicpon *et al.*, 2013).

3.6.2.5.2.4. MSCs de otros orígenes

El uso de células embrionarias equinas ESCs también ha sido estudiado en el tratamiento de lesiones tendinosas. Algunos estudios (Guest *et al.*, 2010) comparan la supervivencia y la distribución de ESCs con respecto a las (MSCs) en el tendón lesionado encontrando diferencias para estos dos parámetros. A los 90 días tras la implantación los ratios de supervivencia de las ECS son mayores que las MSCs y su patrón de distribución dentro de la lesión es diferente ya que encuentran ECS en zonas perilesionales donde las MSCs no han llegado. Además de estas diferencias encontradas, no detectan respuesta inflamatoria alguna al tratarse de células alogénicas, por lo que los autores deducen que poseen un estatus inmunoprivilegiado. Además de todo esto, durante el tiempo del ensayo clínico los animales no desarrollan teratomas. Por todo ello estos autores proponen profundizar en este tipo celular como herramienta terapéutica ya que podrían ser una alternativa en los tratamientos de lesiones tendoligamentarias ya que si su comportamiento es diferente a las MSC estromales también podrían serlo sus efectos (Guest *et al.*, 2010).

También se ha evaluado el valor clínico de la administración de células madre derivadas de tendón (TD-MSC) en un modelo equino mediante inducción enzimática de lesión tendinosa. Para ello se crearon dos lesiones similares en cada extremidad anterior del caballo inoculando las TD-MSC y solución salina en la contralateral 21 días tras la creación de la lesión. Tras el estudio de los tendones lesionados no se encontraron diferencias significativas en los parámetros colágeno total, contenido de proteoglicanos y síntesis de proteoglicanos entre el grupo tratado y el control.

Sin embargo, los tendones lesionados presentaban niveles de expresión génica significativamente mayores para I colágeno I, colágeno III, COMP y tenomodulina, en comparación con los tendones sanos.

Histológicamente, la organización de la matriz extracelular del tejido reparado de los tendones tratados presentaba una mayor similitud al patrón fisiológico normal que los tendones control. En este mismo ensayo se realizaron estudios de seguimiento celular de las células implantadas siendo localizadas alrededor del sitio de implantación a la semana después de la administración. Más tarde se observó una cierta migración perilesional y a partir de la cuarta semana la dispersión encontrada fue mucho mayor (Barrett 2011, comunicación personal).

Ultimamente se están empezando a realizar estudios clínicos en el tratamiento de tendinitis equinas con células mesenquimales obtenidas a partir de líquido amniótico (Lange-Consiglio *et al.*, 2013; Muttini *et al.*, 2015), sangre de cordón umbilical (Van Loon *et al.*, 2014), wharton's Jelly (Nazari-Shafti *et al.*, 2015).

3.7.3. Consideraciones futuras de la utilización de MSCs en clínica equina

La administración temprana de células madre temprana se presume más ventajosa que un tratamiento tardío cuando el tejido cicatricial fibroso se ha formado. Este problema últimamente se está solventando mediante el uso de células mesenquimales alogénicas expandidas previamente y congeladas ya que acortan considerablemente el tiempo de espera desde que el caballo se lesiona hasta que pueden aplicarse pasando de tres semanas de media el tiempo de espera para las células autólogas a unos diez días en el caso de las células alogénicas. (Carrade y Borjesson, 2013).

Aunque existe una fuerte evidencia científica de que las MSC tienen propiedades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras (Aggarwal y Pittenger, 2005; Bunnell *et al.*, 2010; Peroni y Borjesson, 2011; Carrade y Borjesson, 2013), no hay suficientes estudios que avalen que las MSC equinas alogénicas no inducen una respuesta inmunitaria, especialmente si se administran repetidamente.

Existen estudios preliminares que han estudiado el uso de MSCs obtenidas a partir de cordón umbilical y placenta que sugieren que estas células no inducen una respuesta inmune celular, incluso después de inyecciones repetidas (Carrade *et al.*, 2012). Por otra parte estudios recientes señalan que las células de origen fetal (Warton's-Jelly), cordón umbilical o placenta) poseen mecanismos más eficientes para eludir el sistema inmune que las MSCs derivadas de tejidos adultos.

Por otra parte recientes estudios han demostrado que las MSCs derivadas de tejidos adultos pueden expresar el MHC clase II en los sucesivos pases que se realizan para su cultivo aunque varía enormemente en función del propio individuo y del número de pases que se realiza. La expresión de MHC II se ha relacionado *in vitro* directamente con el aumento de la respuesta inflamatoria y la proliferación de los linfocitos T (Schnabel *et al.*, 2014).

Los resultados publicados sugieren que las MSC alogénicas destinadas a uso clínico deben ser confirmadas como MHC clase II negativas antes su aplicación. Además, debe tenerse en cuenta que incluso las MSCs alogénicas MHC clase II negativas podrían expresar el MHC clase II si se implantan en un área de inflamación activa, como se ha demostrado con la estimulación *in vitro* con IFN- γ (Schnabel *et al.*, 2014).

Por otra parte las MSCs alogénicas podrían provocar fuertes respuestas inmunitarias *in vivo* de reactividad cruzada donante-receptor entre diferentes haplotipos de MHC. Tales respuestas podrían limitar la eficacia terapéutica del uso repetido de MSCs alogénicas e incluso podrían desencadenar respuestas inflamatorias indeseables en los pacientes receptores (Pezzanite *et al.*, 2015).

Así pues, la búsqueda e identificación de donantes de MSCs con haplotipos de MHC clase II compatibles con el receptor ó incluso la búsqueda de donantes equinos universales sería un objetivo a tener en cuenta muy importante en el desarrollo de la terapia celular de MSCs alogénicas en clínica equina.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se procederá a describir las técnicas y materiales utilizados durante el desarrollo de la Tesis doctoral.

4.1. Animales

Se utilizaron 15 caballos cruzados castrados (H1-H15). Las edades de los caballos variaron entre los 5 y los 8 años. Prácticamente a comenzar el estudio, los caballos fueron chequeados para tener la seguridad de que no sufrían ningún tipo de patología a nivel del aparato locomotor prestando una especial atención a los tendones flexores de las extremidades anteriores.



Figura 15. Algunos caballos del estudio en el paddock

4.1.1. Muestras obtenidas

A partir de los animales incluidos en el estudio se obtuvieron distintos tipos de muestras:

- Muestras de médula ósea para obtención de BM-MSCs: animales H1-H6
- Muestras de sangre para obtención de PRPs: animales H1-H3
- Muestras de tipo adiposo para obtención de AT-MSCs: animales H7-H12
- Muestras de sangre para obtención de PRPs: animales H7-H9
- Muestras para obtención de PBMCs: H13-H15
- Muestras de tendón: H1-H12

Todas las muestras fueron obtenidas de acuerdo a la Normativa sobre el bienestar animal de la Universidad de Zaragoza, según procedimiento aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PI 09/12) y en su caso con el consentimiento informado del propietario. La obtención de las muestras se realizó cum-

pliando la Normativa de Protección Animal Española (RD53/2013) que deriva de la Directiva europea sobre protección animal y uso de animales para experimentación animal (2010/63).

4.2. Diseño del experimento

Se indujo una lesión quirúrgica en el tendón superficial digital superficial en las dos extremidades anteriores de los 12 caballos incluidos en el estudio (H1-H12). La método de inducción será detallada en capítulos posteriores.

El experimento se desarrolló a lo largo de 45 semanas desde la inducción de la lesión (semana 0) hasta el momento de la eutanasia (semana 45ª).

Se realizó un análisis ecográfico de seguimiento de las lesiones, en el momento posterior a la inducción de la lesión y en las semanas 2ª, 6ª, 10ª, 20ª y 45ª. La evaluación histológica y el análisis de expresión génica se realizó en la semana 45ª, tras la eutanasia.

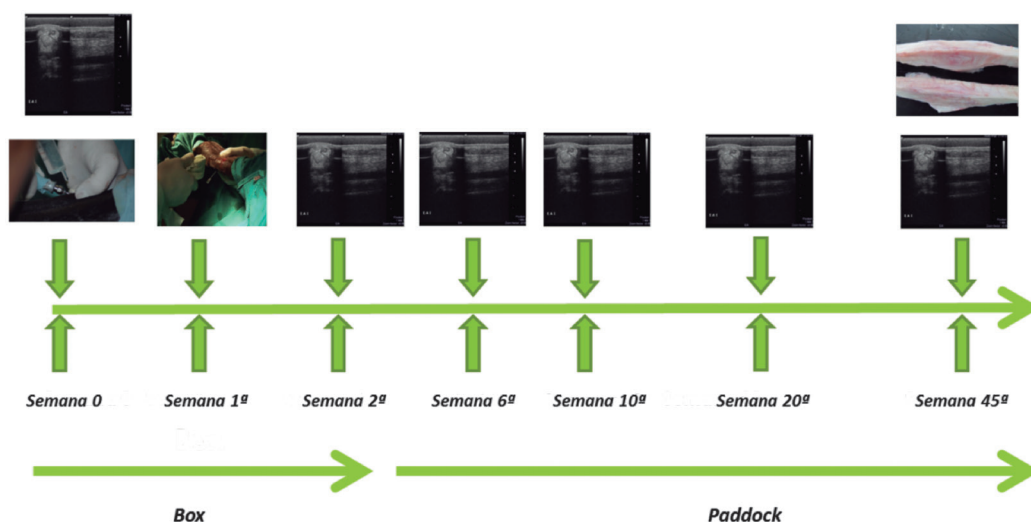


Figura 16. Cronograma del ensayo preclínico

Se establecieron 4 lotes de animales (A, B, C y D) para el tratamiento de las lesiones inducidas. El tratamiento con BM-MSCs, AT-MSCs, PRPs o RL se llevó a cabo una semana tras la inducción de la lesión tal y como se indica en la Figura 16. Seis caballos (H1-H6) fueron tratados en una de sus extremidades con BM-MSCs, la extremidad contralateral fué tratada con PRPs en tres de ellos (H1-H3) y con Ringer Lactato en los otros 3 animales (H4-H6). Los restantes 6 animales (H7-H12) fueron tratados con AT-MSCs en una extemidad, tres de ellos con PRPs (H7-H9) y con Ringer Lactato en su extremidad contralateral (H10-H12). Las BM- MSCs y AT-MSCs fueron aisladas y cultivadas previamente a la inducción de la lesión y criopreservadas hasta su utilización, mientras que los PRPs fueron obtenidos y utilizados frescos en el momento del tratamiento de la lesión.

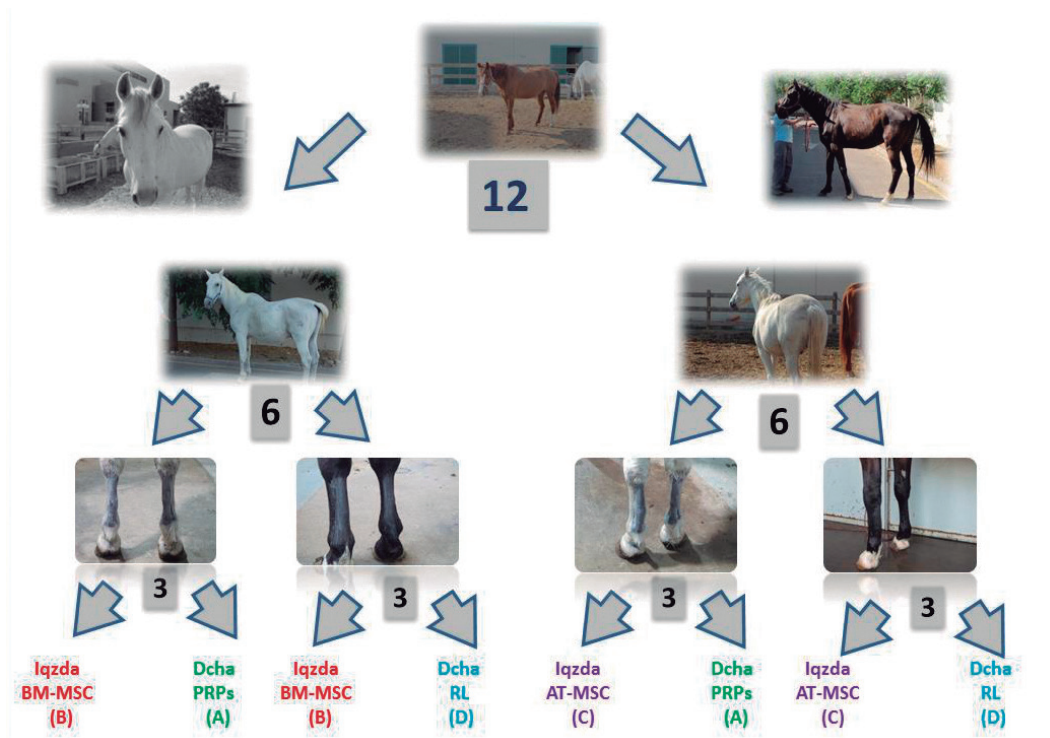


Figura 17. Esquema representativo en el que se clasifican las 24 lesiones inducidas según su tratamiento y en el que se establecen 4 lotes, 3 de las cuales (A, B, C) corresponden a los 3 tratamientos empleados y el lote 4, (D) que corresponde al grupo control. Estos 4 lotes vienen representados en este esquema de la siguiente forma:
 LOTE A (verde): 6 extremidades tratadas con PRPs.
 LOTE B (rojo): 6 extremidades tratadas con BM-MSCs resuspendidas en RL.
 LOTE C (violeta): 6 extremidades tratadas con AT-MSCs resuspendidas en RL.
 LOTE D (azul): 6 extremidades control tratadas con RL.

4.3. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo técnicas de cultivo celular. El manejo de las células se realizó en condiciones de esterilidad haciendo uso de una cabina de flujo laminar. A continuación se explican brevemente las etapas que fueron necesarias para el cultivo celular.

4.3.1. Obtención de muestras y aislamiento de mscs equinas

Las muestras biológicas a partir de las que se aislaron las MSCs y la metodología utilizada para el procesamiento de las mismas fueron:

4.3.1.1 Aspirados de médula ósea del esternón

Para la obtención de BM-MSCs se extrajeron 50 ml de médula ósea de los caballos H1-H6. Para ello los caballos se sedaron mediante una combinación de romifidina (0.04 mg/kgPV IV) y butorfanol (0.02 mg/kgPV IV), se preparó la zona asépticamente y se aplicaron 10 ml de lidocaína al 2% esteril subcutáneamente en el punto de incisión de la aguja de extracción me-

dular. Previamente, este punto se calcula mediante un barrido ecográfico de la zona ventral esternal considerando el punto idóneo para la extracción de médula ósea el espacio entre el cuarto y el quinto espacio esternbral (Kasashima *et al.*, 2004).

Una vez detectado el punto de incisión y tras aplicar el anestésico local se introduce de forma ecoguiada una aguja tipo Jamshidi de 11 G y 10 cm de longitud. Una vez introducida dentro del cuerpo esternbral se aspira suavemente con una jeringa precargada de heparina sódica al 5 %.

El aspirado se diluyó 1:3 con PBS (Gibco) y se añadió sobre Lymphoprep (Atom) de forma lenta y se centrifugó durante 20 min a 1700 rpm. Posteriormente se aspiró la capa de células nucleadas por encima de la Lymphoprep y se lavó dos veces con PBS. El sedimento se resuspendió en 10 ml de medio basal, que consta de medio Dulbecco Modificado de Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) bajo en glucosa y se suplementó con 10% de suero bovino fetal, 1% de glutamina (Sigma-Aldrich) y 1% de estreptomicina/penicilina (Sigma-Aldrich). Se contaron las células y se sembraron a una densidad de 2×10^6 células / cm^2 nucleadas en placas de 6 pocillos (Becton Dickinson) y se incubaron a 37°C, 5% CO_2 (ver Figura 18).

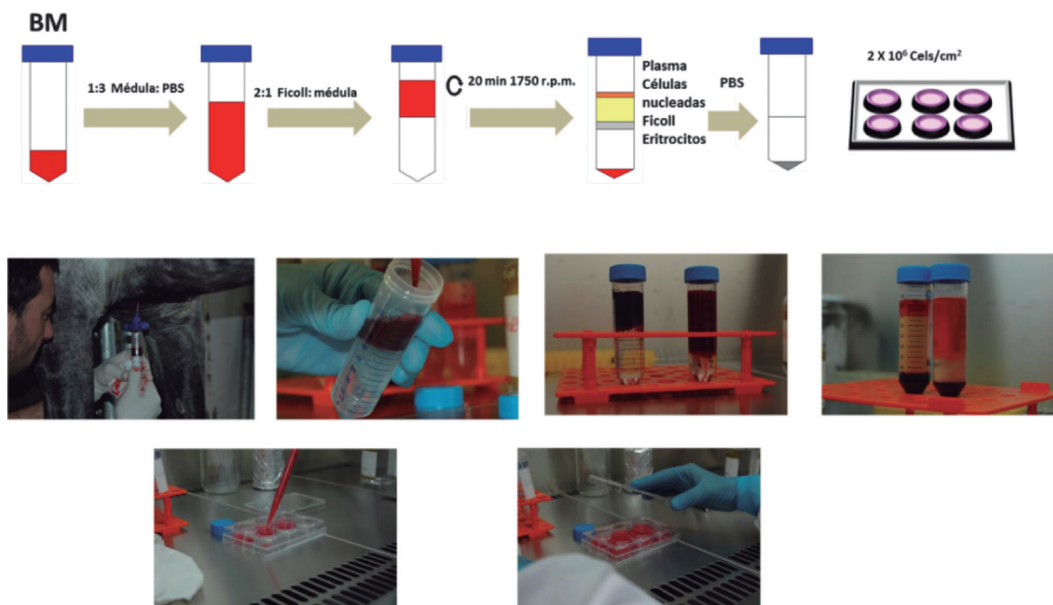


Figura 18. Esquema e ilustraciones del proceso de obtención de médula ósea y procesado de la misma, para el aislamiento de las BM-MSCs

4.3.1.2. Tejido adiposo subcutáneo del área supragluteal cercana a la cola

La obtención de muestras de tejido adiposo se realizó en la zona subcutánea supragluteal de los otros seis caballos (H7-H12). Para ello los caballos se sedaron mediante una combinación de romifidina (0.04 mg/kgPV IV) y butorfanol (0.02 mg/kgPV IV), se rasuró y se preparó la zona asépticamente aplicándose posteriormente 20 ml de lidocaína al 2% esteril subcutáneamente en forma de L. Se realizó una incisión en la piel de aproximadamente 9 cm y se disecó el área

quirúrgica hasta llegar al tejido graso subcutáneo. Se extrajeron aproximadamente 10 gramos de grasa y la incisión se cerró por planos mediante la técnica quirúrgica habitual. El tejido adiposo obtenido se cortó con una tijera estéril y se lavó dos veces con PBS mediante centrifugación durante 5 minutos a 1700 rpm. La fracción estromal vascular (SVF) se aisló por digestión con 0,01% de colagenasa (tipo I, Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37°C con agitación continua, seguido por centrifugación a 1700 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante, y las células se lavaron con PBS por centrifugación adicional a 1700 rpm durante 5 minutos. Por último, el sedimento se resuspendió en 10 ml de medio basal, se contaron y sembraron a una densidad de 105 células/cm² nucleadas en placa de 6 pocillos y se incubó a 37°C, 5% de CO₂ (ver figura 19).

Las células de ambos orígenes se mantuvieron en medio de crecimiento, compuesto por DMEM bajo en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco). Después de la extracción, a las 24, 48 y 72 horas, las células se lavaron con PBS y el medio se cambió para eliminar las células no adherentes. Las MSCs se mantuvieron en condiciones de 37°C, 5% de CO₂ y 20% de O₂ para todos los procesos realizados.

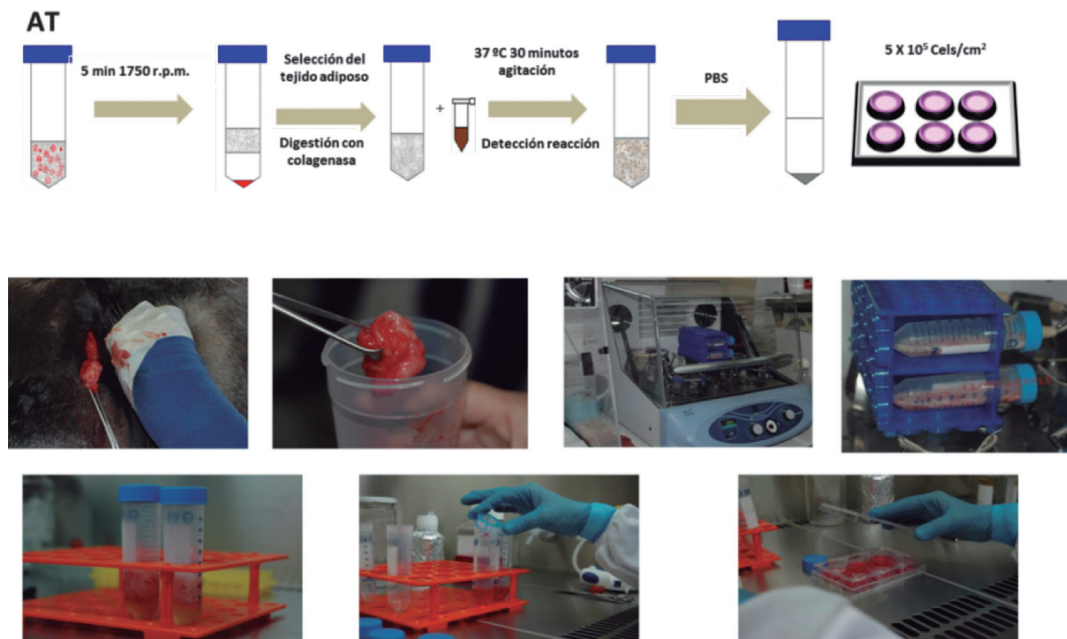


Figura 19. Esquema e ilustraciones del proceso de obtención de grasa subcutánea supragluteal y procesado de la misma, para el aislamiento de las AT-MSCs

4.4. Expansión y criopreservación de MSCs

Para la realización de los experimentos que componen la presente memoria fue necesario trabajar con un número elevado de células, objetivo que se consiguió a través de la expansión de MSCs a lo largo de varios pases. A continuación se resume la metodología utilizada para ello.

Las MSCs de ambos orígenes se cultivaron realizando cambios de medio cada 3 días hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia. Posteriormente, las células se separaron de la superficie de la placa de cultivo por tratamiento con 0, 25% tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich) y se contaron con un hemocitómetro o un contador de partículas Z2 Coulter. En este punto, una fracción de células fue re-sembrada a una densidad de 5.000 MSC/cm², que constituyó un nuevo pase, y el resto de las células fueron criopreservadas para la realización de experimentos posteriores. El medio de congelación en el que las células fueron resuspendidas estaba formado por un 90% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta metodología se repitió hasta el pase 3 para cada uno de los animales empleados.

4.5. Estudio de la proliferación de las MSCs

El estudio de la proliferación celular se llevó a cabo a lo largo de siete días, contando las células con el contador automático de células y partículas (Coulter, Beckman Coulter Internacional SL). El recuento automático se llevó a cabo por triplicado en cada una de las muestras. Para ello, las células se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² en placas de 12 pocillos con medio basal. Se utilizó una placa de 12 pocillos para cada uno de los días. Las células se retiraron todos los días usando 0, 25% de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) y se diluyeron 1/75 en Isoton (Beckman Coulter) para realizar el conteo automático.

Para establecer el tiempo de doblaje (doubling time) se aplicó la siguiente fórmula:

$$DT = \frac{CT}{\ln \left(\frac{N_f}{N_i} \right)}$$

Siendo CT = Tiempo transcurrido entre los
contajes de las células;

Nf= Número final de células;

Ni= Número inicial de células.

4.6. Diferenciación de MSCs

La inducción de las MSCs hacia los linajes mesodérmicos se llevó a cabo en diferentes condiciones de cultivo en función de los requerimientos de cada una de ellas. La valoración de las diferenciaciones se llevó a cabo por medio de tinciones específicas.

4.6.1. Diferenciación osteogénica

4.6.1.1 Método de inducción de la diferenciación

Las células se sembraron a una densidad de 20.000 MSCs/cm² durante 7-9 días. El medio de inducción estaba formado por medio de crecimiento suplementado con 10 nM de

dexametasona, 10 mM de β -glicerofosfato y 100 μ M de ascorbato-2-fosfato. Para la valoración de la osteogénesis, las células se fijaron con etanol frío y se incubaron con alizarin red 2% y pH 4, 6, que presenta afinidad por el calcio que se deposita en la matriz extracelular generada por las células diferenciadas.

4.6.1.2. Tinción específica

Las células se fijaron con etanol frío durante 1 hora, se lavaron con agua destilada y se incubaron durante 10 minutos con rojo de alizarina al 2% y pH 4, 6. Posteriormente el exceso de tinción se eliminó con lavados de agua destilada.

4.6.2. Diferenciación adipogénica

4.6.2.1. Método de inducción de la diferenciación

Las células se sembraron a una densidad de 5.000 MSCs/cm² durante 14 días. El medio de diferenciación estaba compuesto por medio de crecimiento suplementado con 1 μ M de dexametasona, 500 μ M de IBMX, 200 μ M de indometacina y 15% de suero de conejo. Los lípidos intracelulares formados en el interior de las MSCs diferenciadas fueron visualizados por medio de la tinción de células fijadas con formalina con oil red O, 3%, que tiñe de rojo los ácidos grasos.

4.6.2.2. Tinción específica

Las células se fijaron con formalina al 10% (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos, después se lavaron con PBS y se tiñeron durante 30 minutos a 37°C con rojo oleoso al 0, 3% en isopropanol. Finalmente, el exceso de tinción se eliminó lavando con agua destilada.

4.6.3. Diferenciación condrogénica

4.6.3.1 Método de inducción de la diferenciación

Aproximadamente 500.000 MSCs se dispusieron en forma de pellet mediante centrifugación en tubos cónicos de polipropileno y se mantuvieron durante 21 días. El medio condrogénico estaba compuesto por DMEM rico en glucosa (Gibco) suplementado con 10% de FBS, 10 ng TGF- β 3 (R&D Systems), ITS + premix (BD), 40 μ g/ml prolina (Sigma-Aldrich), 50 μ g/ml de ascorbato-2-fosfato y 0, 1 μ M de dexametasona. Los pellets diferenciados se fijaron con 10% formalina, se embebieron en bloques de parafina y fueron cortados en secciones de 5 μ m de grosor. Las secciones fueron teñidas utilizando la tinción clásica hematoxilina y eosina y las tinciones específicas alcian-blue y safranin-O para los glucosaminoglicanos depositados en la matriz extracelular.

4.6.3.2. Tinción específica

Los pellets diferenciados se fijaron con formalina al 10%, se embebieron en bloques de parafina y fueron cortados en secciones de 5 μm de grosor. A lo largo del estudio se fueron poniendo a punto diversas tinciones para valorar la diferenciación condrogénica. Los cortes se tiñeron con azul alcian y safranina O y también se realizó inmunohistoquímica de la proteína S-100 con el anticuerpo policlonal de conejo IR504 (DAKO). Además se valoró la histología de los pellets con la tinción clásica hematoxilina y eosina.

4.7. Análisis de la expresión génica de marcadores de superficie

Se estudió la expresión génica mediante RT-qPCR de marcadores de superficie para comprobar los requerimientos exigidos para las MSCs por la ISCT.

4.7.1. Extracción de rna a partir de MSCs

Las MSCs fueron lavadas con PBS y congeladas directamente en las placas de cultivo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La extracción de RNA y síntesis de cDNA se realizaron utilizando el kit comercial Cell to cDNA II (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.7.2. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-QPCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) nos permitió estudiar y comparar la expresión de los distintos marcadores. La amplificación se llevó a cabo en marcadores de superficie y marcadores relacionados con la regeneración del tendón. Se detalla a continuación los fundamentos generales de la RT-qPCR, aplicables a todo tipo de marcadores.

La técnica se fundamenta en el uso de fluoróforos que emiten distinta cantidad de fluorescencia en función del número de copias del fragmento amplificado. El número de copias del fragmento se corresponde en un determinado ciclo, ciclo umbral (threshold cycle, Ct), con la cantidad de molde en la muestra original. Cuando se cuantifica la expresión de un gen se utilizan genes normalizadores (housekeeping genes) para disminuir el error entre muestras generado por pasos previos a la cuantificación, como diferencias en la síntesis de cDNA o errores de pipeteo. En nuestro caso empleamos los genes β -2-microglobulina (*B-2M*) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como genes housekeeping. Además, si el número de muestras a analizar no puede ser cuantificado en una sola reacción, las muestras pueden ser amplificadas en reacciones distintas y normalizar los resultados utilizando muestras intercalibradoras en cada reacción (internal run calibrators) que eliminarían las variaciones aparecidas entre las distintas reacciones.

El fluoróforo utilizado fue la molécula intercalante de DNA SYBR Green, cuya detección es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR en la reacción

Las amplificaciones fueron realizadas por triplicado utilizando Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) el StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los niveles de expresión fueron determinados por el método Ct utilizando un factor de normalización (NF) calculado como la media geométrica de la expresión de dos genes housekeeping (*GAPDH* and *B2M*) Los resultados se muestran como expresión de mRNA relativa al control.

4.7.2.1. Marcadores de superficie analizados

Se estudió la expresión de los marcadores de superficie en 3 de los animales utilizados en el estudio para comprobar que se expresaban los marcadores característicos de MSCs: *CD13*, *CD29*, *CD44*, *CD49d*, *CD73*, *CD90*, *CD105*, *CD106*, *CD146*, *CD166* y no expresaban los marcadores hematopoyéticos *CD34*, *CD45* y *CD31*.

Los cebadores utilizados fueron los diseñados anteriormente por otros miembros del grupo de investigación que se muestran en la Tabla 1 (Ranera *et al.*, 2011)

GENES	Número de acceso	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Tamaño del amplicón
CD13	XM_001487923	F: TGACCTGACCCCAACGT R: CGCCCTGCAGCCAGTATT	110
CD29	XM_001492665	F: GTAAAAAGTCTTGAACCGATCTGAT R: CACAAATGAGCCAAACCCAATT	81
CD31	NM_001101655	F: TCTAGAACGGAAGGCTCCCT R: TGGGAGCAGGGCAGGTTCA	145
CD34	XM_001491596	F: CACTAAACCTCTACATCATTTTCTCC R: GGCAGATACCTTGAGTCAATTCA	150
CD44	NM_001085435	F: CCCACGGATCTGAAACAAGTG R: TTCTGGAATTTGAGGTCTCCGTAT	95
CD45	AY114350	F: TGATTCCCAGAAATGACCATGTA R: ACATTTTGGGCTTGTCTGTAAAC	100
CD49d	XM_001917601	F: CATCGGCCTTCTCACAGAGAA R: GCCATTATTGTCTGCATCAATTG	101
CD73	XM_001500115	F: GGGATTGTTGGATACACTTCAAAAG R: GCTGCAACGCAGTGATTCA	90
CD90	EU881920	F: TGCGAACTCCGCCTCTCT R: GCTTATGCCCTCGCACTTG	93
CD105	XM_001500078	F: GACGGAAAATGTGGTCAGTAATGA R: GCGAGAGGCTCTCCGTGTT	100
CD106	NM_001101650	F: CATCGTGACCTGTGGGCATA R: TGGGTTTCCCTCCACTAGCA	111
CD146	XM_001917594	F: CTGGACTTGGAACCAACATC R: CAGGTCTCACTCGGACATCAGA	85
CD166	XM_001503380	F: GTCTGGTCTTCTGCCTCTTGATC R: TCGGCAAGGCATGATAATAGTG	103

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación de los marcadores de superficie analizados

4.8. Capacidad de inmunosupresión de las MSCs

Para el desarrollo de los experimentos relacionados con la capacidad de inmunomodulación de las MSCs se llevaron a cabo técnicas de aislamiento de células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) equinas. Las PBMCs son un componente crítico en el sistema inmune, concretamente en situaciones de inflamación, por lo que el estudio de las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs se basa en experimentos de interacción en diferentes condiciones entre ambos tipos celulares. Al igual que para las MSCs, el manejo de las mismas se realizó en condiciones de esterilidad haciendo uso de una cabina de flujo laminar. A continuación se explican brevemente los experimentos que se llevaron a cabo con las PBMCs equinas.

4.8.1. Obtención y aislamiento de PBMCs

Las PBMCs se obtienen a partir de 40 ml de sangre de 3 animales (H13-H15) procedente de la vena yugular recogidos en tubos heparinizados (Becton Dickinson). Las PBMCs se aislaron por gradiente de centrifugación con Lymphoprep (Atom). Tras su aislamiento, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas a una concentración de 1×10^6 PBMCs/ml en un medio completo (CM) compuesto por el medio comercial RPMI-1640 (Gibco Invitrogen) suplementado con 10% de FBS (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

4.8.2. Estimulación de PBMCs

Las PBMCs no son capaces de dividirse únicamente en presencia de medio RPMI- 1640 completo (CM) por lo que fue necesaria su estimulación, que se llevó a cabo mediante la adición al medio de 20 μ g/ml de Phitoheмоaglutinina (PHA, isoforma P) durante 3 días.

4.8.3. Cocultivo de mscs con PBMCs

El ensayo de cocultivo se realiza mediante la incubación de 1×10^5 PBMCs en 200 μ l de CM con PHA (isoforma P, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 20 μ g/ml, en placas de 96 pocillos, con diferentes cantidades de MSCs procedentes de la médula ósea (BM-MSCs) o del tejido adiposo (AT-MSCs). Así, en el inicio del cocultivo las MSCs procedentes de los dos orígenes son dispuestas en concentraciones decrecientes (1×10^5 , 1×10^4 , 5×10^3 y 2×10^3) y se incuban durante 24 horas a 37°C y 5% de CO². A continuación se añaden las PBMCs a las MSCs a las cuatro proporciones (1:1, 1:10, 1:20 y 1:50).

Se utilizó el kit Cell proliferation ELISA (BrdU colorimetric; Roche) para determinar la proliferación de las PBMCs estimuladas y el efecto inmunomodulador de las MSCs. El proceso fue realizado siguiendo las especificaciones del fabricante. Cada ensayo se realiza por triplicado y como controles ponemos MSCs en las mismas cantidades que las del cocultivo y PBMCs aisladas con y sin mitógeno.

El efecto inhibitorio de las MSCs sobre la proliferación de los linfocitos se evalúa restando la densidad óptica de los pocillos de MSCs a la de los pocillos que contienen los cocultivos MSCs- PBMCs. La tasa de proliferación se calcula considerando las PBMCs aisladas y estimuladas con PHA como el valor de proliferación del 100%.

4.9. Obtención de PRPs

Los PRPs se obtuvieron a partir de sangre entera periférica de 6 animales (H1-H3; H7-H9) siguiendo el método de doble centrifugación descrito por (Arguelles *et al.*, 2006). Se recogieron 80 ml de sangre completa de la vena yugular usando un cateter 23G (Terumo Europe NV, Belgium) en tubos con un 3, 8% de citrato sódico (BD Vacutainer systems, Plymouth, UK). Los tubos se sometieron a centrifugación a 120 g durante 5 minutos y se recogió la fracción de plasma existente encima de la capa leucocitaria. La fracción recogida fue depositada en tubos de 10 ml y sometida a centrifugación a 240 g durante 5 minutos. El sobrenadante recogido corresponde a los PRPs que serán aplicados de forma autóloga a los correspondientes lotes de animales.

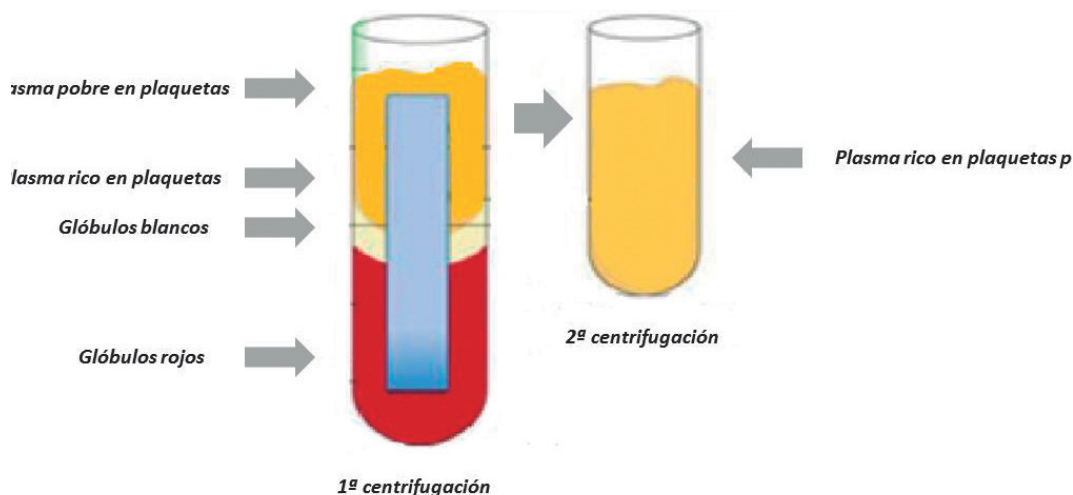


Figura 20. Esquema representativo del proceso de obtención de PRP mediante el método de centrifugación en doble tubo

4.10. Ensayo clínico para tratamiento de lesiones inducidas en el tendón flexor digital superficial (TFDS)

4.10.1. Inducción quirúrgica de la lesión

Las lesiones en el TFDS fueron inducidas bajo anestesia general siguiendo la técnica descrita por (Cadby *et al.*, 2013). Los caballos fueron sedados con romifidina (0.04 mg/kgPV IV) y butorfanol (0.02 mg/kgPV IV). La anestesia fue inducida con ketamina (2, 2 mg/kgPV IV)

y diazepam (0.05 mg/kgPV IV) y se mantuvo la anestesia intravenosa (TIVA) mediante la técnica del triple gotero que contenía: 500 mg de ketamina y 25 g guaifenesina mezclado en 500 ml de solución glucosada al 5% a una tasa de 2 ml/kgPV/h. La región quirúrgica fue preparada asépticamente y se realizó una pequeña incisión a aproximadamente 18 cm distal al hueso accesorio carpal en la zona palmar de la extremidad. A través de esta incisión y una vez abierta la vaina sinovial, se insertó en el centro del tendón una broca de 4mm unida a un rotor motorizado de velocidad controlada induciendo una lesión distalmente de unos 5 cm de longitud. El proceso se realizó bajo seguimiento ultrasonográfico. La lesión se provocó en la zona central del tendón denominada MIZ (Maximal Injury Zone). Una vez terminada esta operación se suturaron por planos y de forma habitual, el paratendón, el tejido el subcutáneo y la piel. Posteriormente se colocó un vendaje tipo Robert-Jones de dos capas en ambas extremidades y se mantuvo durante 1 semana, realizándose cambios del mismo cada 48 horas. También se aplicó cobertura antibiótica a base de penicilina procaínica 22 mg/KgPV (BID) (Depocillin, Merck-Sharp) y gentamicina 6 mg/Kg PV (QID) (Gentavex, SP-Veterinaria), durante 3 días consecutivos. Esta operación se realizó en ambas extremidades.

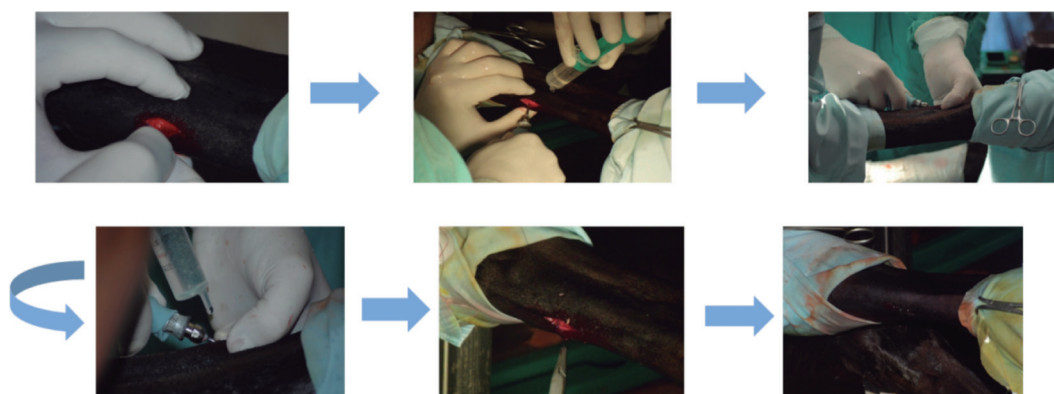


Figura 21. Ilustraciones que muestran el proceso quirúrgico de inducción de la lesión en el TFDS

Después de este periodo fue aplicado el tratamiento correspondiente, dependiendo del lote al que pertenecieran los animales. Los caballos permanecieron una semana más en los boxes y posteriormente fueron trasladados a amplios corrales donde se mantuvieron durante todo el tiempo que duró el experimento.

Durante todo el post-operatorio y en caso de observarse dolor, se les administró un tratamiento analgésico a base de fenilbutazona oral (EquZona) a razón de 2.2 mg/kgPV cada 12-24 h y butorfanol (Turbogesic®) a dosis de 0.05 mg/kgPV IM cada cuatro horas.

4.10.2. Inoculación de los productos biológicos para los diferentes tratamientos

La implantación de los productos biológicos (PRPs, BM-MSCs y AT-MSCs) en las extremidades tratadas y en las extremidades control (RL) se realizó mediante punción ecoguiada.



Figura 22. Secuencia de imágenes que muestran el proceso de inoculación de los productos utilizados en los tendones tratados y en los control

Para ello el animal se colocaba en un potro de contención y se procedía a realizar una sedación a base de romifidina, Sedivet® (0.04 mg/kgPV IV) y butorfanol (Turbogesic®) (0.02 mg/kgPV IV).

Una vez sedados se realizó un anestesia troncular metacarpiana proximal y se rasuró y se preparó la zona de manera quirúrgica. Tras la realización de la anestesia troncular, se comprobó que ésta era efectiva y mediante punción ecoguiada se introdujo una aguja de 18 G y 40mm de longitud hasta alcanzar la zona “core lesión”, donde se depositaron los diferentes productos terapéuticos o bien el RL. La zona MIZ servía de “receptáculo biológico” para albergar los productos biológicos inoculados (ver figura 22).

En los animales tratados con MSCs las (BM-MSCs) como las (AT-MSCs), la dosis aplicada fue de aproximadamente 20 millones de células. En las extremidades tratadas con PRP y en las control, el volumen aplicado en ambos casos fue de 7 ml en cada extremidad.

4.10.3. Estudio de la efectividad de los tratamientos

4.10.3.1. Valoración clínica

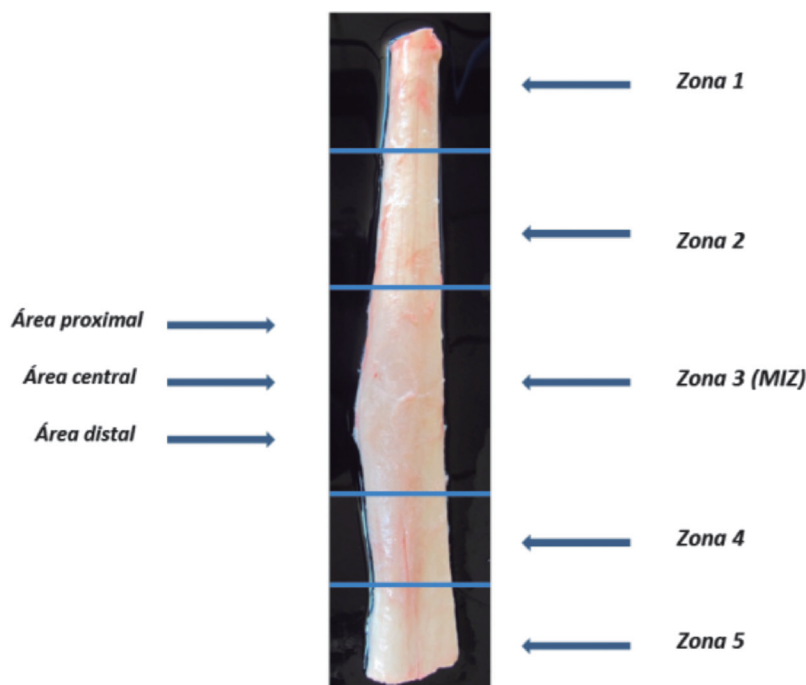
Todos los caballos incluidos en el estudio estuvieron controlados durante la primera semana tras la creación de la lesión, valorando cada 12 horas, síntomas relacionados con el dolor: frecuencia cardiaca y respiratoria, grado de cojera y tiempo de recumbencia. Si algunos de los parámetros mencionados superaban los umbrales establecidos por las directrices establecidas por la Comisión ética asesora para la experimentación animal de la Universidad de Zaragoza, FC>60 PPM, FR>32 RPM, recumbencia persistente, cojera marcada, los animales se sometieron a tratamientos analgésicos anteriormente citados. Por otra parte, se realizaron cada 48 horas cambios de vendaje y exploración de las extremidades intervenidas valorando aspecto de la incisión realizada, dolor a la palpopresión, inflamación y edema de la zona afectada.

Una vez realizada la inoculación de los diferentes productos de tratamiento y del RL se siguió el mismo protocolo de exploración y control de los animales. A los 15 días tras la aplicación del tratamiento se retiró definitivamente el vendaje en las extremidades así como las grapas de sutura de la piel.

4.10.3.2. Valoración de parámetros ecográficos

Se realizaron exámenes ecográficos durante todo el estudio utilizando un modelo HDI-3500 (ATL Philips, Eindhoven, Netherlands). La sonda empleada para realizar la ecografía fue de proyección lineal con una frecuencia de 5 a 12 MHz (L12-5 38 mm, ATL Philips, Eindhoven, Netherlands) ayudándonos de una almohadilla ultrasonográfica para permitir un mejor contacto entre la sonda y la piel.

Figura 23. Zonificación del tendón flexor superficial digital superficial (TFSD). Zona 1 y 5 corresponde a una zona de tendón "sano". La zona 1 servirá de control para el análisis de expresión génica. Las zonas 2 y 4 son zonas de transición entre tendón sano y el lesionado. La zona 3 o MIZ (Maximal Injury Zone) se corresponde con la zona central de la lesión y está sub dividida en proximal, central y distal



Todos los exámenes ecográficos se completaron con los caballos ligeramente sedados 0,02 mgPV/Kg IV de romifidina Sedivet® y colocados en un potro de contención. La región metacarpal palmar fue rasurada antes de la aplicación de gel de ultrasonido. Se obtuvieron 5 imágenes transversales y 5 longitudinales de la región MIZ cada 2 cm. Las imágenes fueron tomadas antes del tratamiento a las 2ª, 6ª, 10ª, 20ª y 45ª semanas del experimento. Los parámetros ecográficos evaluados para realizar el seguimiento de las lesiones tratadas y las control fueron los descritos por Genovese y Rantanen (Genovese *et al.*, 1986) y son los siguientes:

- Ecogenicidad (TES; Tendon Echogenicity Score)
- Alineamiento fibrilar (FPS; Fiber Pattern Score)
- Porcentaje del área de lesión (%CSA; Cross-Sectional Área in percentage).

Los 2 primeros parámetros ecográficos TES y FPS se valoraron de forma semicuantitativa asignando a cada imagen un valor de 0 a 3. En el caso del parámetro TES se asigna el valor 0 a la imagen isoecoica, 1 a la imagen hipoeicoica, 2 a la imagen extremadamente hipoeicoica y 3 a la imagen anecoica.

Para el parámetro TES se asignaron los mismos valores sobre planos ecográficos longitudinales siendo 0 el valor que corresponde a un patrón (>75%) de fibras paralelamente alineadas, 1 (50-74%) de fibras están normalmente dispuestas, 2 (25-54%) de fibras normalmente dispuestas y 3 (<25%) con disposición fibrilar normal.

En el caso del parámetro %CSA, el valor asignado se realizó sobre planos ecográficos transversales siendo éste el porcentaje de área lesionada con respecto al área total de la sección tendinosa. El cálculo de este parámetro se determinó mediante mediciones realizadas desde el propio ecógrafo ya que su software permitía realizar mediciones de este tipo.

Tanto las ecografías realizadas como la valoración de las mismas fueron realizadas por un único operador.

El valor definitivo asignado de cada uno de los parámetros valorados en cada lesión y en cada uno de los momentos de su evolución corresponde al sumatorio de los valores individuales asignados a cada una de las 5 imágenes ecográficas seleccionadas. En el caso del parámetro %CSA, el valor definitivo asignado en cada lesión corresponde a la media aritmética de los 5 valores obtenidos previamente.

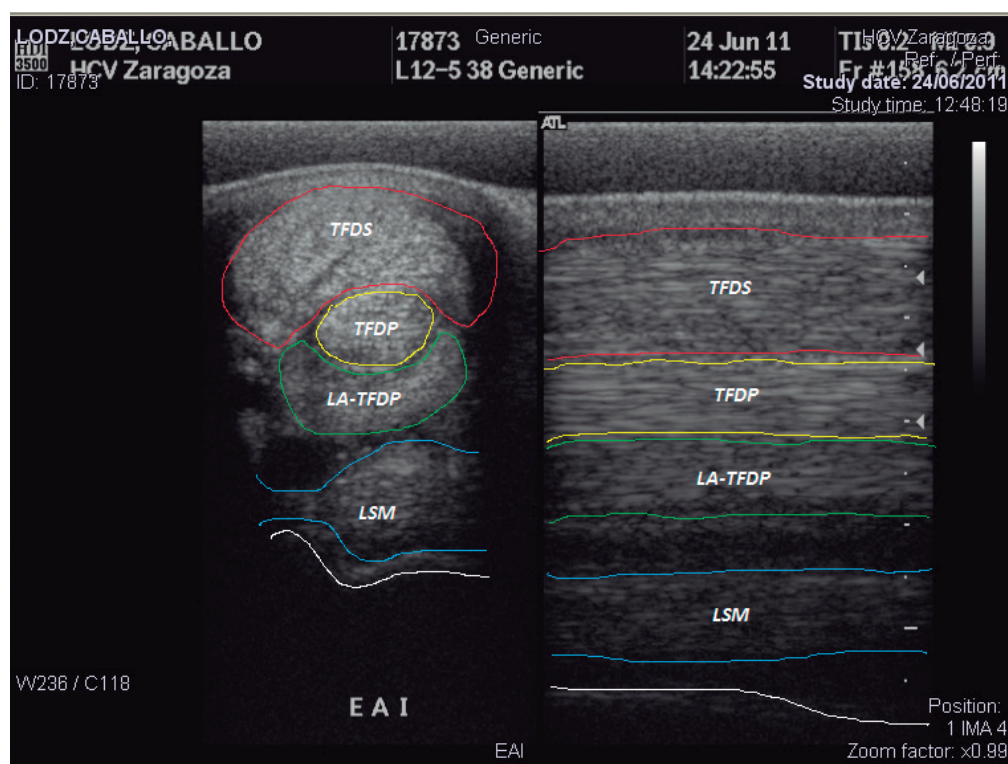


Figura 24. Corte transversal y longitudinal ultrasonográfico de un tendón lesionado. También pueden observarse las diferentes estructuras de la cara palmar de la región metacarpiana del caballo. TFDS (Tendón flexor digital superficial), TFDP (Tendón flexor digital profundo), LA-TFDP (Ligamento accesorio del Tendón flexor digital profundo), LSM (Ligamento suspensor del menudillo)

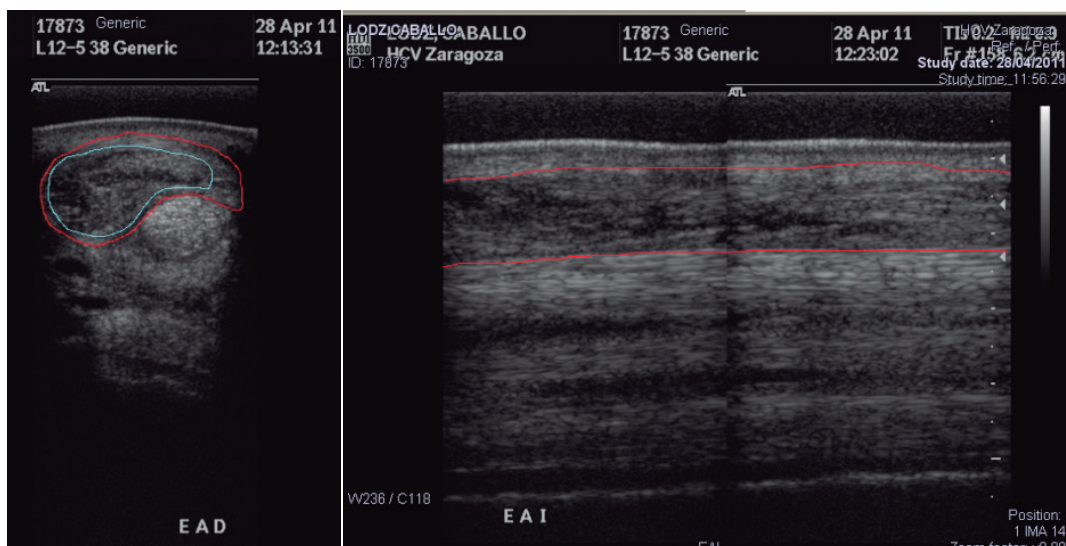


Figura 25. Imagen donde puede apreciarse delimitada con línea continua blanca, el área de sección afectada del TFDS en un corte sagital ecográfico. También se puede observar en otro corte ecográfico longitudinal de la misma zona tendinosa la lesión demarcada con línea continua

4.10.3.3. Valoración de parámetros histológicos

Cuarenta y cinco semanas después del comienzo del experimento, los caballos se sometieron a eutanasia por sobredosis de barbitúricos (200 mg / kgPV de pentobarbital IV), después de la sedación con romifidina (Sedivet®) 0,04 mg / kgPV IV.

Inmediatamente después de la eutanasia, se tomaron muestras del TFDS de ambas extremidades de los doce animales incluidos en el estudio para la evaluación histológica. De cada tendón, se evaluaron dieciocho preparaciones histológicas: 6 de la región proximal, 6 de la región distal y 6 de la zona central de la MIZ (Zona 3) (ver Figura 23 y 26).



Figura 26. Secuencia de imágenes que muestra el proceso de obtención de las muestras tendinosas para su posterior análisis histológico y de expresión génica

Los parámetros histológicos analizados fueron (Maffulli *et al.*, 2008).

- Morfología tenocítica (TM)
- Vascularidad (V),
- Sustancia amorfa (GS)
- Orientación de las fibras de colágeno (CO)
- Celularidad (CN).

Las muestras fueron interpretados mediante una valoración semicuantitativa basadas en la escala de Movin y la clasificación de Bonar (Maffulli *et al.*, 2008). Todas estas variables se puntúan de 0 a 3 siendo 0 el valor que corresponde a una apariencia normal y 3 apariencia marcadamente anormal (ver Tabla 2).

	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Morfología tenocítica	Forma de husillo alargada, núcleos pobres en citoplasma visible a MO.	Aumento de la redondez, núcleo ovoides in citoplasma visible.	Aumento de la redondez, núcleo redondeado más grande y citoplasma visible.	Núcleo redondeado grande y citoplasma abundante formación de vacuolas. Morf. condroide.
Sustancia fundamental	No sust. Fundametel teñible	Mucina teñible entre fibras. discreto	Mucina teñible entre fibras con pérdida de paquetes.	Mucina abundante con tinción de colágeno discreta
Orientación del colágeno	Solágeno, dispuesto en haces muy cohesionados muy bien demarcados. Patrón brillante denso homogéneo luz polarizada.	Separación de fibras. Disminución densidad con luz polarizada. Se mantienen los paquetes de fibras.	Separación de fibras con pérdida de demarcación de haces y pérdida clara de patrón de polarización.	Marcada separación de fibras con pérdida completa de la arquitectura.
Vascularidad	Vasos poco visibles que cursan entre haces.	Agrupación de vasos ocasional menos de uno por diez en campo en High power field.	1-2 grupos de capilares en 10 campos de High power field.	Más de 2 grupos vasculares por 10 High power field.
Celularidad	Escaso número de células por campo.	Zonas del campo con aumento celular y morfología redondeada.	Gran cantidad de células en algunas zonas del campo distribuidas de forma no homogénea.	Alto número de células distribuidas homogéneamente por todo el campo con forma ovoide.

Tabla 2. Patrones histológicos para cada grado de la valoración semicuantitativa realizada en este ensayo y de cada uno de los parámetros histológicos valorados

El valor final asignado de cada uno de los parámetros histológicos arriba mencionados en cada lesión corresponde al sumatorio de los valores parciales de cada una de las 18 preparaciones histológicas valoradas.

Para realizar este proceso, una vez obtenidas las muestras de cada uno de los tendones lesionados se guardaron debidamente identificados en contenedores con formalina al 10%. Una vez fijadas las muestras se procedió a la deshidratación de las mismas, después fueron embebidas en parafina y cortadas a 4 µm de sección para posteriormente realizar la tinción de Hematoxilina-Eosina.

Una vez teñidas se valoraron los 18 campos de cada una de las muestras mediante microscopía óptica (magnificación de 100, 200, 400 y 500 aumentos) (high-power field—HPF).

Todas las muestras han sido valoradas por un mismo operador en modo simple ciego.

También se realizaron estudios preliminares de microscopía electrónica. Para la valoración de las muestras mediante Microscopía Electrónica, las piezas tendinosas seleccionadas, se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato. La post-fijación se llevó a cabo en OsO₄ y la deshidratación de la muestra se realizó mediante series graduales de alcohol, embebidos en Epon 312. Una vez terminado el proceso de deshidratación de la muestra, se prepararon secciones ultrafinas y se examinaron bajo Microscopía electrónica de transmisión G2 FEI Tecnai™.

4.10.3.5. Análisis de la expresión génica en tendón

4.10.3.5.1. Extracción de RNA a partir de tendón

Se obtuvieron muestras de dos zonas del tendón (Zona 1 y Zona 3) según se muestra en la Figura 22. Para la obtención de RNA las muestras se disgregaron utilizando nitrógeno líquido. Para aislar el RNA se utilizó el kit Trizol (Qiagen)/Chloroform/Isopropanol descrito por Chou y colaboradores (Chou *et al.*, 2013). El DNA genómico fue eliminado mediante la técnica DNase Turbo (Ambion) y la síntesis de cDNA se llevó a cabo usando el sistema SuperScript II System (Life Technologies, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.10.3.5.2. Marcadores analizados relacionados con la regeneración del tendón

En las muestras de tendón obtenidas tras la eutanasia de los animales se estudió la expresión génica de diferentes marcadores relacionados con la remodelación del tendón: *COL1A1* (collagen, type I, alpha 1), *COL3A1* (collagen, type III, alpha 1), *COMP* (cartilage oligomeric matrix protein), *ACAN* (agrecan), *SCX* (scleraxis), *DCN* (decorin), *TNC* (tenascin C), *MMP3* (matrix metalloproteinase 3) y *TNMD* (tenomodulin).

Los cebadores utilizados para la cuantificación de marcadores específicos de tendón fueron diseñados previamente por miembros del grupo de investigación a partir de la secuencia equina o la de humana o ratón existentes en las base de datos y se muestran en la Tabla 2.

En el caso de las muestras de tendón, la expresión de los genes de la Zona 3 (MIZ) fueron expresados como media de los valores absolutos analizados.

Para el estudio de los resultados de expresión génica analizados se ha tomado como “tendón control normal”, un fragmento tendinoso de la zona 1 de cada uno de los tendones estudiados.

GENE	Accession number	Primer sequence (5'-3')
GAPDH	NM_001163856	F:GGCAAGTTCATGGCAGAGT R:CACAACATATTCAGCACCAGCAT
B2M	NM_001082502.2	F:TCGTCCTGCTCGGGCTACT R:ATTCTCTGCTGGGTGACGTGA
COL1A1	AF034691	F:ACACAGAGGTTTCAGTGGTTTGG R:CACCATGGCTACCAGGTTTAC
COL3A1	XM_001917620	F:GGAGGATGGTTGCACTAAACA R:GTCCACACCGAATTCTTGATC
COMP	AF325902	F:GGCGACGCGCAAATAGA R:GCCATTGAAGGCCGTGTAA
ACAN	AF019756	F:CTACGACGCCATCTGCTACA R:ACCGTCTGGATGGTGATGTC
SCX	AB254030.1	F:AACCAGAGAAAGTTGAGCAAGGA R:TGTGCCCCGAGTCAGGTCC
TNC	XM_001916622	F:TGTGTTCTGAGACGCAAAA R:TCCCAAACCCAGTAGCAT
MMP3	NM_001082495	F:TGATGTGACTGGCATTCAATCC R:ATCGCACATGGCTAGTGTTCCA
TNMD	AF0423803	F:AAGACTTTGAGGAGGATGGTGAAG R:CCACCCACTGCTCGTTTTG
DCN	AF038127	F:AAGTACATCCAGGTTGTCTACCTTCATAA R:CAGGTGGGCAGAAGTCATTAGATC

Tabla 3. Cebadores utilizados para la cuantificación de la expresión de genes relacionados con la regeneración tendinosa

4.11. Herramientas bioinformáticas

Las variables cuantitativas se describieron en función de su media aritmética y la desviación estándar (DS).

El análisis de las diferencias observadas en proliferación celular, así como en los parámetros ecográficos en tiempo 0 y final se realizó mediante la prueba de T-Student.

La valoración de las diferencias observadas a partir de la evolución de los parámetros ecográficos se llevó a cabo mediante medidas repetidas con un análisis de varianza (ANOVA) a dos vías y test de Bonferroni.

Las diferencias entre tratamientos para parámetros histológicos fueron analizadas mediante un ANOVA y las variaciones intergrupos fueron posteriormente evaluadas aplicando pruebas pos hoc (DUNCAN).

La expresión génica de marcadores de superficie y genes de tendón se analizó mediante el test de Mann-Whitney para muestras no paramétricas.

Los datos fueron recogidos en Microsoft Excel 2007 y se analizaron con SPSS 19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, <http://www.spss.com>).

El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$ para todos los análisis.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento y proliferación de MSCs

Se han obtenido MSCs de un total de 12 caballos: en 6 de ellos a partir de médula ósea y en los otros 6 a partir de tejido adiposo. En todos los animales, las células mostraron la morfología característica fibroblástica, no observándose morfologías anómalas en ningún caso.

Las MSCs utilizadas en los diferentes experimentos y en el ensayo “in vivo” se encontraban en pase 3 de cultivo. Para cada animal también se mantuvieron células criopreservadas en los pases 1 y 2 para posibles futuras actuaciones.

Se realizó un ensayo de proliferación para comprobar que las células aisladas mantenían su capacidad de proliferación antes de ser inoculadas en el animal.

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos y se contaron por triplicado las células pertenecientes a cada animal durante siete días. A partir del conteo directo en un contador automático de células y partículas (Coulter, Beckman Coulter Internacional SL) se determinó el tiempo de doblaje observándose algunas diferencias entre animales y entre orígenes, como ya observaron otros autores (Izadpanah *et al.*, 2005).

Los tiempos de doblaje medio para todos los animales fueron de $2,4 \pm 0,4$ días para las células procedentes de médula ósea y de $2,2 \pm 0,2$ días para las provenientes de tejido adiposo.

Se han realizado diversos ensayos para establecer la capacidad de proliferación en las MSCs equinas, observándose que el tiempo de doblaje para las AT-MSCs era superior a la observada para las BM-MSCs en pase 3 (Vidal *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2007).

5.2. Diferenciación de MSCs

Para comprobar si las células aisladas cumplen los requerimientos establecidos por la ISCT se procedió a la diferenciación de las MSCs de los diferentes animales a los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico.

5.2.1. Diferenciación osteogénica

La diferenciación osteogénica se indujo en cultivos de BM-MSCs y AT-MSCs durante 7-9 días. La valoración de la diferenciación se llevó a cabo por medio de la tinción específica para calcio alizarin red (ver Figura 27), y mostró que ambos tipos celulares poseían potencial osteogénico pero que la diferenciación ocurría de forma más rápida en las BM-MSCs que en las AT-MSCs. En conjunto, las MSCs equinas se diferenciaron más rápido que las MSCs de otras especies (Baksh *et al.*, 2004).

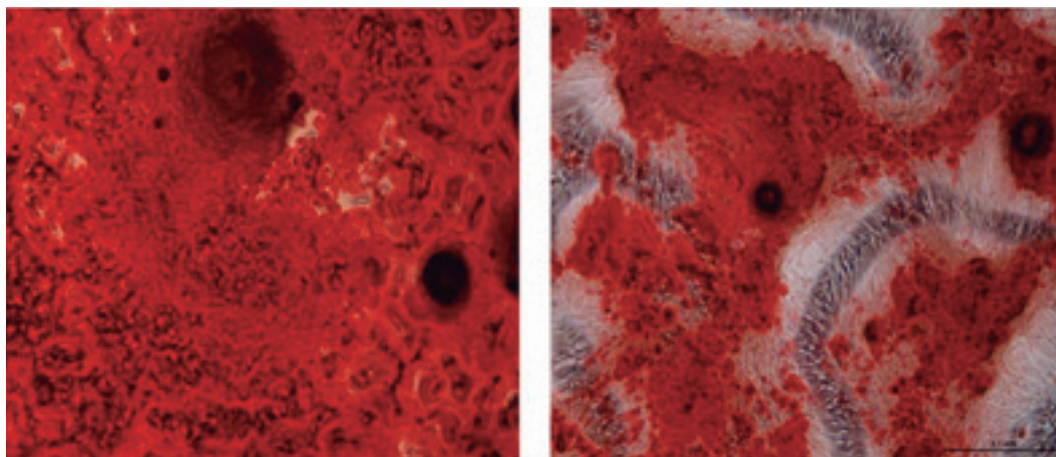


Figura 27. Tinción de la osteógenesis con alizarin red en BM-MSCs (imagen izquierda) y AT-MSCs (imagen derecha). Magnificación 4x

5.2.2. Diferenciación adipogénica

La observación de gotas lípidicas mediante tinción con Oil red en el día 15 de inducción de la diferenciación fue indicativo de la capacidad de diferenciación a dicho linaje (ver Figura 28). Aunque ya se observó la acumulación de gotas lípidicas en los primeros días de cultivo. Estos resultados son acordes con los encontrados por otros autores (Mambelli *et al.*, 2009).

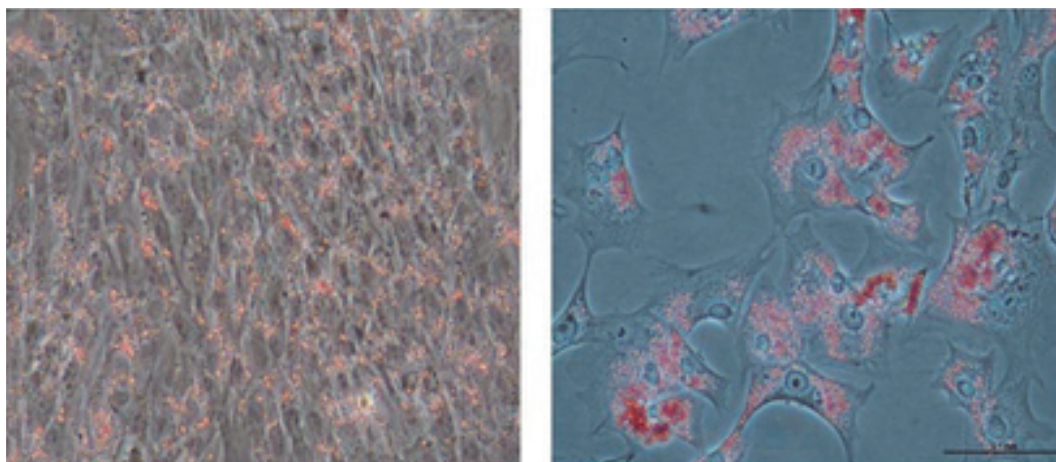


Figura 28. Tinción de la adipogénesis con oil red O en BM-MSCs (imagen izquierda) y AT-MSCs (imagen derecha). Magnificación 20x

5.2.3. Diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica de BM-MSCs y AT-MSCs se indujo durante 21 días en sistemas de micromasas. La tinción con hematoxilina y eosina realizada el día 21 de la diferenciación mostró como las BM-MSCs sufrieron los cambios morfológicos correspondientes hacia el fenotipo de condrocito con forma de lagunas y, además, la aparición de una matriz extracelular hialina (ver Figura 29). Sin embargo, las AT-MSCs no parecieron modificar su

fenotipo ni presentaron cambios en la matriz extracelular, además se apreció la aparición de picnosis en los núcleos, lo cual sería indicativo de necrosis celular. Estos resultados están de acuerdo con lo presentado en la especie equina que describe que las AT-MSCs tienen un menor potencial condrogénico que las BM-MSCs (Vidal *et al.*, 2008).

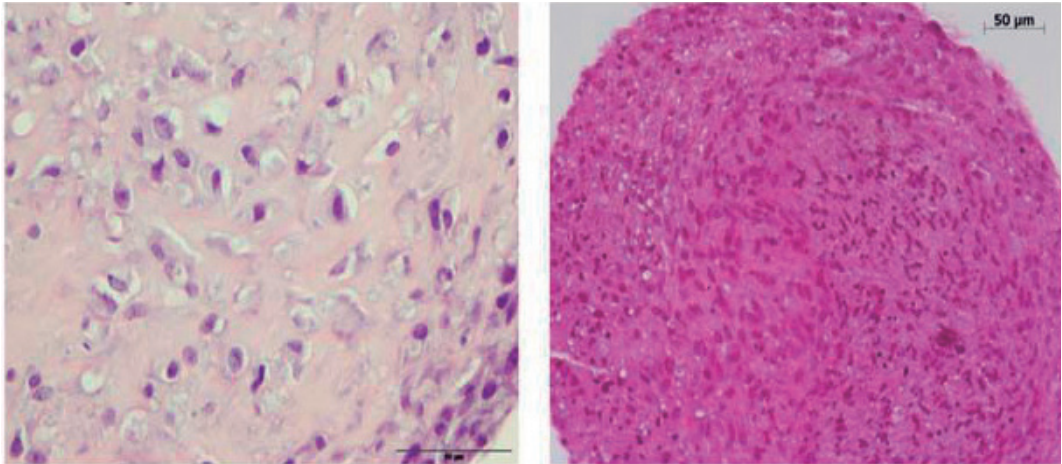


Figura 29. Tinción con hematoxilina y eosina de la diferenciación condrogénica de BM-MSCs (imagen izquierda), Magnificación 10x y AT-MSCs (imagen derecha) 20x

5.3. Expresión génica de marcadores de superficie

Utilizando la técnica RT-qPCR se confirmó la expresión génica de una serie de antígenos para comprobar su presencia o ausencia en la superficie de las MSCs aisladas, como uno de los requerimientos de la ISCT (ver Figura 30). Se detectó la expresión génica de los antígenos *CD13*, *CD44*, *CD29*, *CD49d*, *CD73*, *CD90*, *CD105*, *CD106*, *CD146* y *CD166* en las células obtenidas de ambos orígenes, siendo la expresión de *CD29*, *CD90* y *CD44* mayor en las AT-MSCs que en las BM-MSCs.

La expresión del marcador hematopoyético *CD34* se detectó en las AT-MSCs. Este resultado estaría de acuerdo con lo descrito para la especie humana, aunque la expresión de este marcador tiende a desaparecer a medida que los pases van avanzando y el cultivo se va haciendo más homogéneo (Mitchell *et al.*, 2006).

La ausencia de expresión de *CD45* se confirmó mediante la no detección del mRNA RT-qPCR, indicando que las MSCs equinas no expresan este marcador hematopoyético, al igual que en el caso de la especie humana (Kern *et al.*, 2006). Tampoco se observó amplificación del mRNA de *CD31*, marcador endotelial, de acuerdo con el fenotipo establecido en las MSCs humanas (Kern *et al.*, 2006).

También se detectaron diferencias significativas entre BM-MSCs y AT-MSCs para algunos de los marcadores estudiados: *CD29*, *C44* y *CD90*.

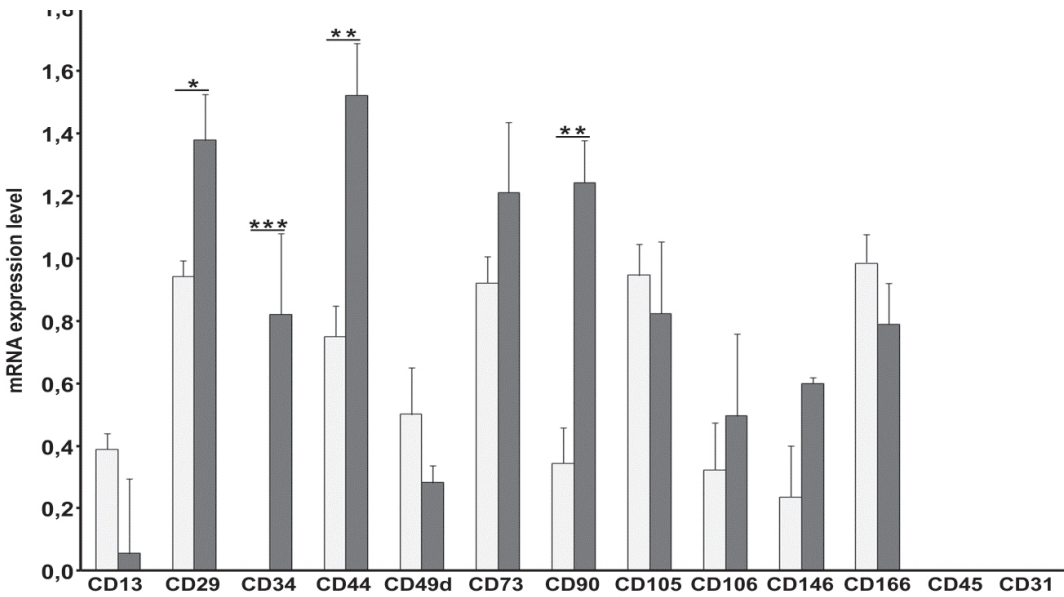


Figura 30. Expresión de mRNA de los marcadores de superficie *CD13*, *CD29*, *CD34*, *CD44*, *CD49d*, *CD73*, *CD90*, *CD105*, *CD106*, *CD146*, *CD166*, *CD45* y *CD31*. Barras gris claro corresponden a BM-MSCs y barras gris oscuro a AT-MSCs. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5.4. Valoración de la capacidad inmunomoduladora de las MSCs

Para la valoración de la capacidad inmunomoduladora de las MSCs se llevó a cabo la incubación de 1×10^5 PBMCs en placas de 96 pocillos, con diferentes cantidades de MSCs procedentes de la médula ósea (BM-MSCs) o del tejido adiposo (AT-MSCs). El número de animales utilizado es de 6:3 caballos (animales H13, H14 y H15), donantes de PBMCs y 3 caballos (animales H1, H2 y H3) de los que se obtienen las MSCs de ambos orígenes. Podemos representar los datos obtenidos de dos maneras diferentes, lo que nos permite obtener una información distinta para cada tipo de representación. El cocultivo de las PBMCs y MSCs obtenidas de cada animal (H1, H2 y H3) y origen (AT-MSCs y BM-MSCs) muestra una disminución en la proliferación de las PBMCs estimuladas con PHA en los ratios altos en comparación con el control (PBMCs + PHA, ver Figura 31). Concretamente, la proporción 1:1 muestra siempre diferencias significativas excepto para la combinación de H3 y BM-MSCs (ver Figura 31 F).

Además, en el caso de las AT-MSCs, la proporción 1:1 también muestra diferencias significativas en la proliferación de las PBMCs con respecto al ratio 1:50 en los animales H1 y H2 (ver Figura 31 A y B) y para el ratio 1:10 en las del animal H3 (ver Figura 31 E). Además, las AT-MSCs del animal H1 muestran diferencias significativas en el crecimiento entre el ratio 1:10 y las PBMCs estimuladas con PHA control, (ver Figura 31 A). Todas las proporciones para las AT-MSCs del animal H3 cocultivadas muestran una reducción estadísticamente significativa en el crecimiento de las PBMCs con respecto a los controles con PHA (ver Figura 31 E).

Respecto a las BM-MSCs, la proporción 1:1 del animal H2 muestra una reducción estadísticamente significativa en comparación con el resto de proporciones MSCs/PBMC estudiadas (Figura 31 D). Por último, para el animal H3 se encuentran diferencias significativas únicamente entre las proporciones 1:1 y 1:50 (ver Figura 31 F).

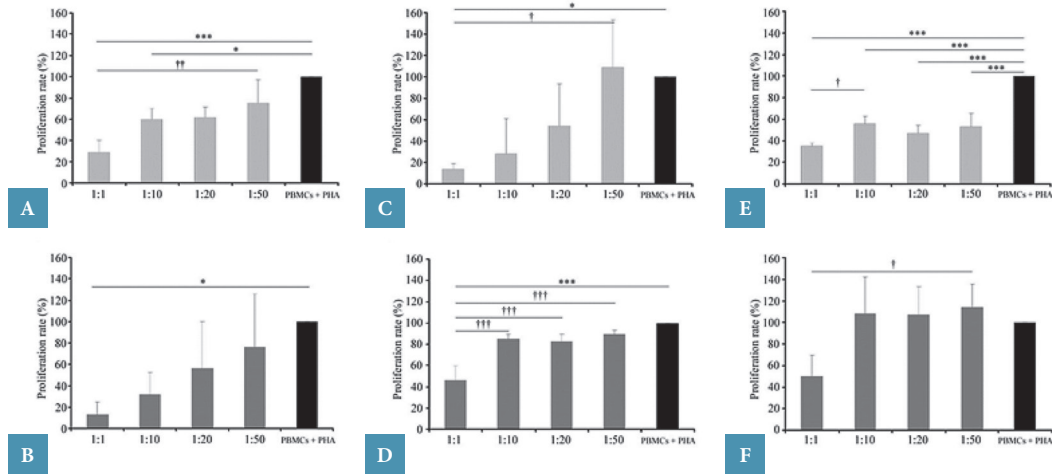


Figura 31. Cocultivo de MSCs equinas (n = 3) con PBMCs alogénicas estimuladas con PHA (n = 3). El eje y representa la tasa de proliferación (%) y el eje x la proporción MSCs/PBMCs evaluadas y el control (PBMCs + PHA). Las barras gris claro corresponden a las AT-MSCs, las gris oscuro a las BM-MSCs y las negras al control (PBMCs + PHA). A. y B. MSCs del animal H1. C. y D. MSCs del animal H2. E. y F. MSCs del animal H3. Los datos se representan como $\bar{x} \pm sd$. Significación respecto al control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Significación entre las diferentes proporciones: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Cuando estudiamos de manera separada el efecto de las AT-MSCs y BM-MSCs sobre la proliferación de las PBMCs de los animales H13, H14 y H15 (ver Figura 32), a pesar de la alta variabilidad presente, podemos observar una tendencia a una capacidad de supresión más potente para el caso de las AT-MSCs frente a las BM-MSCs. Necesitaremos más estudios para ampliar el número de animales evaluados para confirmar esta tendencia. Además, también encontramos una alta variabilidad en la proliferación de las PBMCs de los 3 donantes, especialmente a las proporciones bajas del cocultivo.

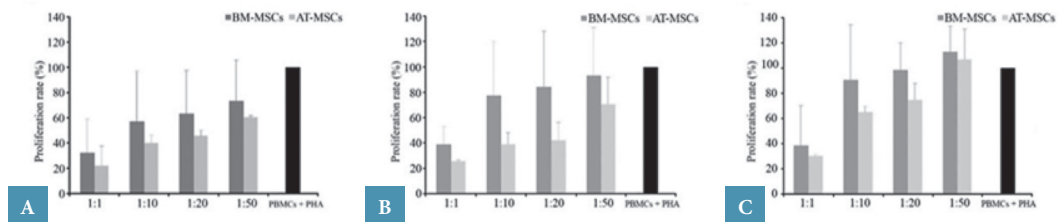


Figura 32. Cocultivo de BM-MSCs (n=3) y AT-MSCs (n=3) con PBMCs alogénicas estimuladas con PHA (n=3). El eje y representa la tasa de proliferación (%) y el eje x la proporción MSCs: PBMCs evaluadas y el control (PBMCs + PHA). Las barras gris oscuro corresponden a las BM-MSCs, las gris claro a las AT-MSCs y las negras al control (PBMCs + PHA). A. Corresponde a las PBMCs del animal H13. B. Corresponde a las PBMCs del animal H14. C. Corresponde a las PBMCs del animal H15. Los datos se representan como las $\bar{x} \pm sd$.

Las propiedades inmunomoduladoras in vitro de las MSCs han sido descritas en ratón (Yanez *et al.*, 2006; Sotiropoulou y Papamichail, 2007), humano (Aggarwal y Pittenger, 2005; Yanez *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2008) y perro (Lee *et al.*, 2011b). En concreto, las AT-MSCs caninas (Kang *et al.*, 2008), humanas y murinas (Yanez *et al.*, 2006) muestran un mayor efecto inmunomodulador a los ratios altos del cocultivo. De acuerdo con estos resultados, las AT-MSCs equinas también muestran un mayor potencial inmunosupresor a los ratios altos, especialmente 1:1 y 1:10. Los mismos ratios para el cocultivo de BM-MSCs muestran la mayor disminución en la proliferación de las PBMCs, lo que coincide con lo descrito en la especie humana (Pittenger *et al.*, 1999). De manera similar a lo publicado en trabajos previos empleando MSCs humanas (Pittenger *et al.*, 1999), que describen diferentes patrones de proliferación en función del donante de PBMCs, también se observa una alta variabilidad en todos los ratios de MSCs equinas empleados en nuestro estudio.

5.5. Obtención de PRPs

A partir de sangre periférica y mediante el método descrito en el Apartado 4.9 de Material y Métodos se consiguió obtener de forma satisfactoria en los caballos H1, H2, H3, H7, H8 y H9 un volumen de entre 10 y 15 ml de PRP de los cuales solo 9 ml se utilizaron para el tratamiento de los tendones lesionados.

En todos los casos el concentrado plaquetario obtenido contenía un mínimo de 250.000 plts/ul. Existe un consenso general en establecer una correlación positiva entre la concentración de plaquetas y la concentración de factores de crecimiento (FG). También se ha descrito una fuerte correlación entre las concentraciones de factores de crecimiento y la expresión de genes relacionados con la producción de matriz extracelular (Molloy *et al.*, 2003b; Haupt *et al.*, 2006), así como una relación dosis-dependiente entre algunos factores de crecimiento y la síntesis de algunos componentes; por ejemplo, IGF-1 y la síntesis de colágeno ó PDGF y colágeno tipo I (Molloy *et al.*, 2003b).

Los factores de crecimiento actúan por unión a los receptores presentes en la superficie de las membranas celulares y una vez que los receptores han sido ocupados por los FC, estos son internalizados por la célula de forma que el estímulo de esa señal no actúa de forma perpetua (Abellanet, 2009). Por ello y aunque la concentración de plaquetas sea un factor importante sobre el efecto terapéutico, puede no ser determinante debido a la saturación de la población de receptores celulares. Se desconoce la concentración óptima de plaquetas o de FC que hay que aportar en el tratamiento de las lesiones de los tejidos en caballos, pero se sabe que en los tejidos sanos la respuesta a los FC se maximiza cuando la concentración de plaquetas es 4 veces la del plasma normal o algo menor (Schnabel *et al.*, 2008).

Actualmente la tendencia en el uso de los PRP no está enfocada hacia una alta concentración en plaquetas sino a un buen procesado de la sangre para conservar la integridad plaquetaria

pues este factor es tan importante como la concentración plaquetaria a la hora de conseguir un efecto terapéutico del PRP más prolongado en el tiempo (Hessel *et al.*, 2015).

Por otra parte la composición del PRP es compleja y además de factores de crecimiento también puede contener leucocitos y otros tipos celulares. A este respecto, se ha relacionado el uso de este producto biológico con reacciones inflamatorias adversas transitorias o incluso graves, debido a la presencia excesiva de este tipo de células inflamatorias en el PRP.

Este hecho se debe a que los leucocitos pueden activarse y liberar gran cantidad de citoquinas catabólicas, de forma que, se ha comprobado la relación directa entre la concentración de leucocitos en el PRP y la sobreexpresión de metaloproteinasas (MMP3 y MMP13) en los tendones tratados.

En nuestro trabajo, las extremidades de los caballos que se han tratado con PRP no han mostrado ninguna reacción adversa tras la implantación del mismo. Tan solo se observó una ligera reacción inflamatoria que perduró alrededor de 24 horas desapareciendo posteriormente. Otros autores, (Wadhwa *et al.*, 1996; Fortier, 2008), señalan que las reacciones adversas que se describen tras la aplicación de PRP se deben a su inyección durante la fase inflamatoria inicial en la que pueden ocurrir reacciones de tipo citotóxico que desencadenen una degranulación leucocitaria masiva de citoquinas, por lo que se desaconseja el uso de PRP durante los primeros 10-15 días de la lesión.

A pesar de existir en el mercado múltiples kits y diversos métodos para la obtención de PRP, ninguno de ellos garantiza la ausencia total de leucocitos en los mismos (Hessel *et al.*, 2015). Algunos autores (Fortier, 2008) señalan que el efecto terapéutico del PRP depende no solo de los factores señalados anteriormente sino de otros, como la congelación previa a su aplicación (Stack y Snyder, 1994; Kluter *et al.*, 1997). Sin embargo, cuando el PRP se congela, los leucocitos se lisan, las metaloproteinasas se inactivan y se modula de esta forma la respuesta catabólica (Anitua *et al.*, 2013). El PRP puede ser mantenido en congelación durante 6 meses (Abellanet, 2009).

En nuestro caso se utilizó PRP sin congelación previa obtenido por el método de doble centrifugación en tubo descrito anteriormente y en estrictas condiciones de asepsia, de forma que aunque no se obtenga un producto “estándar”, si es un producto seguro y garantiza una concentración plaquetaria suficiente para tener un efecto terapéutico adecuado (Abellanet, 2009; Hessel *et al.*, 2015).

5.6. Inducción de la lesión quirúrgica en el TFDS

El caballo es considerado como el mejor modelo animal para la búsqueda de terapias para el tratamiento de patologías del aparato locomotor con resultados extrapolables a la especie

humana. Para su utilización como modelo animal, resulta de vital importancia el establecimiento de un modelo de inducción de lesiones tendinosas. Los modelos desarrollados hasta el momento, aunque presentan ventajas e inconvenientes, ninguno de ellos simula de forma óptima las lesiones naturales que se producen en los caballos durante su actividad deportiva (Lake *et al.*, 2008).

Las lesiones tendinosas se pueden inducir mediante diferentes métodos, que básicamente se clasifican en dos categorías: los métodos enzimáticos, que incluyen el uso de collagenasa (Nixon *et al.*, 2008a; Schnabel *et al.*, 2009; Crovace *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2011), o gel de collagenasa (Watts *et al.*, 2011b; Watts *et al.*, 2012) y los métodos mecánico-quirúrgicos (Caniglia *et al.*, 2012).

En nuestro trabajo se utilizó un método mecánico-quirúrgico para crear lesiones en ambas extremidades de los 12 animales incluidos en el mismo. Las lesiones se generaron de forma satisfactoria y sin complicaciones derivadas del propio acto quirúrgico (ver figura 33).

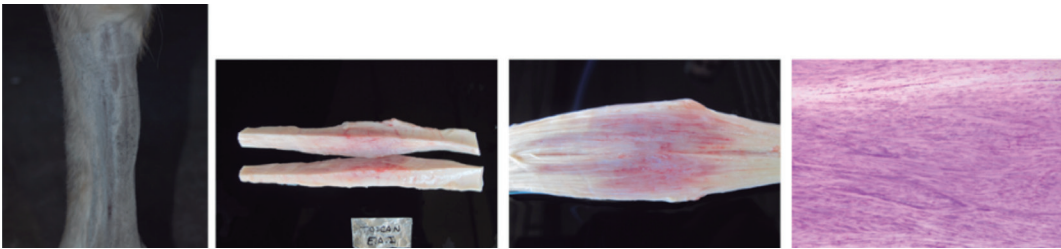
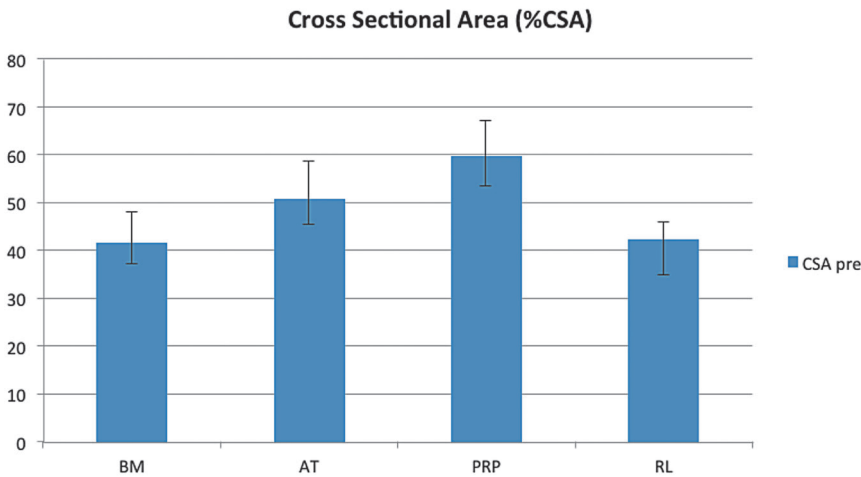


Figura 33. Ejemplo de lesión inducida en TDFS por método mecánico-quirúrgico

Los valores de los parámetros ecográficos a tiempo 0, es decir tras la realización de la lesión, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos de animales, incluidos en el estudio por lo podemos deducir que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las lesiones creadas entre grupos. La cuantificación del área de lesión producida se realizó ecográficamente mediante el parámetro CSA a tiempo 0. Por otra parte, la longitud

Figura 34. Valores de CSA a tiempo 0 en los diferentes animales agrupados en cuatro lotes, en función del tratamiento recibido con posterioridad. Los datos se representan como las medias \pm desviaciones estándar. Significación respecto al control: * $p < 0.05$



de la lesión siempre era constante en todos los animales, pues este factor dependía de la propia técnica quirúrgica. Para valorar las diferencias existentes entre las lesiones creadas en los diferentes animales, éstos fueron agrupados en cuatro lotes que nos permitieron comparar posteriormente el efecto de los diferentes tratamientos aplicados (BM-MSCs, AT-MSCs, PRP y RL). Los resultados obtenidos para el parámetro CSA se muestran en la Figura 34.

La elección de un método mecánico-quirúrgico se ha debido a diferentes razones que se detallan a continuación:

1. Las lesiones inducidas mecánicamente reproducen de manera efectiva los hallazgos histológicos descritos en las lesiones naturales como son la hipervascularidad, hipercelularidad, pérdida de la organización del colágeno y de la matriz extracelular y tenocitos con morfología condroide (Astrom y Rausing, 1995).
2. El método quirúrgico permite crear una lesión estandarizada que con los métodos enzimáticos no se consigue. Además, las lesiones generadas por métodos enzimáticos son muy irregulares y frecuentemente continúan expandiéndose, como señalan algunos autores, hasta las 4-6 semanas post-inducción (Williams *et al.*, 1984; Birch *et al.*, 1998; Watts *et al.*, 2012).

En las lesiones naturales las reacciones perilesionales son bastante limitadas (Dahlgren *et al.*, 2005).

En nuestro estudio, la lesión creada solo aumentó hasta la primeros 4 días y en el momento de instaurar el tratamiento (1ª semana) ésta era completamente estable. Además de conseguir una estandarización del tamaño lesional, no encontramos una reacción peritendinosa exagerada en ninguno de los tendones inducidos, aunque en todos ellos se produjo una ligera respuesta cicatricial peritendinosa con adherencias a la vaina del tendón.

Por todo lo citado anteriormente los resultados clínicos obtenidos tras la inducción de la lesión son coherentes con los resultados histológicos macro y microscópicos del experimento presentando los animales dolor e inflamación moderada de las extremidades solamente durante un corto periodo del postoperatorio.

Por otra parte el método de inducción mediante colagenasa, permite que la enzima se extravase a través del canal creado por la aguja empleada para la inoculación de esta sustancia y se desarrollen reacciones peritendinosas muy graves. Este hecho conlleva implicaciones clínicas ya que cuando se produce una respuesta inflamatoria exagerada peritendinosa, los animales muestran fuerte inflamación y edema en la extremidad, acompañada de grave cojera. Las inflamaciones peritendinosas provocan fuertes adherencias en el peritendón y limita de forma ostensible la función biomecánica de esta estructura.

A pesar de todo ello son muy numerosos los estudios que han utilizado el método enzimático como modelo de lesión (Dahlgren *et al.*, 2002; Kersh *et al.*, 2006; Nixon *et al.*,

2008a; Oryan *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2013), ya que este método posee también algunas ventajas. Una de ellas es que se puede realizar con caballos en la estación sin necesidad de anestesia general como en el caso del método quirúrgico, evitando así posibles complicaciones anestésicas y postquirúrgicas, además de disminuir los costes del proceso. Watts y colaboradores (Watts *et al.*, 2011a) desarrollaron una técnica enzimática con colagenasa que mejora las principales deficiencias que presenta el método enzimático y que hemos comentado anteriormente. Se trata de colagenasa gelificada, que evita la extravasación de la enzima al espacio peritendinoso por lo que permite crear una lesión más estandarizada y disminuyendo las lesiones peritendinosas. Según sus autores, mimetiza mejor las lesiones naturales que se caracterizan porque siempre van precedidas de fenómenos degenerativos graves, a diferencia de las inducidas donde predominan los fenómenos inflamatorios.

Por último, la técnica quirúrgica empleada para la inducción de las lesiones nos ha permitido, además de todas las ventajas mencionadas anteriormente, la creación de un receptáculo central ó “core lesion”, al igual que ocurre en la mayor parte de las lesiones naturales agudas, donde aplicar los diferentes tratamientos, un lecho que según opinan algunos autores es crucial para una mayor supervivencia de las MSCs aplicadas (Patterson-Kane y Firth, 2009).

5.7. Valoración de la efectividad de los diferentes tratamientos

5.7.1. Parámetros estudiados “in vivo”

5.7.1.1 Resultados del análisis clínico

Los resultados obtenidos para los parámetros clínicos incluidos en el presente trabajo (tiempo de recumbencia, frecuencia cardíaca y respiratoria, dolor a la palpopresión en la zona lesionada, grado de inflamación de las extremidades afectadas y grado de cojera al paso sobre superficie dura) mostraron que no existieron diferencias entre tratamientos para ninguno de los parámetros analizados. Tampoco se observaron diferencias cuando se compararon los diferentes tratamientos con el grupo control.

A partir de las 4 semanas, todos los caballos incluidos en el estudio presentaban valores clínicos normales y tan solo mostraban ligera cojera al trote en terreno duro, así como un ligera sensibilidad a la palpopresión en la zona lesionada. También persistió un cierto engrosamiento externo sobre el área de proyección de la lesión tendinosa que fue disminuyendo pero que se mantuvo hasta el final del experimento. Los parámetros de sensibilidad a la palpopresión y grado de cojera, fueron normalizándose siendo completamente normales hacia la semana 10ª tras el tratamiento (ver Figura 35).

Estos resultados están en concordancia con otros ensayos clínicos publicados donde se comparan diferentes tratamientos en lesiones inducidas en los que no encuentran diferencias entre tratamientos en cuanto a la sensibilidad por palpación y grado de inflamación de las extremidades afectadas (Carvalho *et al.*, 2011), ni en lo que respecta al grado de cojera (Watts *et al.*, 2011a).

Del mismo modo, también podemos indicar que, en ninguno de los caballos se observaron efectos adversos sistémicos tras la implantación intratendinosa de ninguno de los tratamientos establecidos.



Figura 35. Uno de los caballos incluidos en el estudio a la décima semana post-tratamiento. A este tiempo, el caballo no presenta sensibilidad a la palpación, aunque persiste el engrosamiento del tendón flexor superficial

5.7.1.2. Resultados del análisis ecográfico

Como ya se ha comentado en anteriores apartados, los parámetros ecográficos medidos para establecer el seguimiento y valorar los resultados de los diferentes tratamientos aplicados fueron: TES (tendon ecogenicity score), FPS (Fiber pattern score) y CSA% (Cross sectional area ratio/ %).

Si tenemos en cuenta los tres parámetros ecográficos valorados en dos tiempos, uno previo al tratamiento (tiempo 0) y otro post-tratamiento previo al sacrificio (semana 45^a), podemos observar en la Figura 37, que para el parámetro TES las diferencias entre los dos tiempos son altamente significativas para los tres tratamientos e incluso significativa para el grupo control (RL).

Estos resultados son perfectamente explicables, ya que el TES solo valora la ecogenicidad de la lesión y es esperable que en cualquier lesión tendinosa tratada o no, en la fase de consolidación y/o maduración, la ecogenicidad tienda a la normalidad es decir sea isoecoica y los valores del TES, por lo tanto, correspondan con valores muy bajos en todos los casos.

Para los otros dos parámetros ecográficos analizados, FPS y CSA% se detectaron diferencias muy significativas en los tres tratamientos entre la semana 0 y la semana 45, no encontrándose significación entre los dos tiempos en el grupo control como puede observarse en la Figura 38.

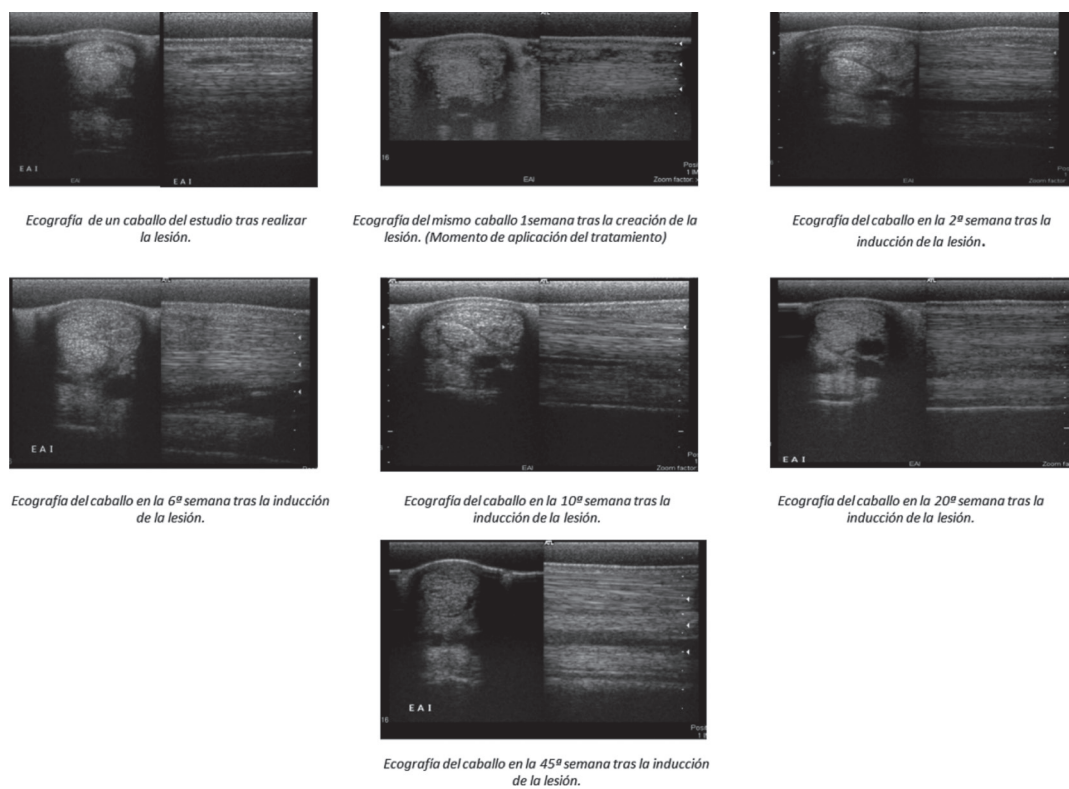


Figura 36. Serie ecográfica del seguimiento ecográfico de un caballo incluido en el estudio(H3) en diferentes tiempos a lo largo de las 45 semanas del ensayo

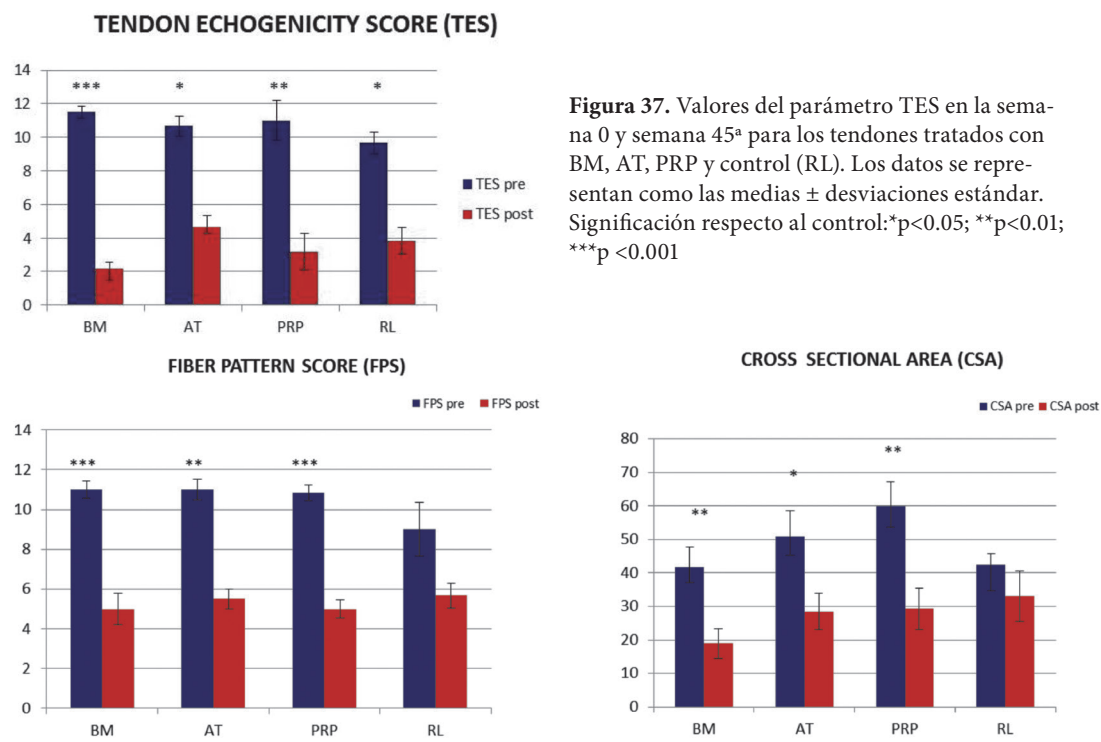


Figura 38. Valores de los parámetros FPS (a) y CSA (b) en la semana 0 y semana 45ª para los tendones tratados con BM, AT, PRP y control (RL). Los datos se representan como las medias ± desviaciones estándar. Significación respecto al control: *p<0.05; **p<0.01

Los parámetros FPS Y CSA%, están más estrechamente relacionados con la calidad del tejido de reparación y la eficacia del tratamiento, que el parámetro TES y por lo tanto podemos deducir que aunque se ha producido una evolución cicatricial tanto en los tendones tratados como en los control, la calidad del tejido reparado, es mejor en los tendones tratados que en los tendones control, sobre todo en lo que se refiere al parámetro FPS que está directamente relacionado con la alineación de las fibras de colágeno.

Este resultado puede ser importante teniendo en cuenta que la calidad del tejido de reparación es crucial, ya que, de ella dependen las propiedades mecanobiológicas del tendón reparado. Desde un punto de vista clínico, la probabilidad de recidivas en las tendinitis está inversamente relacionadas con la calidad de la cicatriz del tendón tras el proceso de rehabilitación, de forma que, a menor calidad tisular del tendón reparado, peores características biomecánicas, y mayores tasas de recaída.

Además de realizar una comparación entre los valores de los parámetros ecográficos entre el tiempo 0 (semana 0) y el tiempo final (semana 45^a), se ha llevado a cabo el estudio de la evolución de dichos parámetros a lo largo de la duración del ensayo. Se han valorado los parámetros TES, FPS y CSA en las semanas 0, 2^a, 6^a, 10^a, 20^a y 45^a.

La evolución de los valores para el parámetro TES se muestran en la Figura 39. Como puede observarse, la evolución en los tendones tratados presenta un patrón similar en los tres tratamientos, mientras que los tendones control muestran una progresión en meseta hasta la semana 10 y a partir de ese tiempo, los cuatro grupos siguen un patrón descendiente similar.

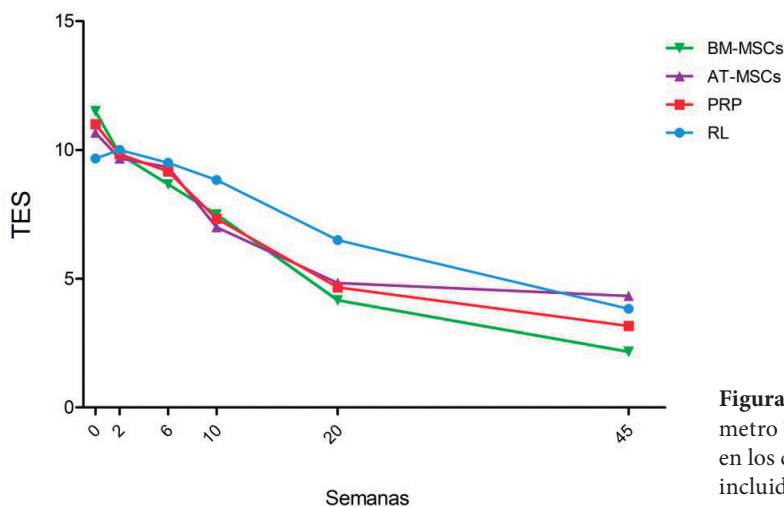


Figura 39. Evolución del parámetro TES a lo largo del ensayo en los cuatro grupos de animales incluidos en el estudio

Si estos resultados los valoramos sobre un diagrama de barras (ver Figura 40) observamos como para los tendones tratados con BM-MSCs las diferencias significativas comparándolas con el tiempo 0 comienzan a observarse ya en la semana 6^a y para los tratados con AT-MSCs (AT), PRP y RL a partir de la semana 10^a.

Así pues, estos resultados ponen de manifiesto que atendiendo a este parámetro, la evolución de las lesiones tratadas es más rápida, ya que los valores son más bajos a partir de la semana 10ª, destacando los tratados con BM-MSCs, que en la semana 6ª, ya presentan diferencias significativas respecto al tiempo 0, manteniéndose los más bajos de los cuatro grupos hasta el final del estudio.

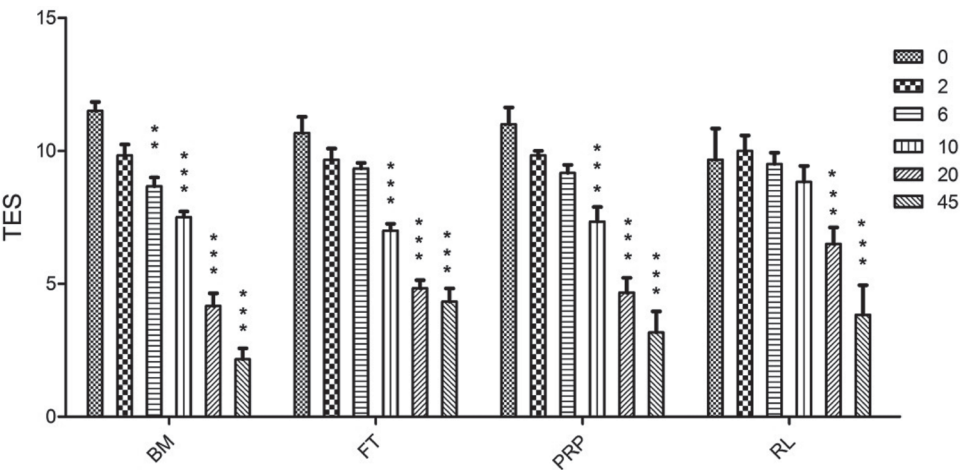


Figura 40. Evolución del parámetro TES a lo largo del ensayo en los cuatro grupos de animales incluidos en el estudio

Si valoramos de igual manera la evolución en el tiempo del parámetro FPS podemos observar en la Figura 41 como en los tendones tratados, aún partiendo de valores más desfavorables, se observa un evolución positiva descendente. En el caso de los tendones control (RL) podemos observar como hasta la semana 6ª los valores incluso empeoran y no es hasta la semana 10ª cuando los valores comienzan a disminuir.

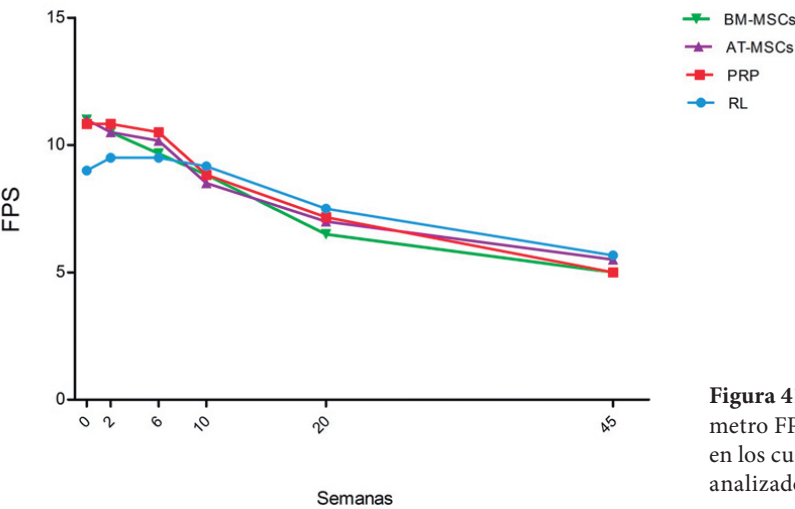


Figura 41. Evolución del parámetro FPS a lo largo del ensayo en los cuatro grupos de animales analizados

Al valorar la significación de las diferencias en un diagrama de barras (ver Figura 42) se detectan diferencias muy significativas en los tendones tratados (BM, AT y PRP) con respecto al tiempo 0, a partir de la semana 10ª, siendo altamente significativas a partir de la semana 20ª.

Cabe destacar que en el grupo control y para este parámetro los valores no son altamente significativos hasta el final del ensayo. Por lo que otra vez se pone de manifiesto que la evolución de las lesiones es mejor y más rápida en los grupos tratados que en el control.

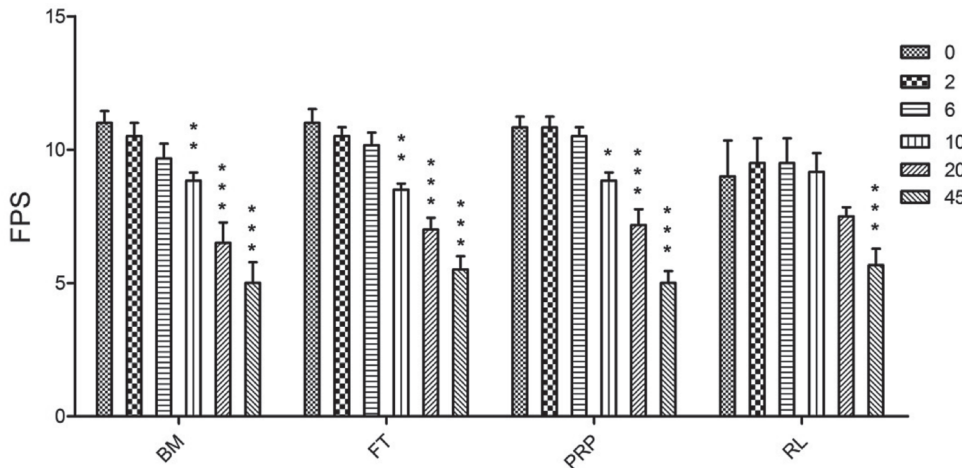


Figura 42. Evolución del parámetro FPS a lo largo del ensayo en los 4 grupos de animales y cuatificación de las diferencias. Los datos se representan como las medias \pm desviaciones estándar. Significación respecto al control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Del mismo modo, para el parámetro CSA observamos en la Figura 43 resultados semejantes a los observados para el parámetro FPS, en el que los tendones tratados (BM, AT y PRP) muestran una tendencia evolutiva favorable desde la semana 0 hasta la semana 45, mientras que en el grupo control control (RL), los valores no comienzan a descender de forma apreciable hasta la semana 20^a, mostrando los valores finales más altos (peor regeneración) de los cuatro grupos del ensayo.

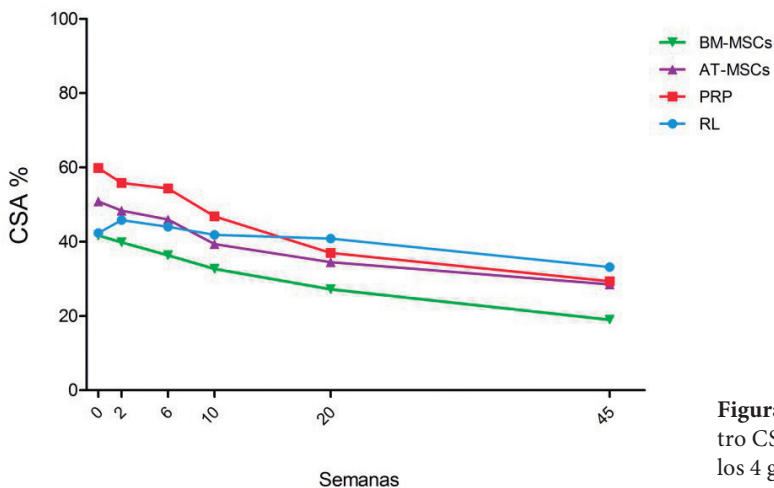


Figura 43. Evolución del parámetro CSA a lo largo del ensayo en los 4 grupos de animales

Podemos observar también para este último parámetro sobre el diagrama de barras, (ver Figura 44), cómo se observan diferencias altamente significativas entre el tiempo 0 y la semana 45^a para los tres tratamientos (BM, AT y PRP). Estas diferencias comienzan a observarse

en la semana 20ª para el tratamiento con BM y en la semana 10ª en el caso del tratamiento con AT y con PRP. En ninguno de los tiempos analizados se observan diferencias significativas con respecto al tiempo cero en el grupo control.

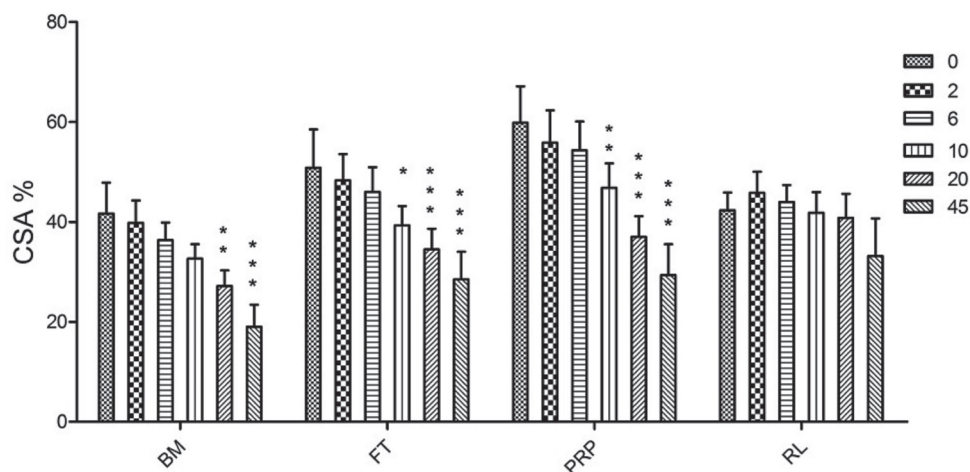


Figura 44. Evolución del parámetro FPS a lo largo del ensayo en los 4 grupos de animales y cuatificación de las diferencias. Los datos se representan como las medias \pm desviaciones estándar. Significación respecto al control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Los resultados observados en este último parámetro ecográfico ponen de manifiesto, que la reducción del área de lesión en los tendones control es muy pequeña con respecto a los tendones tratados, donde se observan diferencias altamente significativas entre el tiempo cero y el tiempo final del ensayo. La hipótesis que podría explicar la deficiente evolución del grupo control respecto a los grupos tratados, es que tanto las MSCs como el PRP, al implantarlos en una fase inflamatoria aguda (una semana tras la inducción de la lesión), han actuado modulando la respuesta inflamatoria y, por lo tanto la progresión de la lesión ha sido menor, e incluso el proceso remodelativo ha podido comenzar de forma más temprana que en el caso del grupo control.

Por otro lado, esta modulación de la respuesta inflamatoria se ha demostrado crucial en la evolución de la lesión, evitando fibrosis hiperplásicas en el tendón y mejorando, por tanto, la calidad del tejido cicatricial (Dakin *et al.*, 2014).

Carvalho y colaboradores (Carvalho *et al.*, 2013), observan este mismo efecto antiinflamatorio-inmunomodulador en lesiones inducidas con colagensa y tratadas con un complejo terapéutico (AT-MSCs y PRP). En nuestro caso, este efecto se podría atribuir tanto al grupo tratado con BM-MSCs como con AT-MSCs e incluso con PRP por si solos, ya que no se han utilizado productos biológicos u otros vehiculantes, que pudieran tener una acción sinérgica a la del tratamiento aplicado.

Todos estos resultados ecográficos están globalmente en concordancia con diferentes estudios realizados basados en las MSCs como terapia regenerativa en las que se ha utilizado BM-MSCs combinadas con sobrenadante de médula ósea (Caniglia *et al.*, 2012; Godwin *et al.*, 2012), BD-

MSCs resuspendidas en PBS (Marfe *et al.*, 2012), MSCs en suero autólogo (Pacini *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2011), en PRP, (Del Bue *et al.*, 2008) etc.

Las propiedades regenerativas y anabólicas de estos productos en el tratamiento de lesiones tendinosas está suficientemente demostrada ya que contienen gran cantidad de factores de crecimiento solubles (Smith *et al.*, 2006; Hessel *et al.*, 2015) y por lo tanto se hace difícil determinar si el efecto regenerativo observado en los diferentes ensayos publicados es atribuible a las MSCs, a los productos regenerativos empleados (PRP, plasma, suero autólogo, sobrenadante de médula ósea) ó más probablemente, a la acción sinérgica de ambos.

También hay numerosos trabajos en los que utiliza únicamente PRP como tratamiento en tendinitis naturales o inducidas en los que se observa una aumentada actividad metabólica y una maduración del tejido lesionado mas acorde al tendón normal (Bosch *et al.*, 2010).

En todos ellos se ha podido comprobar, ecográficamente, histológicamente y mediante marcadores de expresión génica de genes relacionados con la regeneración tendinosa, que existe una mejoría de estos parámetros frente a los tendones control sin llegar en ningún caso a un restablecimiento completo ni en la composición ni en la organización de un tendón sano.

Sin embargo, en la bibliografía consultada no se ha publicado hasta el momento, un estudio comparativo de los efectos terapéuticos de dos tipos de MSCs según su origen BM-MSCs y AT-MSCs, ni tampoco MSCs de cualquier origen frente a PRPs como ocurre en nuestro ensayo preclínico.

Debido a ello en el diseño de nuestro experimento se optó por utilizar RL como vehículo de las MSCs para su implantación y poder atribuir los resultados obtenidos a la acción exclusiva de las MSCs ó del PRP y no a una posible acción sinérgica de las MSCs y el producto vehiculizante empleado.

5.7.2. Parametros estudiados “in vitro”

5.7.2.1. Resultados del análisis histológico

El estudio histológico realizado incluye la evaluación de 5 parámetros: Morfología tenocítica (TM), Vascularización (V), Sustancia amorfa (GS), Orientación de las fibras de colágeno (CO) y Celularidad (CN).

Las preparaciones corresponden a cortes histológicos longitudinales que fueron interpretados mediante un análisis simple ciego, realizando una valoración semicuantitativa basada en la escala de Movin y la clasificación de Bonar (Maffulli *et al.*, 2008). Las 5 variables se valoran de 0 a 3, siendo 0 el valor que corresponde a una apariencia normal y 3 a una

apariciencia marcadamente anor mal, tal y cómo se ha descrito en el apartado de material y métodos apartado 4.10.3.3.

El valor final asignado a cada uno de los parámetros histológicos arriba mencionados en cada lesión corresponde al sumatorio de los valores parciales de cada una de las 18 preparaciones histológicas valoradas.

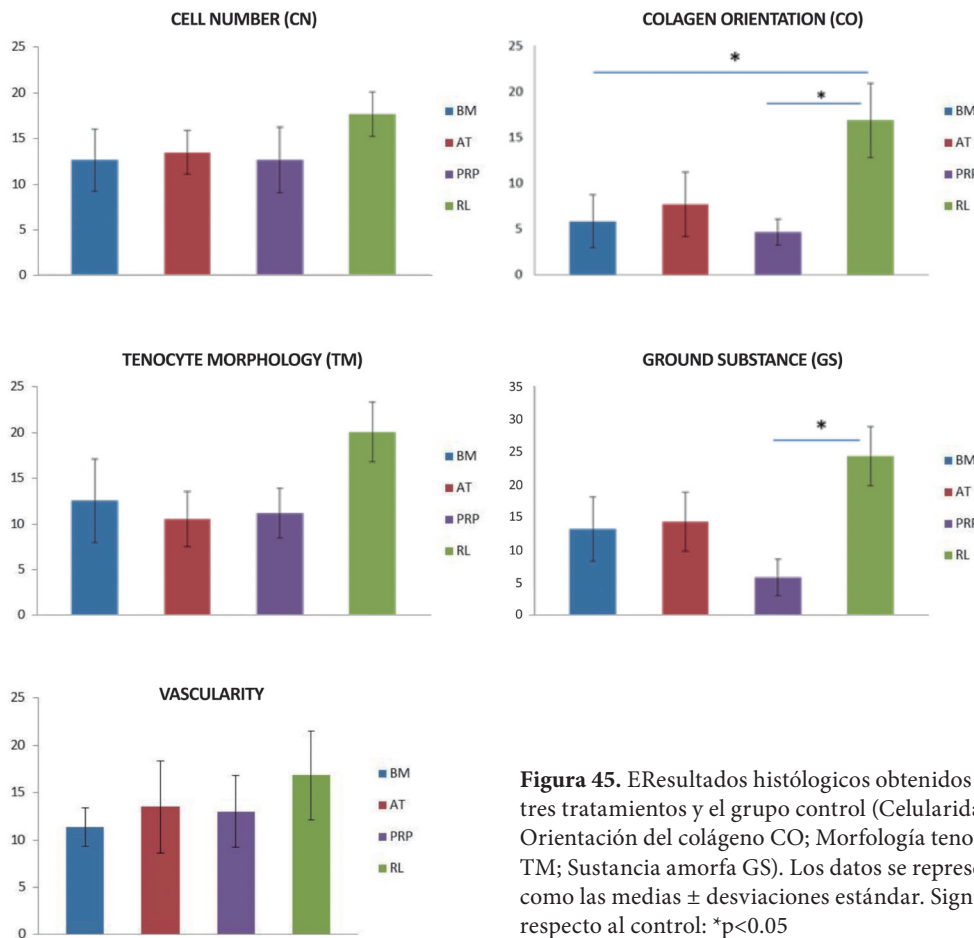
En la Figura 45, se muestran las medias de los valores obtenidos para cada parámetro histológico en cada grupo según su tratamiento. En todos los parámetros histológicos evaluados, los valores más altos, que se corresponden con peores valores de regeneración tisular, se observan en el grupo control.

Además de esta tendencia general, se observaron para el parámetro CO diferencias significativas ($p < 0.05$), entre los grupos tratados con BM-MSCs (BM) y con PRP (PRP) con respecto al grupo control (RL). También se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para el parámetro GS entre el grupo tratado con PRP (PRP) y el grupo control.

Los resultados histológicos obtenidos en la presente Tesis Doctoral corroboran estudios histológicos realizados por otros autores sobre lesiones tendinosas crónicas o pobre regeneración en los que los cambios morfológicos celulares (metaplasia condroide), la aparición de sustancia amorfa y las alteraciones en el colágeno están íntimamente relacionados (Cook *et al.*, 2004). Así mismo, estos resultados están en concordancia con los principales trabajos publicados sobre el tema hasta el momento. A pesar de que hay una gran variabilidad en el diseño de ensayos clínicos, ya que se comparan tratamientos distintos y en diferentes tiempos, todos ellos observan valores de los parámetros histológicos más cercanos a los valores normales en los tendones tratados que en los control (Crovace *et al.*, 2010; Bosch *et al.*, 2011; Godwin *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2013).

Como ya hemos señalado en apartados anteriores, el desarrollo de cambios degenerativos en la estructura del tendón es un hecho precedente y predisponente a la tendinopatía clínica. Esta teoría se confirma por el hecho de que las evaluaciones histológicas de los tendones de los caballos de carreras clínicamente normales mostraron la presencia de numerosas alteraciones estructurales. Estos cambios se limitan generalmente a la porción del tendón cubierta por el paratendon (región metacarpiana media) donde el tendón tiene el diámetro más delgado y la vascularización intratendinosa se cree que es relativamente deficiente. Las lesiones generalmente se desarrollan de forma simétrica y bilateral (Smith y Goodship, 2004).

Desde el 2000 los estudios de Alfredson concluyeron que los términos: tendinitis, cambios por degeneración, tendinopatía crónica y ruptura parcial implican cambios en el tendón que se pueden definir como tendinosis (Alfredson, 2005). Las características principales de la tendinosis son la degeneración celular, con desorientación del colágeno y separación fibrilar y aumento de la sustancia fundamental.



En estas lesiones además de los cambios celulares, la degeneración del colágeno y el aumento de la sustancia fundamental mucoide (proteoglicanos), se aprecia una ausencia de células inflamatorias.

Histológicamente, las fibras de colágeno presentan variaciones en la disposición ondulada (crimp) con una mayor ondulación (en contraposición a la compacta y paralela apariencia normal), además de una disminución del número de fibras (Pearce *et al.*, 2009). También aparecen espacios vasculares con o sin neovascularización y en ocasiones calcificaciones focalizadas.

Estos hallazgos histológicos descritos en la bibliografía coinciden con nuestros resultados que se muestran en la Figura 46. En ella, podemos observar un área donde los haces de colágeno están ordenadamente orientados (Grado 0 según la clasificación de Movin y Bonar) y paralelos entre sí, con tenocitos con morfología normal (grado 0) entre los haces de colágeno (flecha azul).

Sin embargo, en la misma figura se puede observar otra zona donde los haces de colágeno presentan una disposición ligeramente menos ordenada (orientación del colágeno grado 1) y algunas células de morfología condroide (morfología tenocítica grado 1) (flecha roja).

Figura 46. Corte histológico con tinción de H-E (40x) de la zona central lesionada de uno de los caballos incluidos en nuestro ensayo donde se observa una zona sana y otra con mayor celularidad y morfología tenocítica anormal

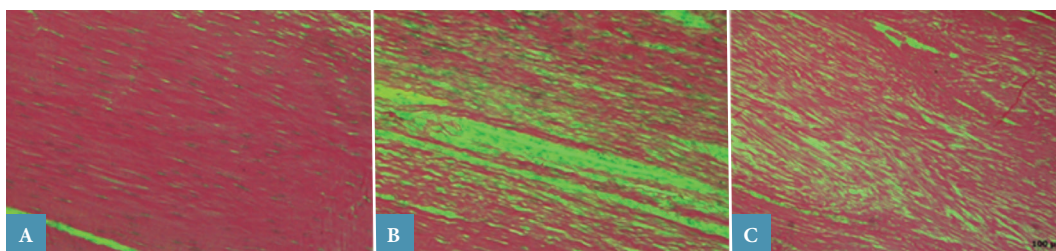
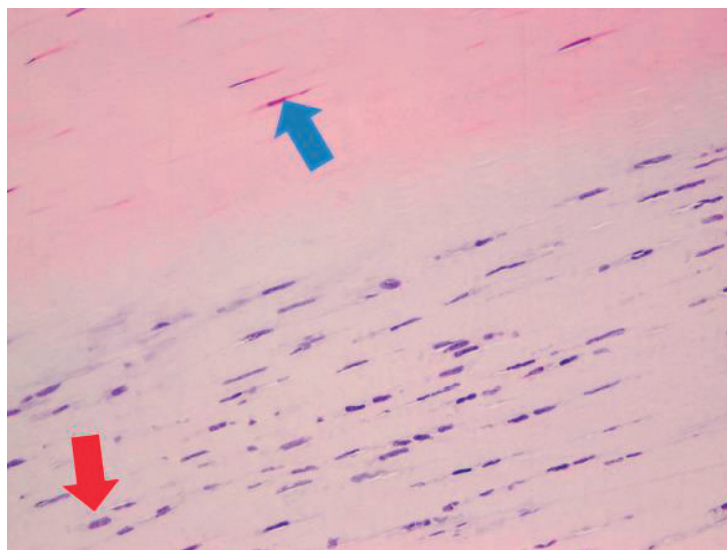
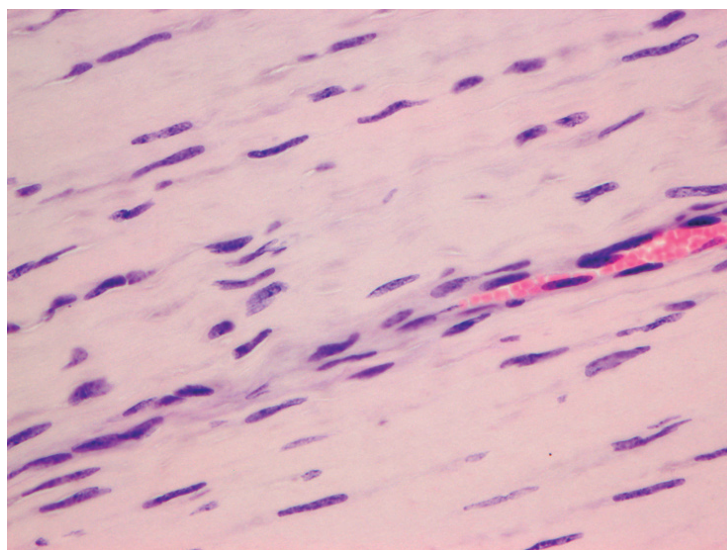


Figura 47. Secciones histológicas con tinción Herovici (50x) en la que los fascículos de colágeno se tiñen de rojo. La imagen A representa un tendón normal, la Imagen B se corresponde con un tendón en fase aguda de rotura con disgregación de fibras y la Imagen C con una cicatriz de un tendón con una marcada desorganización fibrilar

Figura 48. Corte histológico con tinción de H-E (40X) de la zona central lesionada de uno de los caballos incluidos en nuestro ensayo donde se observa una alta celularidad y morfología tenocítica anormal. También se observan vasos y presencia de sustancia amorfa



Las tendinosis se caracterizan por presentar una gran variabilidad en cuanto a la densidad celular se refiere, donde se pueden distinguir varias zonas con celularidad variable, los tenocitos son anormalmente abundantes y heterogéneos, presentando un núcleo redondeado, con un evidente aumento ultraestructural en la producción de proteoglicanos y proteínas, lo que le confiere apariencia condroide (ver Figura 48) (morfología tenocítica grado 2). Pocas veces aparecen infiltrados de linfocitos y macrófagos, los cuales forman parte del proceso de reparación en las fases más agudas de cicatrización.

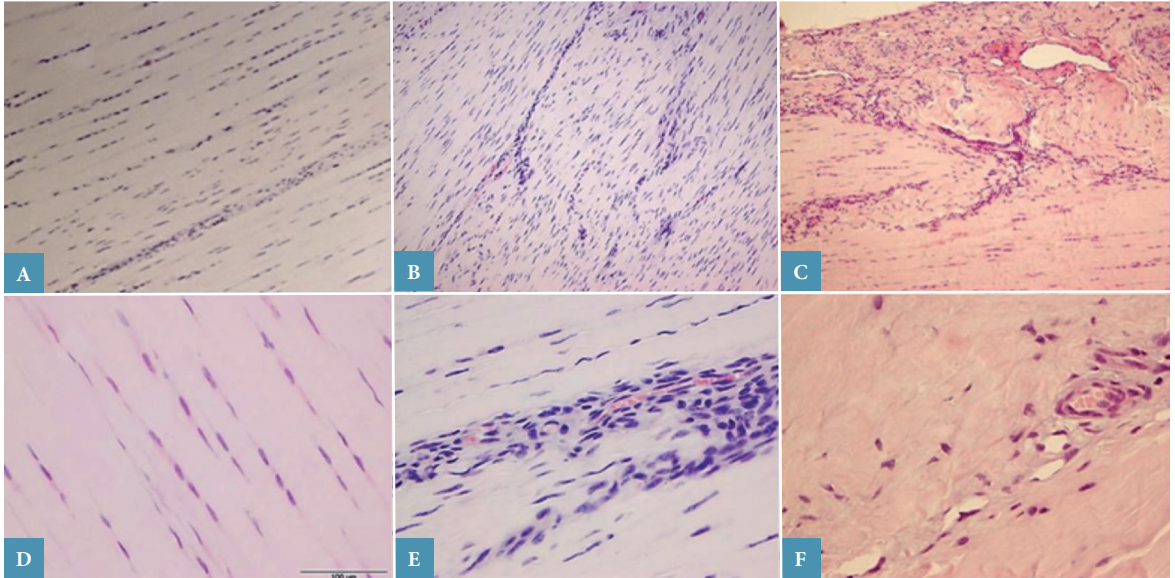


Figura 49. Cortes histológicos con tinción de H-E de la zona central lesionada (MIZ) perteneciente a diferentes caballos incluidos en el estudio

En la Figura 49, se muestran diferentes cortes histológicos que muestran un tendón normal (Imagen A, 10X e imagen D, 40X) donde se pueden observar las fibras de colágeno bien orientadas y paralelas entre sí, tenocitos de morfología normal, avascularidad y celularidad escasa. En la imágenes B (10X) y E (40X) se puede observar un tendón con una cicatriz tendinosa de mediana calidad o en periodo de maduración donde se observa la presencia de haces de fibras de colágeno desorientado, alta celularidad, vascularización moderada y morfología fibroblástica heterogénea). Por último, en las imágenes C (10X) y F (40X) se muestra un tendón con una cicatriz tendinosa de muy mala calidad con fibras de colágeno dispuestas de forma caótica, muy alta celularidad y vascularización y gran cantidad de sustancia amorfa relleno los espacios entre fibras.

Un rasgo característico de las tendinosis es la proliferación de capilares y arteriolas, con hiperplasia endotelial y trombosis microvascular coherentes con un proceso de neoangiogenesis. Algunos autores señalan a la vascularización, como un primer paso en el fracaso de reparación coduciendo a la cronificación de las lesiones tendinosas.

Como ya hemos comentado anteriormente en este apartado, los valores obtenidos en nuestro ensayo para el parámetro vascularidad son más elevados en los tendones control que en los tratados. No existe un consenso general en la interpretación sobre la vascularización de los tendones durante el proceso reparativo ó regenerativo.

Existen evidencias científicas de que el tendón normal (una estructura hipovascularizada) se hipervasculariza durante el proceso degenerativo. En este proceso, el factor de crecimiento VEGF juega un roll importante ya que estimula les células endoteliales induciendo la invasión de microvasos sobre las áreas tendinosas avasculares (Petersen *et al.*, 2004). Así, se ha estudiado la expresión génica de algunas isoformas del VEGF, encontrándose una sobreexpresión de estas moléculas en tendones en desarrollo y tendones adultos degenerados, mientras que en tendones adultos sanos estaba infraexpresada (Pufe *et al.*, 2005b).

Además de estos hallazgos se ha podido demostrar que VEGF induce la expresión de diferentes metaloproteinasas (MMPs) en células endoteliales y tenocitos, e inhibe la expresión de TIMP. Esta alteración del equilibrio entre MMP y TIMP produce efectos degenerativos en la matriz tendinosa predisponiendo a largo plazo a la rotura (Petersen *et al.*, 2004).

Sin embargo parece razonable que durante el periodo reparativo, la hipervascularidad del tejido dañado favorezca la regeneración tisular, permitiendo un más rápido y eficaz efecto regenerativo; No obstante, en las fases más tardías de maduración y consolidación de la lesión este fenómeno debe ir desapareciendo hasta llegar a un patrón vascular similar al del tendón sano (Fortier y Smith, 2008).

Algunos autores (Bosch *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2013), señalan que el aumento observado en la vascularización de los tendones tratados con MSCs entre las 16 - 23 semanas, podría ser un factor determinante a la hora de explicar el efecto a largo plazo de estas células, a pesar de la aplicación de un solo tratamiento.

Nuestra interpretación para este valor es que, aunque la hipervascularización puede ser un hallazgo positivo durante las fases tempranas del proceso regenerativo como señalan algunos autores (Del Bue *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2013). En nuestro trabajo, por tratarse de un estudio realizado a las 45 semanas, tiempo en el que el proceso de cicatrización se encuentra en fase de consolidación, la existencia de una alta vascularidad puede ser indicativo de una peor regeneración, como lo demuestran los datos obtenidos en los tendones control de nuestro ensayo.

En los procesos degenerativos, también se han descrito un aumento de la sustancia fundamental (proteoglicanos) (Movin *et al.*, 1997), así como degeneración hialina, degeneración mucoide o mixoide, degeneración fibrinoide, degeneración lipoide, calcificación y metaplasia fibrocartilaginosa (Józsa y Kannus, 1997). (ver Figura 50).

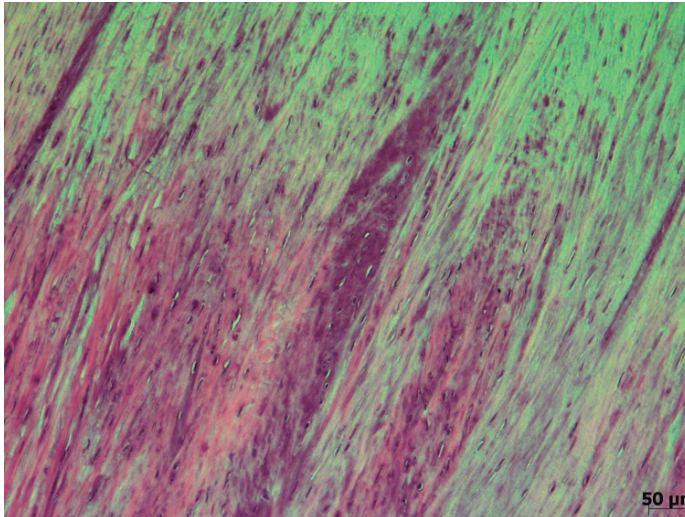


Figura 50. Imagen correspondiente a un corte histológico (10x) de una lesión tendinosa en la que se observan haces de fibras poco compactos y mal organizados (CO grado 2), alta celularidad (CN grado 2) y sustancia amorfa muy abundante, (GS grado 3)

En las condiciones de nuestro ensayo, la valoración histológica se realiza a las 45^a semanas. En nuestro conocimiento, no se ha realizado hasta el momento ningún ensayo a tan largo plazo. Los trabajos publicados realizan las valoraciones histológicas en un rango de tiempo que varía desde las 16 (Carvalho *et al.*, 2013) hasta las 24^a semanas (Smith *et al.*, 2013).

Es posible que en nuestras condiciones, al igual que ocurriría con los parámetros ecográficos, las máximas diferencias entre tratamientos y el grupo control pudieran haberse detectado en el periodo que oscila entre las 10 y las 20 semanas y por lo tanto los resultados histológicos podrían haber sido diferentes en ese momento, a los observados en la semana 45.

El motivo por el cual en nuestro diseño se optó por valorar histológicamente a las 45 semanas y no antes es que existen evidencias científicas de que el tiempo medio de recuperación completa de una lesión tendinosa varía entre los nueve meses y un año (Smith y Davis, 2006; Dakin *et al.*, 2014).

El análisis histológico a este tiempo (45^a semanas), presenta la ventaja de valorar la calidad de la cicatriz tendinosa a largo plazo, pero debido a la evolución en el tiempo observada a partir de nuestros resultados ecográficos, hubiese sido esperable que las diferencias histológicas entre tendones tratados y el control fueran más evidentes a más corto plazo (10-20 semanas).

Una posible explicación de esta hipótesis sería, que los diferentes tratamientos estuvieran ejerciendo los efectos inmunomoduladores y regenerativos durante un periodo de tiempo tras la instauración del tratamiento, y a partir de ese momento, la lesión evolucionaría de forma similar tanto en las tendones tratados como en los control, por lo que, cuanto más nos alejamos de ese periodo, las diferencias histológicas entre tendones tratados y no tratados podrían ser menores.

Hasta el momento no existen demasiados trabajos que hayan dilucidado cuál es el tiempo de supervivencia de las MSCs dentro la zona implantada. Guest y colaboradores señalan, que el tiempo de supervivencia de las MSCs puede estar condicionando el efecto de las mismas sobre los tejidos tratados sugiriendo que podría ser beneficiosa la aplicación de dosis repetidas (Guest *et al.*, 2010).

A pesar de dicha limitación, el efecto inmunomodulador de las MSCs a través de diferentes vías (incrementando la concentración de citoquinas, suprimiendo la producción de citokinas, modulando la acción de los linfocitos T y células NK), estaría influyendo de forma decisiva en la posterior evolución en las etapas de remodelación y consolidación del tejido fibroso (Dakin *et al.*, 2014).

Por otra parte, otro factor a tener en cuenta, es que en las lesiones inducidas, las características inflamatorias que se producen difieren en gran medida de las lesiones naturales ya que, aunque en estas últimas también se producen fenómenos inflamatorios, siempre van precedidas de procesos degenerativos graves lo que podría influir en que las MSCs tuvieran un comportamiento diferente.

Smith y colaboradores (Smith *et al.*, 2013), en uno de sus últimos trabajos publicados sobre tratamiento con BM-MSCs en tendinitis naturales, obtiene unos resultados histológicos a las 24 semanas más satisfactorios que los publicados por otros autores, (Caniglia *et al.*, 2012). Smith en este mismo artículo, sugiere que los buenos resultados obtenidos pueden deberse a que el tratamiento se realiza sobre lesiones naturales y al posible efecto de sinérgico de los múltiples factores de crecimiento del sobrenadante y las MSCs (Smith *et al.*, 2013).

5.7.2.2. Resultados preliminares de microscopia electrónica

Las tendinopatías se caracterizan histológicamente por un aumento de la celularidad, desorganización fibrillar del colágeno, apoptosis tenocítica, degeneración mucoide, hialina y lipoi-de y neoproliferación de vasos sanguíneos, todo ello en ausencia de células inflamatorias al menos en las etapas avanzadas de esta patología (Maffulli *et al.*, 2000).

En el estudio preliminar de microscopia electrónica realizado, hemos podido comprobar la morfología tenocítica caracterizada por largas extensiones citoplasmáticas que interrelacionan a través de uniones GAP con otras células tendinosas y con los fascículos de fibras de colágeno, (ver Figura 51, Imágenes A, B y C). Estas uniones permiten la comunicación intercelular ofreciendo así una respuesta efectiva y coordinada frente a los estímulos mecanobiológicos de carga a que son sometidos los tendones durante el trabajo (McNeilly *et al.*, 1996).

En las zonas lesionadas, la morfología tenocítica va modificándose de forma que, estas células presentan una morfología diferente con una actividad de síntesis incrementada observándose en ellas un enorme desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y del aparato

de Golgi y gran cantidad de lisosomas, vacuolización lipídica y núcleos con cromatina descondensada, (ver Figura 52, Imágenes A, y B).

Algunos de estos fibroblastos encontrados en el estudio, presentan curiosamente elementos “contráctiles”, al igual que los miofibroblastos a pesar de no tener origen tendinoso, (ver Figura 52 Imagen C). Estas estructuras también las describen algunos autores (Sarkar y Uhthoff, 1980; Józsa y Kannus, 1997).

También hemos podido observar en algunas zonas con una profunda desorganización de las fibras de colágeno, la presencia más abundante de fibroblastos que presentan morfología compatible con apoptosis, (citoplasmas menos desarrollados, núcleos descentrados con cromatina condensada y gran vacuolización) (ver Figura 51, Imágenes D y F).

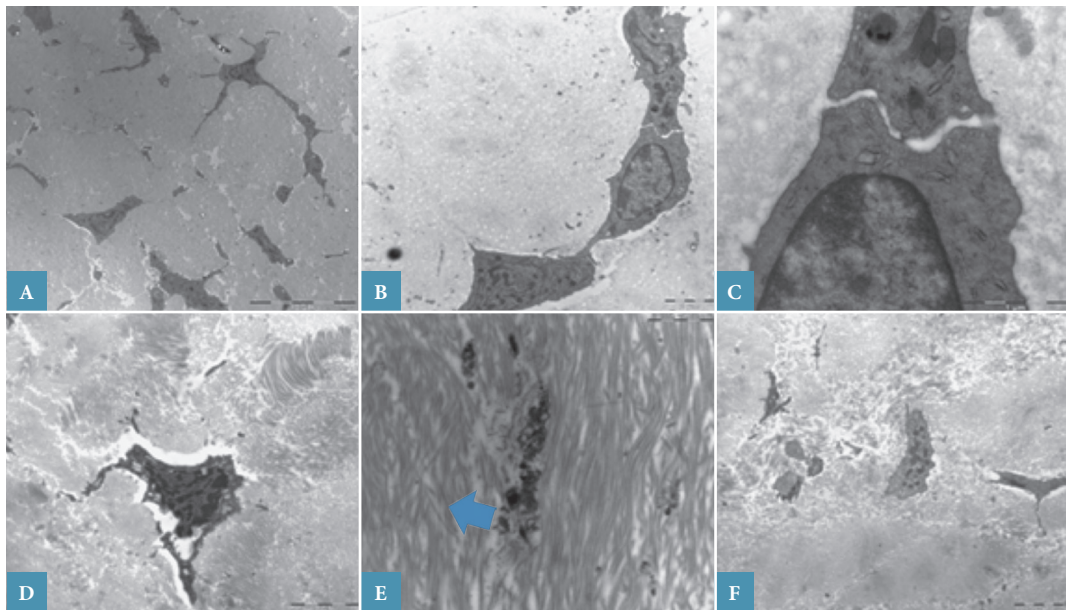


Figura 51. Imágenes tomadas por M.E., correspondientes a tenocitos de una sección sana de un tendón del estudio. En ellas se pueden observar las largas prolongaciones citoplasmáticas y las uniones GAP, (imágenes A, B y C). También podemos observar, tenocitos pre-apoptóticos con cromatina condensada, dentro de una matriz de fibrillas de colágeno muy desorganizadas con restos degradativos entre ellas (flecha azul) (imágenes D, E y F)

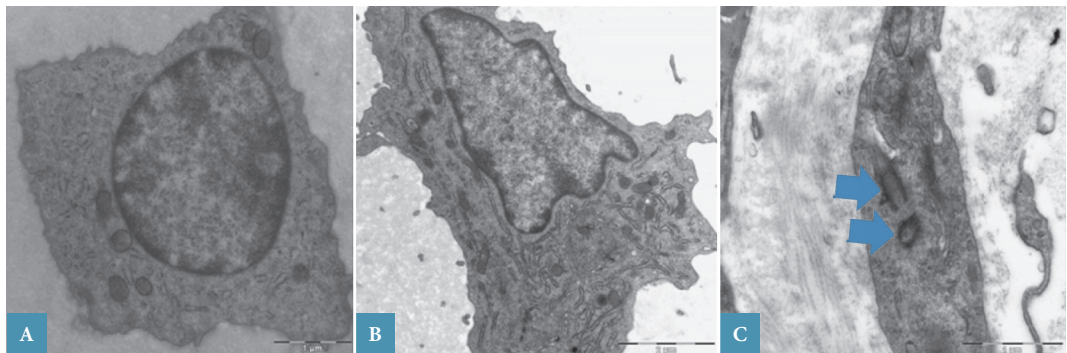


Figura 52. Imágenes tomadas por M.E. correspondientes a tenocitos activos, en un tendón en fase remodelativa en los que se observan núcleos con cromatina descondensada y gran desarrollo de orgánulos citoplasmáticos, (Imágenes A y B); Tenocito que presenta elementos “contráctiles” señalados con flechas azules (Imagen C)

En estas zonas peor regeneradas también se podía observar, (ver Figura 51, Imágenes D, E y F); gran cantidad de fibrillas de colágeno muy finas, así como acúmulos de sustancias protéicas degradativas.

Todos estos hallazgos coinciden con los descritos por otros autores en los escasos estudios publicados de microscopía electrónica realizados en tendinopatias (Kraushaar y Nirschl, 1999; Cook *et al.*, 2004).

El estudio de las características y la distribución de las fibrillas de colágeno mediante microscopía electrónica puede ser una herramienta adicional muy útil para caracterizar la calidad del tejido regenerado. La matriz del tendón normal se compone principalmente de colágeno, que se organiza a modo de fibrillas con una distribución de tamaño bimodal: fibrillas gruesas (>200 nm) que contribuye a la fuerza tensil del tendón y fibrillas finas (<100 nm) que contribuyen principalmente a su elasticidad. En el tendón reparado, las formas fibróticas del tejido cicatricial se caracterizan por una ausencia de fibrillas gruesas.

En muchas ocasiones, tras una lesión, la población de fibrillas predominante es de tipo fino lo que resulta en un tendón más débil y propenso a nuevas recidivas (Parry y Craig, 1977; Watanabe *et al.*, 2007). Caniglia y colaboradores en 2012, (Caniglia *et al.*, 2012), realizaron un estudio comparativo sobre lesiones tendinosas quirúrgicamente inducidas utilizando como tratatamiento BM-MSCs. Para caracterizar la calidad del tejido regenerado se estudio las características y la distribución de las fibrillas de colágeno mediante microscopía electrónica, no encontrando diferencias significativas entre los tendones tratados y los control.

5.7.2.3. Resultados de expresión génica

Las investigaciones llevadas a cabo en lesiones tendinosas equinas demuestran que los cambios que se producen en la matriz extracelular tras un ejercicio de gran intensidad y prolongado en el tiempo, son similares a los descritos por diferentes autores en tendinopatías (Patterson-Kane *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999). Los principales cambios observados en dichas tendinopatías se resumen en la Tabla 4 obtenida de (Riley, 2008).

MATRIZ EXTRACELULAR	CITOQUINAS Y OTRAS SEÑALES BIOLÓGICAS	ENZIMAS
Colágeno tipo I ↑ Colágeno tipo III ↑ Fibronectina ↑ Tenascina C ↑ Aggrecano ↑ Byglicano ↑ Versicano ↔ Decorin ↔ Dermatan sulfato ↓ Pentosidina ↓	TGF-B ↑ IGF-1 ↑ PDGFR ↑ VEGF ↑ PGE ₂ ↔ COX-2 ↑ Glutamato ↑ Sustancia P ↑ NNMDAR ↑ TGF-BR1 ↓	MP1 ↑ MP2 ↑ MP23 ↑ ADAM12 ↑ ADAMTS2 ↑ ADAMTS3 ↑ MMP3 ↓ MMP10 ↓ MMP12 ↓ MMP27 ↓ ADAMTS5 ↓

Tabla 4. Principales cambios estructurales y moleculares observados en tendinitis crónica; adaptado de Riley G (2008)

Para comprobar los efectos de los distintos tratamientos aplicados en el presente trabajo se ha analizado la expresión de diferentes genes relacionados con los mecanismos de remodelación del tendón y con la expresión fenotípica de los tenocitos: *COL1A1* (collagen, type I, alpha 1), *COL3A1* (collagen, type III, alpha 1), *COMP* (cartilage oligomeric matrix protein), *ACAN* (agrecan), *SCX* (scleraxis), *DCN* (decorin), *TNC* (tenascin C), *MMP3* (matrix metalloproteinase 3) y *TNMD* (tenomodulin).

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada uno de dichos genes (ver Figura 53 y 54). La expresión de los genes se ha analizado en la zona 3 MIZ, (ver Figura 23) y se han expresado como la media de los valores absolutos normalizados obtenidos para cada uno de los grupos dominados (BM, AT, PRP y RL). El valor de referencia, considerado como tendón sano (T-SANO) corresponde a los valores de expresión obtenidos de la Zona 1, (ver Figura 23).

Respecto a los genes anabólicos relacionados con la producción de proteínas de la matriz extracelular, *COL1A1*, *COL3A1*, *ACAN* y *DCN* se ha observado una gran variabilidad individual. A pesar de la variabilidad individual detectada, se ha observado una sobreexpresión en estos genes. Para el gen *COL1A1* los mayores valores encontrados han correspondido a los grupos tratados BM y PRP, siendo significativas ($p < 0.05$), las diferencias frente a los valores del tendón sano (T-SANO) en el caso del en los grupos tratados BM y PRP y también en el control RL, (ver Figura 53). En el caso del gen *COL3A1* se observó una sobreexpresión en todos los grupos frente al T-SANO correspondiendo los mayores valores al grupo no tratado RL, pero debido a la alta variabilidad individual no se encontraron diferencias significativas en este grupo con respecto a T-SANO. Por otra parte sí se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el grupo tratado PRP con respecto a T-SANO para este gen (ver Figura 53). La reducción en el contenido total de colágeno con una disminución de enlaces cruzados de pentosidina y el aumento en el porcentaje de colágeno de tipo III en la tendinopatías, se debe básicamente a un aumento de las proteasas del colágeno como consecuencia del balance catabólico que ocurre durante este proceso (Riley *et al.*, 1994; Riley *et al.*, 2002; Corps *et al.*, 2006; de Mos *et al.*, 2007)

El tejido cicatricial fibroso que se forma tras una lesión tendinosa, está compuesto por un alto contenido *COL3A1*, carece de haces de fibras correctamente formadas, y tiene un patrón fibrillar no lineal desorganizado que, se ha observado, puede persistir potencialmente hasta más de 14 meses después de la lesión (Goodship *et al.*, 1994; Dowling *et al.*, 2000).

Las pobres propiedades biomecánicas de este tejido cicatricial y el lento proceso de curación se cree que pueden ser las causantes de las altas tasas de recidiva de la lesión (Molloy *et al.*, 2003a; Anitua *et al.*, 2005a).

(Riley *et al.*, 1994), observó que el colágeno tipo III también se incrementó en algunas muestras de tendones sanos, como resultado de los microtraumas repetidos que se producen du-

rante la actividad deportiva. Este aumento en la relación de colágeno tipo III podría producirse como una respuesta fisiológica de reparación frente a las microroturas del tendón y podría predisponer a una mayor incidencia de tendinitis durante el ejercicio (Riley *et al.*, 2002).

El contenido de colágeno total disminuye en las tendinopatías en todas las fases de la curación reflejándose una pérdida neta de esta proteína. Pese a ello, siempre se ha observado una sobreexpresión de los dos tipos de colágeno COL1A1 y COL3A1, tanto en lesiones naturales, (Ireland *et al.*, 2001) como inducidas, en diferentes modelos animales (Oshiro *et al.*, 2003; Oshiro *et al.*, 2003; Watts *et al.*, 2012).

No obstante algunos autores, (Watts *et al.*, 2012) señalan que tanto COL1A1 y COL3A1 en lesiones tendinosas inducidas en caballos se sobreexpresan hasta la semana 8 y después su expresión va disminuyendo hasta alcanzar valores normales.

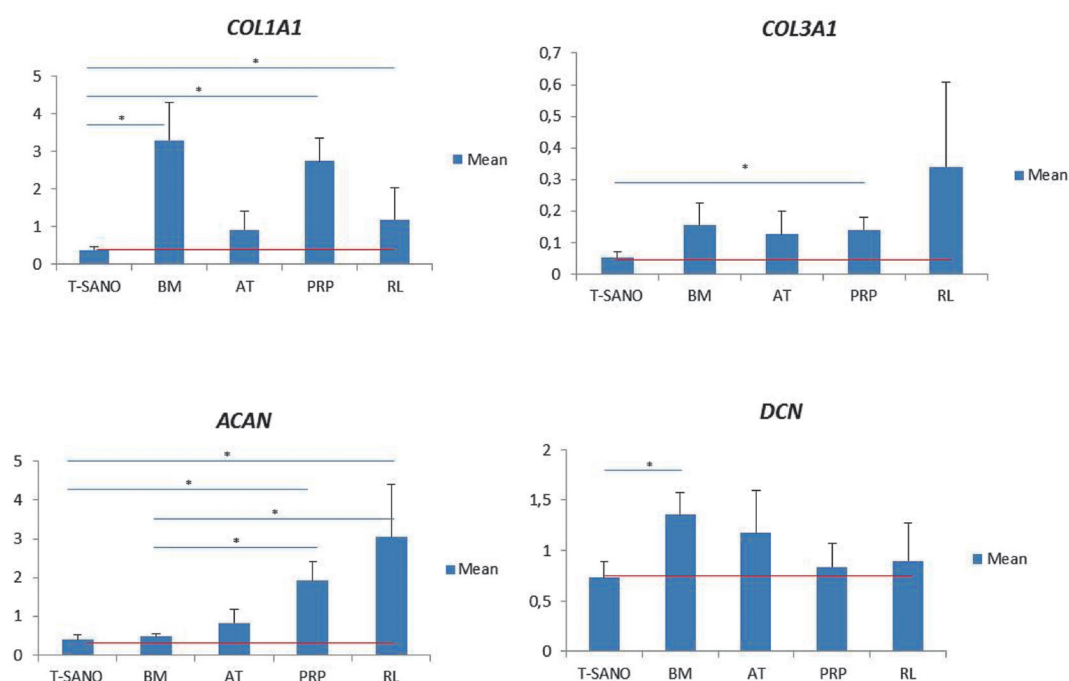


Figura 53. Expresión génica de colágeno I (*COL1A1*), colágeno III (*COL3A1*), aggrecan (*ACAN*) y decorin (*DCN*). Los datos se representan como las medias \pm desviaciones estándar. Significación respecto al control: * $p < 0.05$

Los resultados obtenidos en el presente trabajo para los genes *COL1A1* y *COL3A1*, están en consonancia con los resultados obtenidos por diferentes autores, ya que todos ellos coinciden en la sobreexpresión de estos genes en los tendones lesionados crónicos tanto en caballos como en otras especies en lesiones inducidas (Abrahamsson, 1991; Ireland *et al.*, 2001; Oshiro *et al.*, 2003; Corps *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2013).

Por otra parte, cabe destacar que los valores medios de expresión del *COL3A1*, aunque están sobreexpresados en todos los grupos, se observa un mayor valor en el grupo control RL

a pesar de no ser estadísticamente significativa, debido a la gran variabilidad en la expresión entre individuos, (ver Figura 52). Estos mismos resultados se observan en diferentes estudios realizados (Nixon *et al.*, 2008a; Carvalho *et al.*, 2011) donde se observa una disminución de *COL3A1* a pesar de no encontrar diferencias significativas entre *COL1A1* y *COL3A1* entre los tendones tratados y los control.

Además de los resultados comentados para la expresión génica del gen *COL1A1* hemos encontrado, que los mayores valores de expresión, corresponden a los grupos tratados BM y PRP por lo que una mayor proporción del colágeno tipo I frente al tipo III en estos dos grupos de tendones tratados estaría relacionado con una mejor calidad del tejido reparado (Watts *et al.*, 2011b). No obstante, a pesar de que estos datos coinciden con los resultados histológicos encontrados, hay que tomarlos con precaución ya que en algunos trabajos publicados encuentran incrementos de expresión de los genes *COL1A1* y *COL3A1* y sin embargo no encuentran esta correlación de proteína detectada por análisis inmunohistoquímico (Carvalho *et al.*, 2013).

En relación a la expresión de los genes *ACAN* y *DCN* se ha observado una sobreexpresión del gen *ACAN* en los cuatro grupos (tratados y control) respecto al T-SANO, (ver Figura 53).

Para el caso del gen *DCN* se observa una sobreexpresión en todos los grupos siendo únicamente significativas ($p < 0.05$), las diferencias del grupo tratado BM con respecto al T-SANO, (ver Figura 53).

La matriz extracelular del tendón tiene marcadas diferencias en su composición. Así en las zonas del tendón más expuestas a la tensión (parte media del TFDS), predomina el colágeno tipo I y el proteoglicano pequeño decorin (SLRPs) y el versican dentro de la familia de las grandes proteoglicanos. Sin embargo en las zonas tendinosas sometidas a fenómenos compresivos o cerca de la inserción osteo o miotendinosas la matriz extracelular se aproxima más en su composición al cartílago por lo que la expresión del colágeno tipo II y las proteoglicanos aggrecan y biglycan se tornan más abundantes (Perez-Castro y Vogel, 1999; Thomopoulos *et al.*, 2003).

El proteoglicano decorin, constituye el 80% del contenido de proteoglicanos totales del tendón sano mientras que el 20% restante de la familia de los pequeños proteoglicanos (SLRPs) la forman el biglycan, fibromodulina y el lumican y keratocan (Samiric *et al.*, 2004; Halper, 2014). Las proteínas básicas de los SLRPs tienen forma de herradura y se caracterizan por repeticiones ricas en leucina uniéndose a las fibrillas de colágeno regulando así la fibrillogénesis (Rada *et al.*, 1993).

Así, las fibrillas de colágeno en los tendones de ratones “knockout” para SLRPs (decorin, biglycan, fibromodulin y lumican) tienen menor diámetro y morfología anormal, lo que resulta en unos tendones más débiles con disminución su capacidad tensil, lo que demuestra la

importancia de éstos SLRPs en la estructura del tendón (Svensson *et al.*, 1999; Chakravarti, 2002; Jepsen *et al.*, 2002).

Por otra parte existen algunos estudios, que mantienen la teoría de que aparte de los SLRPs la glicoproteína COMP juega también un rol importante en la fibrillogénesis (Dunkman *et al.*, 2014).

La expresión tanto de la glicoproteína COMP (*COMP*) como del decorin (*DCN*) parece disminuir en los tendones lesionados y aumenta de manera gradual conforme la orientación y el alineamiento de las fibras de colágeno se va instaurando durante la reparación tendinosa (Parkinson *et al.*, 2010).

Con respecto al decorin (*DCN*), nuestros resultados muestran que, además de encontrar diferencias significativas con respecto al grupo T-SANO en el caso del grupo tratado BM, podemos observar que los mayores valores de expresión los encontramos en los grupos BM y AT (ver Figura 53). Teniendo en cuenta que el decorín está estrechamente relacionado con la organización fibrilar del colágeno podemos suponer que estos dos grupos tratados podrían presentar una mejor calidad del tejido reparado. Estos resultados están en consonancia con los resultados histológicos obtenidos en nuestro trabajo, donde para el parámetro CO (collagen orientation), los mejores resultados observados corresponden a los grupos tratados BM y AT. En contradicción con dichos resultados, diversos autores no encuentran diferencias significativas entre tendones lesionados y normales para la expresión génica del *DCN* y la fibromodulina (*FMOD*) (Alfredson *et al.*, 2003; Samiric *et al.*, 2009; Jelinsky *et al.*, 2011).

Los resultados de expresión de aggrecan (*ACAN*) observados en nuestro ensayo muestran también una tendencia que coincide con los resultados histológicos obtenidos. Como hemos comentado anteriormente la proporción de algunos proteoglicanos, sobre todo los grandes proteoglicanos, en la matriz extracelular del tendón depende de los estímulos a los que está sometido éste. Así la expresión del aggrecan (*ACAN*) y el biglycan (*BGN*) es mayor en las zonas sometidas a fenómenos compresivos que en las zonas netamente tensiles. Varios estudios confirman que estos cambios en la composición se producen como consecuencia de la respuesta de adaptación del tendón sometido a diferentes cargas mecánicas (Thomopoulos *et al.*, 2003).

Algunos estudios, (Corps *et al.*, 2006) han demostrado que la expresión de ambos de genes esta también sobreexpresada en la tendinopatía crónica dolorosa. Esto sugiere que puede haber un incremento de compresión o tensión de cizallamiento dentro del sitio de la lesión, y que las células están respondiendo a este entorno mecánico alterado, aunque podrían producirse también otras señales adicionales que alterasen la interacción de las células con la propia matriz extracelular.

Aunque en las tendinopatías crónicas, el aumento de la expresión de aggrecan (*ACAN*) y biglycan (*BCN*) puede ser análoga a la del tendón fibrocartilaginoso sano, la expresión

génica de la zona lesionada no presenta un patrón de fibrocartilago normal, ya que en las zonas lesionadas predomina de manera clara la expresión del colágeno tipo I (*COL1A1*) y no el (*COL2A1*) como cabría esperar en un tendón fibrocartilaginoso a parte de otros proteoglicanos específicos del fibrocartilago (Corps *et al.*, 2004).

Clegg y colaboradores, (Clegg *et al.*, 2007) señalan en un estudio realizado en caballos que en las tendinopatías crónicas del TFDS, se observan fenómenos de diferenciación fibrocron-drogénicas similares a las señaladas en las tendinopatías del tendón de Aquiles en la especie humana.

En nuestro trabajo los mayores valores de expresión del gen *ACAN* los encontramos para el grupo RL, siendo significativamente diferentes ($p < 0.05$), con respecto al T-SANO para este grupo y para el grupo tratado PRP, (ver Figura 53). Además, también se observan diferencias significativas ($p < 0.05$), entre grupos tratados ya que el grupo BM presenta diferencias significativas ($p < 0.05$), con respecto al grupo tratado PRP y con el grupo no tratado RL (ver Figura 53). Estos resultados muestran una tendencia similar a la observada en los parámetros histológicos mostrados en el apartado anterior, ya que el grupo de tendones control (RL), muestra peores valores histológicos regenerativos que los grupos tratados, compatibles. Así, los valores de expresión de *ACAN* significativamente altos del grupo no tratado RL podría correlacionarse con una degeneración metaplásica condroide en la que se pueden observar: alta celularidad con células muy activas con fenotipo condroide que producen gran cantidad de glicosaminoglicanos (GAG) y desorganización fibrilar. En contraposición, es de resaltar que la expresión génica de *ACAN* medida en el grupo BM, es muy cercana al grupo T-SANO.

Las concentraciones de la glicoproteína no colágena COMP en el tendón flexor digital superficial del caballo son altas y se correlacionan positivamente con una orientación fisiológica del colágeno tipo I y, por lo tanto, con la resistencia a la tracción y la rigidez, lo que sugiere que las concentraciones de COMP pueden estar vinculados a la organización de la matriz extracelular del tendón (Smith *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2002a).

La expresión de *COMP* observada en los tendones tratados con diferentes productos biológicos anabólicos BM-MSCs y células mononucleares de médula ósea (BMMNC), (Crovace *et al.*, 2010) PRP y concentrados liofilizados plaquetarios, (McCarrel y Fortier, 2009) células mononucleares derivadas de tejido graso, (ADMNC) (Nixon *et al.*, 2008a), células mesenquimales derivadas de sangre periférica PB-MSCs y PRP, (Martinello *et al.*, 2013) estaba aumentada con respecto a los controles en coherencia con los mejores resultados histológicos en la arquitectura de tendón que presentaban. Esto, sería indicativo de una mejor regeneración del tendón, o al menos, de una disminución de la degeneración de las fibras del tendón como resultado del tratamiento.

La expresión génica de *COMP* detectada en nuestro trabajo no coincide con los resultados descritos anteriormente, encontrando valores de expresión menores a los de T-SANO

para los grupos tratados BM y AT, ligeramente superiores para el grupo PRP. Además se han observado los valores más altos en el grupo no tratado RL, aunque las diferencias no fueron significativas con respecto al T-SANO, (ver Figura 54). Estos resultados difieren de los resultados histológicos encontrados ya que si la expresión de *COMP*, está relacionada con una mejor organización de las fibras de colágeno, los valores más altos deberían haber correspondido a los grupos tratados en concordancia con los resultados histológicos.

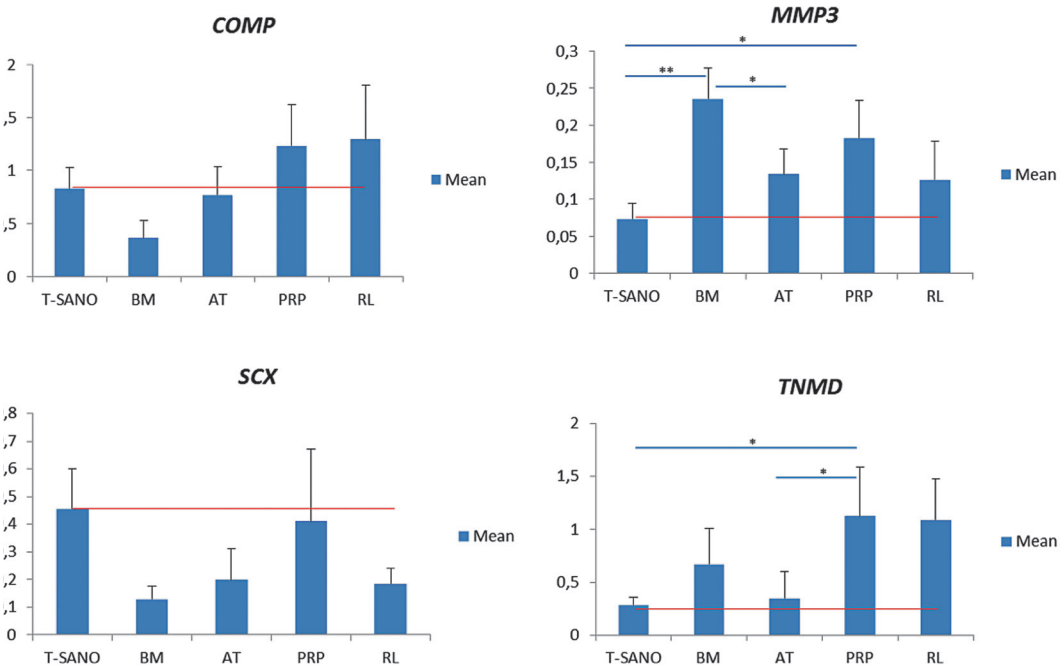


Figura 54. Expresión génica de proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa (*COMP*), metaloproteinasa III (*MMP3*), scleraxis (*SCX*) y tenomodulina (*TNMD*). Los datos se representan como las medias ± desviaciones estándar. Significación respecto al control: * $p<0.05$

No obstante, diversos trabajos obtienen resultados parecidos a los de la presente tesis doctoral para la expresión génica de *COMP*. Así, (Schnabel *et al.*, 2009), encuentra en un ensayo clínico realizado, valores de expresión de *COMP* mayores en el grupo T-CONTROL que en los tratados con AT-MSCs., y (Carvalho *et al.*, 2013), no observa diferencias significativas entre los tendones tratados con MSCs y concentrados plaquetarios y los control para dicho gen.

La Tenascina-C es una glicoproteína grande ECM hexamérica que se expresa en diferentes tejidos específicamente cuando hay daño tisular y se sobreexpresa dentro de las 24 horas posteriores a la aparición de la lesión. A partir de ese momento, la expresión de TNC disminuye y la proteína va disminuyendo conforme los tejidos se van reparando. La expresión persistente de tenascina-C (*TNC*) se asocia con enfermedades fibróticas tales como fibrosis pulmonar, esclerodermia, cirrosis hepática y con heridas crónicas que no cicatrizan (Chiquet-Ehrismann y Tucker, 2004).

Tras la lesión, los fibroblastos deben desprenderse de las matrices ricas en colágeno de tejido sano y van invadiendo la matriz provisional de fibrina-fibronectina. Así, diversos trabajos muestran que esta proteína juega un papel fundamental en el reclutamiento y quimiotaxis de los fibroblastos hacia las zonas de reparación, por lo que la expresión transitoria de TNC en el tejido dañado es clave para su reparación. También se ha demostrado que algunos fragmentos específicos de tenascina-C inhiben la migración de fibroblastos (Jarvinen *et al.*, 2000; Trebaul *et al.*, 2007).

Los posibles mecanismos de acción de tenascina-C y sus fragmentos pueden incluir modulación de la adhesión celular, organización del citoesqueleto y la contractilidad celular, así como la regulación de la activación de diversas proteasas que degradan la matriz extracelular (Martin *et al.*, 2003).

Como ya hemos comentado en diferentes ocasiones las regiones del tendón sujeto a cargas compresivas difieren en su estructura de las regiones sometidas a cargas principalmente de tracción (Jarvinen *et al.*, 2000).

Así, las primeras poseen una estructura fibrocartilaginosa con células esféricas rodeadas por una matriz que contiene como principal proteoglicano el aggrecan además del colágeno I y II, en contraste con las regiones tensiles con una estructura fibrosa con fibroblastos fusiformes rodeados de una matriz de tipo denso, orientada longitudinalmente por fibras de colágeno tipo I. La forma esférica de las células en las regiones fibrocartilaginosas indica que están más débilmente unidas a la matriz que las células fusiformes en las regiones fibrosas, una característica que puede ayudar a minimizar la deformación celular durante la compresión del tendón. Se ha comprobado que la tenascina juega un papel importante en la adaptación del tendón para mantener o establecer estas regiones fibrocartilaginosas (Martin *et al.*, 2003), apoyando la hipótesis de que la sobreexpresión de tenascina-C (TNC) es una adaptación celular a la compresión que ayuda a establecer y mantener regiones fibrocartilaginosas en los tendones proporcionando mayor elasticidad al tejido tendinoso (Jarvinen *et al.*, 2000).

Nuestros resultados de expresión para TNC muestran un aumento de expresión de los grupos tratados BM, AT y PRP cuando se compara con el T-SANO, mientras que se observa que el grupo no tratado RL muestra valores más bajos. Además, estas diferencias entre el grupo T-SANO y los grupos tratados son estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para el grupo BM y PRP, (ver Figura 55). Estos resulta-

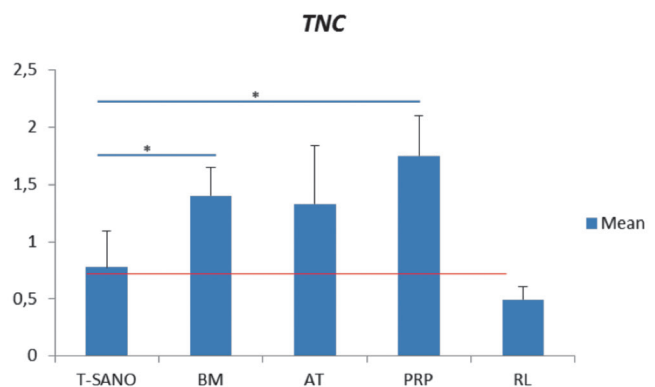


Figura 55. Expresión génica de tenascina C (TNC). Los datos se representan como las medias \pm desviaciones estándar. Significación respecto al control: * $p < 0.05$

dos coinciden con los obtenidos en algunos ensayos preclínicos publicados (Watts *et al.*, 2011a; Carvalho *et al.*, 2013), en los que se encontró una sobreexpresión de *TNC* en tendones tratados frente al tejido sano.

Por otra parte, las colagenasas son miembros de la superfamilia de las metaloproteinasas de matriz (MMP), que son algunas de las pocas enzimas capaces de escindir el colágeno tipo I intacto en el medio extracelular (Matrisian, 1992; Nagase y Woessner, 1999; Cawston y Wilson, 2006).

Un tipo de metaloproteinasas son las estromelisininas cuya acción es principalmente la degradación de proteoglicanos de la matriz extracelular del tendón. La MMP principal de este grupo es la estromelisina 1 ó MMP3 (Riley *et al.*, 2002).

Se ha podido comprobar en diferentes trabajos sobre tendinopatias humanas que existía un aumento de la expresión génica de *MMP-1*, y una reducción de expresión de *MMP-2* y *MMP-3*, asociado a un aumento de la desnaturalización del colágeno y el remplazo en la matriz extracelular (Riley *et al.*, 2002). Este mismo autor encuentra que las mayores diferencias de expresión génica entre tendones sanos y afectados se observan a nivel de *MMP3* con una infraexpresión en todos los tendones degenerados.

Así, *MMP-3* es una enzima reguladora clave en el control de recambio de la matriz, de forma que una disminución de esta enzima puede representar un fallo en el proceso de remodelación normal. Por lo tanto, las tendinopatias son procesos activos mediados celularmente que podrían resultar del fallo de regulación específica de la actividad de las diferentes MMPs, como respuesta a microtraumas repetitivos producidos en el tendón durante el ejercicio (Riley *et al.*, 2002). La pérdida de actividad de *MMP-3* en las tendinopatías podría explicar el aumento de proteoglicanos que se encuentra comúnmente en las lesiones del tendón.

En un estudio realizado en tendones de caballos (Jacobsen *et al.*, 2015), se ha establecido una asociación negativa entre la expresión génica de *MMP3* y los cambios celulares observados (incremento de la celularidad, pérdida fenotípica fusiforme y aumento de contenido de proteoglicanos cuando la expresión de *MMP3* decrece), confirmando el importante papel que podría desempeñar esta enzima en la migración y morfología celular del tendón.

En nuestro ensayo, hemos observado que la expresión de *MMP3* está aumentada en todos los grupos tratados y el grupo control, siendo significativamente más alta ($p < 0.05$) en los grupos tratados BM y PRP. También se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos tratados BM y AT, (ver Figura 54). Estos datos coinciden con los publicados por diferentes autores, tanto en la especie equina (Clegg *et al.*, 2007; Watts *et al.*, 2012), como en la especie humana (Corps *et al.*, 2012; Lundin *et al.*, 2014) en los que observan una tendencia a encontrar valores de expresión de *MMP3* y de proteína menores cuanto mayor es la degeneración.

Por otra parte, se observa de nuevo una estrecha relación entre los hallazgos histológicos y de expresión génica detectados de forma que, los valores de mejor regeneración histológica corresponden con los valores más altos de expresión de *MMP3* (Jacobsen *et al.*, 2015). Si analizamos los datos histológicos de nuestro estudio, podemos observar que para los parámetros celularidad (CN), sustancia amorfa (GS), orientación del colágeno (CO) y vascularidad (V), los mejores resultados coinciden con los mayores valores de expresión de *MMP3*, es decir, los grupos tratados BM y PRP, correspondiendo los menores valores de expresión de *MMP3* con los peores valores histológicos para el grupo control RL.

Por último los dos genes analizados relacionados con la diferenciación tenocítica son la tenomodulina *TNMD* y scleraxis *SCX*. *TNMD* es una glicoproteína identificada como un buen biomarcador de tenocitos maduros que está relacionada con la regulación de la proliferación tenocítica (Jelinsky *et al.*, 2010) y la maduración de las fibras de colágeno (Docheva *et al.*, 2005). Posee propiedades anti-angiogénicas y se expresa de forma muy elevada durante el desarrollo embrionario tendinoso (Hiraki y Shukunami, 2005). La expresión de *TNMD* está positivamente regulada por *SCX* (Shukunami *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015).

Al igual que en otros trabajos publicados, (Schnabel *et al.*, 2009; Watts *et al.*, 2011a; Carvalho *et al.*, 2013), en nuestro ensayo, hemos observado una sobreexpresión de *TNMD* tanto en los grupos tratados como en el no tratado RL, en comparación con el T-SANO, (ver Figura 54). Además, se han observado diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo T-SANO y el grupo tratado PRP. A su vez, también se han observado diferencias significativas ($p < 0.05$), entre los grupos tratados AT y PRP. Por otra parte, los mínimos valores de expresión se observan en T-SANO, al igual que en diferentes estudios publicados en tendones equinos (Fortier y Smith, 2008; Taylor *et al.*, 2009) y humanos (Jelinsky *et al.*, 2010). Estos mismos autores, no encontraron diferencias significativas de expresión para este gen entre los tendones tratados y los control.

Sin embargo (Watts *et al.*, 2011a) en un estudio sobre lesiones inducidas con colagenasa sobre el TFSD no detecta expresión de *TNMD* en ningún tendón sano de su estudio aunque si observa una sobreexpresión en tendones lesionados que se mantiene constante a lo largo de la duración de su estudio.

Como ya hemos comentado anteriormente el gen Scleraxis *SCX* tiene un rol relevante en la diferenciación tenocítica, ya que regula la diferenciación de las células progenitoras del tendón, (Brent y Tabin, 2004) activando genes como la *TNMD*, e inhibiendo genes de osteo, condro y adipo diferenciación (Li *et al.*, 2015).

En un estudio realizado en un modelo murino, determinaron la expresión génica *SCX*, *TNMD*, y *COL1A1*, en diferentes tiempos tras una lesión inducida y observaron que la expresión génica de *SCX* se mantiene estable sobreexpresándose de manera significativa entre las 4 y 8 semanas y retorna a valores basales hacia las 12 semanas, mientras *TNMD* se comporta de

manera similar pero se mantiene en valores altos a las 12 semanas de la inducción de la lesión. En otro trabajo realizado en un modelo canino (Manning *et al.*, 2014), se observó una significativa disminución de la expresión génica de SCX a las 24h de inducción de la lesión, aumentando progresivamente hasta llegar a valores cercanos a los valores basales a partir del día 9.

En nuestro estudio, hemos observado que la expresión de SCX está disminuida en comparación con los valores del grupo T-SANO, tanto en el grupo de los tendones tratados como en el grupo control (ver Figura 54). Tampoco hemos observado diferencias significativas entre grupos tratados ni entre estos últimos y el grupo no tratado RL.

Estos resultados son discordantes con los publicados por (Schnabel *et al.*, 2009; Watts *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013), en los que se observan que a las 16 semanas existe una marcada sobreexpresión de este gen, sin encontrar diferencias significativas entre tendones tratados con células de diferentes orígenes y los tendones del grupo control.

De todo lo expuesto puede deducirse que se observa una tendencia en la expresión de la mayoría de los genes analizados que serían coincidentes con los hallazgos histopatológicos encontrados en nuestro estudio. La expresión de *COL1A1*, *COL1A3*, *ACAN*, *DCN*, *MMP3* y *TNC* guarda una estrecha relación con los hallazgos histológicos encontrados, mientras que los resultados de expresión de *SCX*, *TNMD* y *COMP* no guardan relación con dichos parámetros histológicos.

Recientemente (Jacobsen *et al.*, 2015) ha realizado un estudio sobre una lesión inducida en el TFSD analizando histológica y bioquímicamente la zona lesionada y las partes proximales y distales a la lesión a lo largo de todo el tendón. De sus resultados se deduce que se producen cambios histológicos y de expresión génica significativos a lo largo de todo el tendón analizado y por lo tanto, este autor concluye que hay una rápida extensión de la lesión desde el foco de lesión, proximal y distalmente a este, a lo largo de todo el tendón, de forma que estos cambios estructurales y bioquímicos en la matriz extracelular distantes a dicho foco contribuyen a una baja funcionalidad y un alto porcentaje de recidiva de la lesión.

Además de las implicaciones que tiene este estudio a lo hora de entender la terapéutica y la monitorización de la recuperación tendinosa, el mismo autor sugiere que las zonas adyacentes a la lesión focal podrían alterarse y presentar características que no se correspondan exactamente con las del tejido sano.

5.7.3. Consideraciones generales sobre los resultados obtenidos “in vivo” y la terapia celular en las tendinopatías

Los resultados obtenidos en nuestro ensayo preclínico muestran, que tanto la terapia celular como el uso de PRP tienen efectos satisfactorios en el tratamiento de las tendinopatías equinas inducidas mecánicamente.

De forma general, los resultados obtenidos a partir de los diferentes parámetros estudiados (ecográficos, histológicos y de expresión génica) muestran una evolución en la reparación tisular más rápida y la formación de un tejido de mejor calidad en los tendones tratados que en los tendones control.

Si analizamos los resultados obtenidos para cada uno de los grupos tratados con BM-MSCs, AT-MSCs y PRP y el grupo control podemos destacar como más relevantes los que exponemos a continuación.

El grupo tratado con BM-MSCs presenta cambios altamente significativos respecto a los tres parámetros ecográficos en la semana 45 con respecto al tiempo 0. Si analizamos la evolución de estos parámetros en el tiempo, los cambios significativos para el parámetro TES se observan ya a partir de la 6ª semana mientras que el resto de grupos tratados lo hace a partir de la 10ª. Para el parámetro FPS se observan diferencias muy significativas a partir de la semana 10ª.

Respecto a los valores histológicos medidos el grupo BM presenta el mejor valor para el parámetro vascularidad y valores similares en cuanto a celularidad (CN), morfología tenocítica (TM) que el resto de grupos tratados. Además en los resultados del parámetro CO (orientación del colágeno), muestra diferencias significativas respecto al control RL. Estos resultados ecográficos e histológicos están en consonancia con la composición de la matriz extracelular del tejido reparado ya que en este grupo se han podido medir niveles de expresión génica relacionados con una mejor regeneración (altos niveles de expresión de *COL1A1*, y *DCN* y *MMP3* y bajos valores de *COL1A3* y *ACAN*) siendo estadísticamente significativos con respecto al grupo “control sano”, T-SANO, *COL1A1*, *DCN*, *ACAN* y *MMP3*.

En el caso de los marcadores de diferenciación tenocítica más específicos como son la *TNMD* y *TNC*, este último se sobrepresó de manera significativa con respecto al control (T-SANO) en este grupo.

En el caso de los marcadores de diferenciación tenocítica más específicos como son la *SCX* y *TNC*, este último se sobrepresó de manera significativa con respecto al control (T-SANO) en este grupo.

En referencia al grupo tratado AT-MSCs, los valores observados para los parámetros ecográficos más importantes FPS y %CSA son significativamente mejores en la semana 45ª con respecto al tiempo 0, aunque la significación es menor que los grupos tratados BM y PRP. Por otro lado, para estos dos parámetros las diferencias muy significativas con respecto al tiempo 0 aparecen a partir de la semana 10ª para el FPS y para el %CSA

Los valores de los parámetros histológicos resultantes para este grupo han sido mejores en todos los parámetros frente al grupo control. El comportamiento de los resultados de

expresión de los genes medidos ha sido muy variable para el grupo tratado AT por lo que resulta difícil extraer conclusiones claras respecto a ellos.

En el grupo tratado con PRP, al igual que ocurre en los otros dos tratamientos ya comentados, se observan diferencias significativas para los parámetros ecográficos entre la semana 45ª y el tiempo 0. Estudiando al evolución de dichos parámetros en el tiempo, en este grupo se observa la mayor significación respecto al parámetro CSA en diferencias comienzan a detectarse en la semana 10ª. Este grupo sigue una tendencia, en cuanto a los valores histológicos se refiere, similar al grupo BM y AT. Los valores histológicos observados para este grupo fueron siempre mejores que en el grupo control, destacando los valores de los parámetros GS y CO en los que muestra diferencias significativas con respecto al grupo control.

Al igual que el grupo tratado AT, este grupo presenta gran variabilidad en lo que respecta a los datos de expresión génica obtenidos, destacando dos valores, la expresión de *COL1A3* y *ACAN* que es significativamente alta con respecto al patrón normal (T-SANO), relacionados con baja calidad del tejido reparado. Sin embargo los valores de *TNC*, *TNMD* y *MMP3* son significativamente elevados frente al control pero en este caso están relacionados con una mejor regeneración. Los marcadores de diferenciación tenocítica *TNMD* y *TNC*, al igual que ocurre en el grupo tratado con BM se sobreexpresan de forma significativa.

Por último el grupo control (RL), presenta los peores valores ecográficos destacando el parámetro %CSA en el que prácticamente no se observan diferencias entre el día 0 y la 45ª semana.

Todos los parámetros histológicos correspondientes a este grupo han obtenido los peores valores, destacando los parámetros CO, V, TM y GS en donde se observan mayores diferencias con respecto a los grupos tratados pero sin llegar a ser estadísticamente significativas. En el caso de la expresión génica detectada en este grupo, aunque presenta cierta variabilidad, podemos destacar la expresión de dos de los principales genes relacionados con una mala calidad del tejido reparado como son *COL1A3*, *ACAN*. Los valores de expresión para estos dos genes fueron mucho más elevados comparados con el resto de grupos tratados aunque debido a la alta variabilidad individual no fueron significativos.

Diversos autores han descrito mejoras estructurales y funcionales en tendinopatías tratadas con diferentes productos biológicos englobados dentro de la medicina regenerativa (Smith *et al.*, 2003; Godwin *et al.*, 2012), células mononucleadas derivadas de médula ósea (Crovace *et al.*, 2010), Fracción vascular estromal derivada de grasa (AD-SVF), (Nixon *et al.*, 2008a), PRPs, con células mesenquimales derivadas de médula ósea (Bosch *et al.*, 2010) y vehiculadas con diferentes productos, sobrenadante de médula ósea (BMA) (Smith *et al.*, 2013), plasma rico en en plaquetas (PRP) (Del Bue *et al.*, 2008), derivadas de grasa (Carvalho *et al.*, 2011), o células embrionarias (Watts *et al.*, 2011a).

A pesar de los resultados satisfactorios de estos tratamientos observados en nuestro estudio y por diferentes autores, existe una gran heterogeneidad de resultados obtenidos, que puede ser explicada debido a la gran variabilidad existente en el diseño de los ensayos preclínicos realizados hasta el momento. El diferente origen de las MSCs (grasa, médula ósea, etc), el tipo de lesiones (naturales o inducidas química o quirúrgicamente), son algunos de los factores que pueden generar la variabilidad observada.

Así por ejemplo, algunos autores (Smith *et al.*, 2013), señalan que algunas de las diferencias en los resultados obtenidos podrían deberse a que el ambiente inflamatorio donde se implantan las MSCs en una lesión inducida química ó quirúrgicamente, es diferente al de una lesión natural donde a esta última, preceden cambios degenerativos graves ultraestructurales.

Además de estos factores, podríamos señalar otros, como el uso de vehiculantes utilizados. La mayoría de los ensayos realizados utilizan BM-MSCs y como vehiculantes, PRPs ó sobrenadante de médula ósea. A estos vehiculantes, se les atribuye efectos sinérgicos a los de las células madre ya que poseen gran cantidad de factores de crecimiento. Así (Smith *et al.*, 2013) atribuye un efecto beneficioso del sobrenadante de médula empleado, y sin embargo otros autores (Martinello *et al.*, 2013), no encuentra efecto sinérgico asociado al PRP en lesiones tratadas con células mesenquimales provenientes de sangre periférica (PB-MSCs). La utilización de MSCs conjuntamente con otros productos biológicos puede dificultar la determinación de la eficacia de cada uno de los productos por separado (Koch *et al.*, 2009). Por esta razón en nuestro diseño del estudio se decidió hacer tratamientos independientes y utilizar RL como vehiculante para poder valorar el efecto de cada uno de los tratamientos individualmente.

Conocer los efectos individuales tanto del PRP como de las MSCs y sus efectos cuando son aplicados conjuntamente son, de vital importancia ya que el protocolo terapéutico más aceptado suele ser, aplicar una dosis de PRP tras la lesión tendinosa, seguidamente una vez cultivadas y expandidas aplicar una dosis de MSCs resuspendidas bien en PRPs ó sobrenadante de médula ósea y tras una evaluación clínica y ecográfica aplicar una segunda dosis en función de la evolución de la lesión (Schnabel *et al.*, 2013).

El número de aplicaciones o la dosis a implantar tras la lesión es uno de los parámetros menos estudiados en los trabajos preclínicos publicados hasta el momento. Estos parámetros pueden estar relacionados con la supervivencia de las MSCs una vez implantadas, así como con su capacidad migratoria hacia los tejidos dañados. En el trabajo objeto de esta tesis se ha aplicado una única dosis al igual que el resto de estudios publicados hasta el momento en el tratamiento de tendinopatias equinas.

Aparte de las tasas de supervivencia de las células madre, sería importante conocer y profundizar en la capacidad migratoria de estas, de cara a futuras aplicaciones sistémicas. Son conocidas las capacidades de las MSCs tanto para reclutar células indiferenciadas de los tejidos perilesionales como la de migración hacia tejidos dañados (Gittel *et al.*, 2013).

Respecto a la dosis tanto de PRPs como de MSCs aplicadas. En ambos casos las dosis aplicadas han ido decreciendo con el paso del tiempo. En el caso de los PRPs la tendencia terapéutica es aplicar productos con concentraciones de plaquetas menores pero menos activadas de forma que haya una liberación de factores de crecimiento menos intensa pero más sostenida en el tiempo (Abellonet, 2009 tesis doctoral). En nuestro trabajo hemos utilizado concentraciones de PRPs de aproximadamente 300.000 PLT/ul y 20 millones de MSCs por tratamiento. Sin embargo en otros trabajos publicados se han empleado dosis variables que varían desde los 3 millones, (Watts *et al.*, 2011a), 5.5 millones, (Crovace *et al.*, 2010), 10 millones, (Caniglia *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2013), etc. Por eso, aunque el número óptimo de células madre para el tratamiento de lesiones tendinosas está todavía por determinarse, es probable que exista un rango dentro del cual el número de células madre sea más efectivo.

Otro tema que despierta un gran interés en el mundo de la clínica equina, es establecer el momento óptimo de aplicación de los productos regenerativos. En el estudio realizado por nosotros hemos implantado tanto los PRPs como las MSCs una semana después de la creación de la lesión. En las lesiones naturales es más difícil determinar el momento preciso en que se origina la lesión pero en la mayoría de los trabajos publicados la implantación de las MSCs en lesiones naturales y debido al tiempo de cultivo se realiza a los 50 días de media, (Smith *et al.*, 2013). Sin embargo en los estudios publicados con lesiones inducidas el intervalo de tiempo entre la creación de la lesión y la implantación del tratamiento varía en un rango de tiempo que va desde los 15 días hasta los 30, (Caniglia *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013). Diversos estudios sugieren que el momento ideal de implantación es en la fase subaguda de la lesión cuando la inflamación es más moderada con respecto a la originada en el momento de la creación de lesión, y la formación de tejido cicatricial es aún muy reducida, (Koch *et al.*, 2009). Posiblemente el aspecto más importante que queda por dilucidar sobre el tratamiento de las MSCs es su mecanismo de acción. Hasta el momento, el efecto regenerativo observado en los tratamientos de lesiones tendinosas con MSCs, no se ha dilucidado si se debe a la acción trófica paracrina (producción de factores de crecimiento y citoquinas), a su capacidad de reclutamiento y activación de células nativas con diferentes estados de plasticidad, a la diferenciación de las MSCs implantadas ó a su capacidad antiinflamatoria y de inmunomodulación en los tejidos inflamados.

En el ensayo preclínico de la presente Tesis Doctoral hemos comprobado la capacidad de las MSCs para modular e inhibir el crecimiento de linfocitos T en cocultivo de forma dosis-dependiente. Diferentes estudios demuestran al igual que nuestros resultados, la fuerte evidencia de la capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora de las MSCs, (Peroni y Borjesson, 2011; Carrade y Borjesson, 2013; Remacha *et al.*, 2015) .

Estas propiedades inmunomoduladoras con capacidad para regular respuestas celulares y humorales de las MSCs, les confiere en cierta manera, un carácter inmunoprivilegiado, (Williams *et al.*, 2015). Así, y debido a estas especiales características, el uso de Mscs alogénicas ha despertado un gran interés en la comunidad científica debido a las ventajas que

presenta el uso de este tipo de células, como el poder obtener de un mismo individuo gran cantidad de MSCs y poder criopreservarlas hasta el momento que se precisen, evitando así el tiempo de espera que necesitan las MSCs autólogas para su expansión.

Sin embargo, todavía existen puntos a clarificar en el uso de las MSCs alogénicas, como los mecanismos de reconocimiento por el sistema inmune del receptor y la respuesta adversa que puedan generar (Falomo *et al.*, 2015) así como los riesgos biológicos de transmisión de enfermedades infecciosas, o latentes crónicas, que no han sido estudiadas hasta el momento (Consentius *et al.*, 2015).

En el grupo de investigación en el que me hallo integrado, se está estudiando en estos momentos los mecanismos de inmunoevasión de las células alogénicas y sus mecanismos inmunitarios para lograrlo. A día de hoy se conoce que las MSCs presentan el complejo mayor de histocompatibilidad MHCII y que su expresión varía en función del propio individuo, del número de pases durante el cultivo y de la presencia de factores bioquímicos en el medio del cultivo como pueden ser el interferón o algunas citoquinas proinflamatorias (Schnabel *et al.*, 2014). El conocimiento de estos mecanismos para un uso terapéutico de las células alogénicas eficaz y seguro (Pezzanite *et al.*, 2015), se hace indispensable si queremos avanzar en la regeneración tisular de las MSCs.

Hasta el momento, no se han observado efectos adversos en el uso, tanto de MSCs autólogas como alogénicas y tan solo se han descrito en la bibliografía, pequeñas reacciones inflamatorias transitorias que se normalizan sin necesidad de tratamientos. 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). Deben realizarse en un futuro esfuerzos en la implementación de la tipificación de los diferentes haplotipos del MHC-II para establecer donantes compatibles de MSCs alogénicas y poder mejorar la eficacia en el uso terapéutico de las mismas (Pezzanite *et al.*, 2015).

Por último me gustaría señalar que, a pesar de los avances que se han realizado en los últimos años en medicina regenerativa equina son necesarios ensayos como los realizados en el presente trabajo, que permitan establecer unos procedimientos más unificados en cuanto a número de animales, dosis y tipos de MSCs empleadas, modelos de inducción de la lesión, protocolos de inyección, escalas de valoración del tejido regenerado, tipos de marcadores que definan mejor la regeneración tisular, periodos de seguimiento, etc. de forma que se puedan realizar en un futuro tratamientos más eficaces con MSCs y/o PRP y así conseguir una mejor resolución de las patologías del aparato locomotor, para las que no existen en este momento tratamientos eficaces, ni en la especie equina ni en la humana.

6. CONCLUSIONES CONCLUSIONS

1. Las células madre mesenquimales (MSCs) aisladas de médula ósea y tejido adiposo, cumplieron los requerimientos establecidos por la ISCT, diferenciándose a los tres linajes mesodérmicos y mostrando la expresión de los marcadores de superficie esperados.
2. El efecto de las MSCs sobre la inhibición de la proliferación de las células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) fue significativo tanto en las obtenidas de médula ósea como en las obtenidas de tejido adiposo, siendo mayor en estas últimas.
3. La lesión inducida mediante la aplicación de un método mecánico-quirúrgico fue similar en todos los animales del estudio y permitió la valoración de los tratamientos aplicados hasta la semana cuarenta y cinco tras la inducción.
4. El PRP y las MSCs expandidas y caracterizadas se implantaron en los tendones lesionados de forma ecoguiada, sin observarse efectos adversos tras la implantación.
5. Los diferentes grupos tratados BM, AT y PRP no mostraron diferencias significativas entre sí para los parámetros clínicos (tiempo de recumbencia, frecuencia cardíaca y respiratoria, dolor a la palpo-presión, grado de inflamación y grado de cojera). Tampoco mostraron diferencias significativas entre estos y el grupo control.
6. La evolución en el tiempo de los parámetros ecográficos medidos (TES, FPS y CSA), ha resultado clínicamente más rápida en los tendones tratados que en el grupo control. Así, para FPS los grupos tratados han mostrado diferencias significativas a partir de la semana 10ª mientras que el grupo control lo hicieron a partir de la semana 45ª. En el caso de CSA, el grupo control no ha mostrado diferencias significativas entre ninguno de los tiempos considerados.
7. Todos los parámetros histológicos analizados presentaron menores valores en los tendones tratados que los observados en el grupo control, lo que es indicativo de una mejor regeneración tisular.
8. Del conjunto de genes valorados, la expresión génica de *COL1A1*, *COL3A1*, *ACAN*, *TNC* y *MMP3*, aunque presentó una gran variabilidad individual, fue indicativa de una mejor regeneración tisular, coincidiendo con la tendencia observada en los parámetros histológicos.

CONCLUSION FINAL

En las condiciones de nuestro ensayo podemos concluir que considerando los parámetros analizados en conjunto, ninguno de los tratamientos aplicados ha resultado más eficaz que otro. Sin embargo, sí se ha observado un claro efecto beneficioso del tratamiento con BM-MSCs, AT-MSCs y PRP en lesiones inducidas en el TDFS con respecto al grupo control (RL).

Conclusions

1. Mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from bone marrow and adipose tissue met the requirements set by the ISTC, differentiating to the three mesodermal lineages and showing the expression of expected surface markers.
2. The inhibitory effect of MSCs on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was significant in both origins bone marrow and adipose tissue, being greater in the latter.
3. The injury induced by applying a surgical method was similar in all animals in the study and allowed the assessment of treatments until 45^a week after induction.
4. PRP and expanded and characterized MSCs were sonographically implanted into the injured tendon and no adverse effects were observed after implantation.
5. The different groups treated (BM, AT and PRP) did not differ among themselves for the clinical parameters (recumbency time, heart and respiratory rate, pain on palpo-pressure, degree of inflammation and degree of lameness). No significant differences were observed between treated groups and control group either.
6. The evolution throughout the experiment of the ultrasound parameters measured (TES, FPS and CSA) has been clinically faster in treated tendons than in the control group. Thus, regarding FPS parameter, treated groups showed significant differences in the 10th week while the control group did in the 45th week. With respect to CSA parameter, the control group showed no significant differences between any of the times considered.
7. All histological parameters analyzed showed lower values in treated tendons than those observed in the control group, which is indicative of better tissue regeneration.
8. Of all genes evaluated, gene expression of COL1A1, COL3A1, ACAN, TNC and MMP3, despite their great individual variability, was indicative of better tissue regeneration, coinciding with the trend observed in the histological parameters.

FINAL CONCLUSION

Under our experimental conditions we can conclude that considering the parameters analyzed together, none of the treatments applied has turned out more effective than another. However, it has been observed a clear beneficial effect of treatment with BM-MSCs, AT-MSCs and PRP on the injuries induced in the SFDT with respect to the control group (RL).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abate M, Di Gregorio P, Schiavone C, Salini V, Tosi U, Muttini A. (2012). Platelet rich plasma in tendinopathies: How to explain the failure. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 25 (2), 325-334.
2. Abellanet I. (2009). La terapia de lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: Evidencia clínica y bioquímica que valida su utilización
3. Abrahamsson SO. (1991). Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. experimental studies on rabbit tendon. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*. Supplementum. 23 1-51.
4. Adachi N, Sato K, Usas A, Fu FH, Ochi M, Han CW, Niyibizi C, Huard J. (2002). Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *The Journal of Rheumatology*. 29 (9), 1920-1930.
5. Adams MK, Goodrich LR, Rao S, Olea-Popelka F, Phillips N, Kisiday JD, McIlwraith CW. (2013). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: Are there differences? *Equine Veterinary Journal*. 45 (3), 372-375.
6. Adler SC, Kent KJ. (2002). Enhancing wound healing with growth factors. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 10 (2), 129-146.
7. Aggarwal S, Pittenger MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105 (4), 1815-1822.
8. Ahern BJ, Schaer TP, Terkhorn SP, Jackson KV, Mason NJ, Hankenson KD. (2011). Evaluation of equine peripheral blood apheresis product, bone marrow, and adipose tissue as sources of mesenchymal stem cells and their differentiation potential. *American Journal of Veterinary Research*. 72 (1), 127-133.
9. Akizuki S, Yasukawa Y, Takizawa T. (1997). Does arthroscopic abrasion arthroplasty promote cartilage regeneration in osteoarthritic knees with eburnation? A prospective study of high tibial osteotomy with abrasion arthroplasty versus high tibial osteotomy alone. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 13 (1), 9-17.
10. Alfredson H, Bjur D, Thorsen K, Lorentzon R, Sandstrom P. (2002). High intratendinous lactate levels in painful chronic achilles tendinosis. an investigation using microdialysis technique. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 20 (5), 934-938.
11. Alfredson H, Lorentzon R. (2002a). Chronic tendon pain: No signs of chemical inflammation but high concentrations of the neurotransmitter glutamate. implications for treatment? *Current Drug Targets*. 3 (1), 43-54.
12. Alfredson H, Lorentzon R. (2002b). Chronic tendon pain: No signs of chemical inflammation but high concentrations of the neurotransmitter glutamate. implications for treatment? *Current Drug Targets*. 3 (1), 43-54.
13. Alfredson H, Lorentzon M, Backman S, Backman A, Lerner UH. (2003). cDNA-arrays and real-time quantitative PCR techniques in the investigation of chronic achilles tendinosis. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 21 (6), 970-975.
14. Alfredson H. (2005). The chronic painful achilles and patellar tendon: Research on basic biology and treatment. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 15 (4), 252-259.
15. Álvarez M, Giraldo C, Carmona J. (2010). Contaminación bacteriana en concentrados de plaquetas de caballos. *Archivos De Medicina Veterinaria*. 42 (1), 49-56.
16. Anitua E. (2001). The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Practical Procedures & Aesthetic Dentistry: PPAD*. 13 (6), 487-93; quiz 487-93.
17. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*. 91 (1), 4-15.
18. Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden AT. (2005a). Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 23 (2), 281-286.
19. Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden AT. (2005b). Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 23 (2), 281-286.

20. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Orive G, Azofra J, Andia I. (2006). Autologous fibrin matrices: A potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 77 (2), 285-293.
21. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Azofra J, Andia I. (2007). Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 119 (3), 950-959.
22. Anitua E, Muruzabal F, Pino A, Merayo-Llodes J, Orive G. (2013). Biological stability of plasma rich in growth factors eye drops after storage of 3 months. *Cornea*. 32 (10), 1380-1386.
23. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. (2014). Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*. 32 (3), 252-260.
24. Antoniades HN, Pantazis P. (1989). Platelet-derived growth factor: Purification and characterization. *Methods in Enzymology*. 169 210-224.
25. Arguelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Vinals L, Martinez P, Bach E, Prades M. (2006). Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Research in Veterinary Science*. 81 (2), 237-245.
26. Arguelles D, Carmona JU, Climent F, Munoz E, Prades M. (2008). Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *The Veterinary Record*. 162 (7), 208-211.
27. Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, Addicks K, Litzke LF. (2007). Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*. 68 (10), 1095-1105.
28. Astrom M, Rausing A. (1995). Chronic achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. (316) (316), 151-164.
29. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI. (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Engineering*. 5 (3), 267-277.
30. Backman LJ, Fong G, Andersson G, Scott A, Danielson P. (2011). Substance P is a mechanoresponsive, autocrine regulator of human tenocyte proliferation. *PloS One*. 6 (11), e27209.
31. Baksh D, Song L, Tuan RS. (2004). Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 8 (3), 301-316.
32. Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, Tomic-Canic M. (2014). Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 22 (5), 569-578.
33. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. (2001). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental Cell Research*. 268 (2), 189-200.
34. Batson EL, Paramour RJ, Smith TJ, Birch HL, Patterson-Kane JC, Goodship AE. (2003). Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions? *Equine Veterinary Journal*. 35 (3), 314-318.
35. Bennett NT, Schultz GS. (1993). Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors. *The American Journal of Surgery*. 165 (6), 728-737.
36. Berg L, Koch T, Heerkens T, Bessonov K, Thomsen P, Betts D. (2009). Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology: V.C.O.T.* 22 (5), 363-370.
37. Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. (2003). Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Experimental Cell Research*. 287 (1), 98-105.
38. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T. (2007). Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: An in vitro study. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*. 89 (3), 417-420.
39. Birch HL, Wilson AM, Goodship AE. (1997). The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *The Journal of Experimental Biology*. 200 (Pt 11), 1703-1708.
40. Birch HL, Bailey AJ, Goodship AE. (1998). Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine Veterinary Journal*. 30 (6), 534-539.

41. Birch HL, McLaughlin L, Smith RK, Goodship AE. (1999). Treadmill exercise-induced tendon hypertrophy: Assessment of tendons with different mechanical functions. *Equine Veterinary Journal. Supplement.* (30) (30), 222-226.
42. Bolt DM, Burba DJ, Hubert JD, Pettifer GR, Hosgood GL. (2004). Evaluation of cutaneous analgesia after non-focused extracorporeal shock wave application over the 3rd metacarpal bone in horses. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire.* 68 (4), 288-292.
43. Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP, Boyan B, Boskey A. (2003). Von kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcified Tissue International.* 72 (5), 537-547.
44. Bosch G, Lin YL, van Schie HT, van De Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR. (2007). Effect of extracorporeal shock wave therapy on the biochemical composition and metabolic activity of tenocytes in normal tendinous structures in ponies. *Equine Veterinary Journal.* 39 (3), 226-231.
45. Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR. (2010). Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society.* 28 (2), 211-217.
46. Bosch G, Moleman M, Barneveld A, van Weeren PR, van Schie HT. (2011). The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports.* 21 (4), 554-561.
47. Bowen-Pope DF, Ross R. (1984). Platelet-derived growth factor. *Clinics in Endocrinology and Metabolism.* 13 (1), 191-205.
48. Bowker RM, Linder K, Van Wulfen KK, Sonea IM. (1997). Anatomy of the distal interphalangeal joint of the mature horse: Relationships with navicular suspensory ligaments, sensory nerves and neurovascular bundle. *Equine Veterinary Journal.* 29 (2), 126-135.
49. Brandau S, Jakob M, Hemeda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F, Lang S. (2010). Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *Journal of Leukocyte Biology.* 88 (5), 1005-1015.
50. Branford OA, Klass BR, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. (2014). The growth factors involved in flexor tendon repair and adhesion formation. *The Journal of Hand Surgery, European Volume.* 39 (1), 60-70.
51. Braun J, Hack A, Weis-Klemm M, Conrad S, Tremel S, Kohler K, Walliser U, Skutella T, Aicher WK. (2010). Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research.* 71 (10), 1228-1236.
52. Brayton CF. (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO): A review. *The Cornell Veterinarian.* 76 (1), 61-90.
53. Brent AE, Tabin CJ. (2004). FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the ets transcription factors *Pea3* and *erm* to regulate scleraxis expression. *Development (Cambridge, England).* 131 (16), 3885-3896.
54. Bronzi D, Bramanti V, Tomassoni D, Laureanti F, Grasso S, Li Volsi G, Avola R. (2010). Neural markers expression in rat bone marrow mesenchymal stem cell cultures treated with neurosteroids. *Neurochemical Research.* 35 (12), 2154-2160.
55. Brossi PM, Moreira JJ, Machado TS, Baccarin RY. (2015). Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: A comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Veterinary Research.* 11 98-015-0403-z.
56. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry.* 64 (2), 278-294.
57. Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, Gimble JM. (2008). Differentiation of adipose stem cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.).* 456 155-171.
58. Bunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. (2010). New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 1 (5), 34.
59. Cadby JA, David F, van de Lest C, Bosch G, van Weeren PR, Snedeker JG, van Schie HT. (2013). Further characterisation of an experimental model of tendinopathy in the horse. *Equine Veterinary Journal.* 45 (5), 642-648.

60. Caldwell FJ, Mueller PO, Lynn RC, Budsberg SC. (2004). Effect of topical application of diclofenac liposomal suspension on experimentally induced subcutaneous inflammation in horses. *American Journal of Veterinary Research*. 65 (3), 271-276.
61. Campbell BH, Agarwal C, Wang JH. (2004). TGF-beta1, TGF-beta3, and PGE(2) regulate contraction of human patellar tendon fibroblasts. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. 2 (4), 239-245.
62. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. (1989). Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *Journal of Cellular Physiology*. 140 (3), 530-537.
63. Canalis E. (1992). Clinical review 35: Growth factors and their potential clinical value. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 75 (1), 1-4.
64. Caniglia CJ, Schramme MC, Smith RK. (2012). The effect of intralesional injection of bone marrow derived mesenchymal stem cells and bone marrow supernatant on collagen fibril size in a surgical model of equine superficial digital flexor tendonitis. *Equine Veterinary Journal*. 44 (5), 587-593.
65. Cao W, Cao K, Cao J, Wang Y, Shi Y. (2015). Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses. *Immunology Letters*.
66. 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.
67. Carmona JU, Lopez C. (2011). Comments on torricelli et al.: Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *International Orthopaedics*. 35 (11), 1745; author reply 1747-1748.
68. Carrade DD, Lame MW, Kent MS, Clark KC, Walker NJ, Borjesson DL. (2012). Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells(). *Cell Medicine*. 4 (1), 1-11.
69. Carrade DD, Borjesson DL. (2013). Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comparative Medicine*. 63 (3), 207-217.
70. Carvalho A, Garcia AL, de Oliveira P, Álvarez LE, Amorim R, Hussni CA, Deffune E. (2011). Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *Journal of Equine Veterinary Science*. 31 (1), 26-34.
71. Carvalho A, Badial PR, Alvarez LE, Yamada AL, Borges AS, Deffune E, Hussni CA, Garcia Alves AL. (2013). Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: A randomized controlled trial. *Stem Cell Research & Therapy*. 4 (4), 85.
72. Castro-Manreza ME, Montesinos JJ. (2015). Immunoregulation by mesenchymal stem cells: Biological aspects and clinical applications. *Journal of Immunology Research*. 2015 394917.
73. Cawston TE, Wilson AJ. (2006). Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*. 20 (5), 983-1002.
74. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: Going back to the future. *Journal of Lipid Research*. 53 (2), 227-246.
75. Chakravarti S. (2002). Functions of lumican and fibromodulin: Lessons from knockout mice. *Glycoconjugate Journal*. 19 (4-5), 287-293.
76. Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K. (2000). Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: A rat patellar tendon model. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 71 (5), 513-518.
77. Chang J, Most D, Thunder R, Mehrara B, Longaker MT, Lineaweaver WC. (1998). Molecular studies in flexor tendon wound healing: The role of basic fibroblast growth factor gene expression. *The Journal of Hand Surgery*. 23 (6), 1052-1058.
78. Chen CH, Cao Y, Wu YF, Bais AJ, Gao JS, Tang JB. (2008). Tendon healing in vivo: Gene expression and production of multiple growth factors in early tendon healing period. *The Journal of Hand Surgery*. 3 (10), 1834-1842.
79. Chen L, Daley GQ. (2008). Molecular basis of pluripotency. *Human Molecular Genetics*. 17 (R1), R23-7.
80. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. (2004a). Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*. 94 (1), 92-95.

81. Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Kuo YR, Huang HC, Huang YT, Sun YC, Wang FS. (2004b). Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced achilles tendinitis and increase TGF-beta1 and IGF-I expression. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 22 (4), 854-861.
82. Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. (2004). Connective tissues: Signalling by tenascins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36 (6), 1085-1089.
83. Chong AK, Chang J, Go JC. (2009). Mesenchymal stem cells and tendon healing. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 14 4598-4605.
84. Chou CH, Lee CH, Lu LS, Song IW, Chuang HP, Kuo SY, Wu JY, Chen YT, Kraus VB, Wu CC, Lee MT. (2013). Direct assessment of articular cartilage and underlying subchondral bone reveals a progressive gene expression change in human osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and Cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 21 (3), 450-461.
85. Christgau M, Moder D, Hiller KA, Dada A, Schmitz G, Schmalz G. (2006). Growth factors and cytokines in autologous platelet concentrate and their correlation to periodontal regeneration outcomes. *Journal of Clinical Periodontology*. 33 (11), 837-845.
86. Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. (1992). Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcified Tissue International*. 51 (4), 305-311.
87. Ciccocioppo R, Gallia A, Sgarella A, Kruzliak P, Gobbi PG, Corazza GR. (2015). Long-term follow-up of crohn disease fistulas after local injections of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mayo Clinic Proceedings*. 90 (6), 747-755.
88. Clegg PD, Strassburg S, Smith RK. (2007). Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. *International Journal of Experimental Pathology*. 88 (4), 227-235.
89. Clegg PD, Pinchbeck GL. (2011). Evidence-based medicine and stem cell therapy: How do we know such technologies are safe and efficacious? *The Veterinary Clinics of North America.Equine Practice*. 27 (2), 373-382.
90. Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, Spadari A, Galli C, Lazzari G. (2009). Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: Effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Veterinary Research Communications*. 33 (8), 811-821.
91. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 84 (5), 1470-1478.
92. Consentius C, Reinke P, Volk HD. (2015). Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: What has been seen in vitro and in vivo? *Regenerative Medicine*. 10 (3), 305-315.
93. Conze P, van Schie HT, van Weeren R, Staszuk C, Conrad S, Skutella T, Hopster K, Rohn K, Stadler P, Geburek F. (2014). Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions. *Regenerative Medicine*. 9 (6), 743-757.
94. Cook JL, Feller JA, Bonar SF, Khan KM. (2004). Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 22 (2), 334-338.
95. Corps AN, Robinson AH, Movin T, Costa ML, Ireland DC, Hazleman BL, Riley GP. (2004). Versican splice variant messenger RNA expression in normal human achilles tendon and tendinopathies. *Rheumatology (Oxford, England)*. 43 (8), 969-972.
96. Corps AN, Robinson AH, Movin T, Costa ML, Hazleman BL, Riley GP. (2006). Increased expression of aggrecan and biglycan mRNA in achilles tendinopathy. *Rheumatology (Oxford, England)*. 45 (3), 291-294.
97. Corps AN, Robinson AH, Harrall RL, Avery NC, Curry VA, Hazleman BL, Riley GP. (2012). Changes in matrix protein biochemistry and the expression of mRNA encoding matrix proteins and metalloproteinases in posterior tibialis tendinopathy. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 71 (5), 746-752.
98. Craychee T. (1995). Ultrasonographic evaluation of equine musculoskeletal injury. NYLAND, TG; MATTON, JS *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. Philadelphia: WB Saunders. 265-304.
99. Crevier-Denoix N, Collobert C, Pourcelot P, Denoix JM, Sanaa M, Geiger D, Bernard N, Ribot X, Bortolussi C, Bousseau B. (1997). Mechanical properties of pathological equine superficial digital flexor tendons. *Equine Veterinary Journal.Supplement*. (23) (23), 23-26.

100. Crovace A, Lacitignola L, Rossi G, Francioso E. (2010). Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. *Veterinary Medicine International*. 2010 250978.
101. Dahlberg JA, McClure SR, Evans RB, Reinertson EL. (2006). Force platform evaluation of lameness severity following extracorporeal shock wave therapy in horses with unilateral forelimb lameness. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 229 (1), 100-103.
102. Dahlgren L. (2009). Management of tendon injuries. *Current Therapy in Equine Medicine*. 6 518-523.
103. Dahlgren LA, Nixon AJ, Brower-Toland BD. (2001). Effects of beta-aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. *American Journal of Veterinary Research*. 62 (10), 1557-1562.
104. Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ. (2002). Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 20 (5), 910-919.
105. Dahlgren LA, Brower-Toland BD, Nixon AJ. (2005). Cloning and expression of type III collagen in normal and injured tendons of horses. *American Journal of Veterinary Research*. 66 (2), 266-270.
106. Dai Y. (2010). Platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: A review of the recent patent literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 20 (7), 885-897.
107. Dakin SG, Dudhia J, Smith RK. (2014). Resolving an inflammatory concept: The importance of inflammation and resolution in tendinopathy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 158 (3-4), 121-127.
108. WDe Mattos Carvalho A, Alves AL, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, de Oliveira PG, Deffune E. (2009). Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 132 (2-4), 303-306.
109. De Mos M, van El B, DeGroot J, Jahr H, van Schie HT, van Arkel ER, Tol H, Heijboer R, van Osch GJ, Verhaar JA. (2007). Achilles tendinosis: Changes in biochemical composition and collagen turnover rate. *The American Journal of Sports Medicine*. 35 (9), 1549-1556.
110. De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A. (2011). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity. *Theriogenology*. 75 (8), 1431-1443.
111. Dean BJ, Gettings P, Dakin SG, Carr AJ. (2015). Are inflammatory cells increased in painful human tendinopathy? A systematic review. *British Journal of Sports Medicine*.
112. Del Bue M, Ricco S, Ramoni R, Conti V, Gnudi G, Grolli S. (2008). Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: Their association in vitro and in vivo. *Veterinary Research Communications*. 32 Suppl 1 S51-5.
113. Deng W, Han Q, Liao L, You S, Deng H, Zhao RC. (2005). Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSB mice. *DNA and Cell Biology*. 24 (7), 458-463.
114. Deng YB, Liu XG, Liu ZG, Liu XL, Liu Y, Zhou GQ. (2006). Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: Evidence from a study in rhesus monkeys. *Cytotherapy*. 8 (3), 210-214.
115. Deuel TF, Huang JS, Proffitt RT, Baenziger JU, Chang D, Kennedy BB. (1981). Human platelet-derived growth factor. purification and resolution into two active protein fractions. *The Journal of Biological Chemistry*. 256 (17), 8896-8899.
116. Dickinson A, Cant A. (2002). Haemopoietic stem-cell transplantation: Improving immune reconstitution, avoiding graft-versus-host disease. *Lancet (London, England)*. 360 (9327), 98-99.
117. Dines JS, Weber L, Razzano P, Prajapati R, Timmer M, Bowman S, Bonasser L, Dines DM, Grande DP. (2007). The effect of growth differentiation factor-5-coated sutures on tendon repair in a rat model. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons...* [Et Al.]. 16 (5 Suppl), S215-21.
118. Docheva D, Hunziker EB, Fassler R, Brandau O. (2005). Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Molecular and Cellular Biology*. 25 (2), 699-705.
119. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 8 (4), 315-317.

120. Dow SM, Wilson AM, Goodship AE. (1996). Treatment of acute superficial digital flexor tendon injury in horses with polysulphated glycosaminoglycan. *The Veterinary Record*. 139 (17), 413-416.
121. Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Smith RK. (2000). Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Veterinary Journal*. 32 (5), 369-378.
122. Dowling BA, Dart AJ. (2005). Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. 170 (2), 184-192.
123. Duffy FJ, Jr, Seiler JG, Gelberman RH, Hergueter CA. (1995). Growth factors and canine flexor tendon healing: Initial studies in uninjured and repair models. *The Journal of Hand Surgery*. 20 (4), 645-649.
124. Dunkman AA, Buckley MR, Mienaltowski MJ, Adams SM, Thomas SJ, Satchell L, Kumar A, Pathmanathan L, Beason DP, Iozzo RV, Birk DE, Soslowsky LJ. (2014). The tendon injury response is influenced by decorin and biglycan. *Annals of Biomedical Engineering*. 42 (3), 619-630.
125. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American Journal of Pathology*. 146 (5), 1029-1039.
126. Dyson SJ, Denoix JM. (1995). Tendon, tendon sheath, and ligament injuries in the pastern. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 11 (2), 217-233.
127. Dyson SJ, Dik KJ. (1995). Miscellaneous conditions of tendons, tendon sheaths, and ligaments. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 11 (2), 315-337.
128. Dyson SJ. (2004). Medical management of superficial digital flexor tendonitis: A comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Veterinary Journal*. 36 (5), 415-419.
129. Eleftheriou F, Exposito JY, Garrone R, Lethias C. (2001). Binding of tenascin-X to decorin. *FEBS Letters*. 495 (1-2), 44-47.
130. Eliasson P, Fahlgren A, Aspenberg P. (2008). Mechanical load and BMP signaling during tendon repair: A role for follistatin? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 466 (7), 1592-1597.
131. Engebretsen L, Steffen K, Alsousou J, Anitua E, Bachl N, Devilee R, Everts P, Hamilton B, Huard J, Jenoure P, Kelberine F, Kon E, Maffulli N, Matheson G, Mei-Dan O, Menetrey J, Philippon M, Randelli P, Schamasch P, Schweltnus M, Vernec A, Verrall G. (2010). IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *British Journal of Sports Medicine*. 44 (15), 1072-1081.
132. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. (2004). Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 114 (6), 1502-1508.
133. Espira L, Lamoureux L, Jones SC, Gerard RD, Dixon IM, Czubyrt MP. (2009). The basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis regulates fibroblast collagen synthesis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 47 (2), 188-195.
134. Estrada RJ, van Weeren PR, van de Lest CH, Boere J, Reyes M, Ionita JC, Estrada M, Lischer CJ. (2014). Comparison of healing in forelimb and hindlimb surgically induced core lesions of the equine superficial digital flexor tendon. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology: V.C.O.T.* 27 (5), 358-365.
135. Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: Perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental Journal*. 22 (2), 91-98.
136. Evans CH. (1999). Cytokines and the role they play in the healing of ligaments and tendons. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*. 28 (2), 71-76.
137. Evans JH, Barbenel JC. (1975). Structural and mechanical properties of tendon related to function. *Equine Veterinary Journal*. 7 (1), 1-8.
138. Evans MJ, Kaufman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292 (5819), 154-156.
139. Falomo ME, Ferroni L, Tocco I, Gardin C, Zavan B. (2015). Immunomodulatory role of adipose-derived stem cells on equine endometriosis. *BioMed Research International*. 2015 141485.
140. Farnig E, Urdaneta AR, Barba D, Esmende S, McAllister DR. (2008). The effects of GDF-5 and uniaxial strain on mesenchymal stem cells in 3-D culture. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 466 (8), 1930-1937.
141. Fibbe WE, Nauta AJ, Roelofs H. (2007). Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1106 272-278.

142. Fiester A, Scholer H, Caplan A. (2004). Stem cell therapies: Time to talk to the animals. *Cloning and Stem Cells*. 6 (1), 3-4.
143. Forslund C, Rueger D, Aspenberg P. (2003). A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP) -1, -2 and -3 for tendon healing in rats. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 21 (4), 617-621.
144. Fortier LA. (2008) Evidence of platelet rich plasma to resolve lameness. AGP-meeting Applying Regenerative Therapies for Tendón and Joint Caused Lameness of Horses. Bonn, Germany.
145. Fortier LA, Smith RK. (2008). Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *The Veterinary Clinics of North America.Equine Practice*. 24 (1), 191-201.
146. Fortier LA, Travis AJ. (2011). Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Research & Therapy*. 2 (1), 9.
147. Fortier LA. (2012). Making progress in the what, when and where of regenerative medicine for our equine patients. *Equine Veterinary Journal*. 44 (5), 511-512.
148. Franceschi RT. (1992). The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. *Nutrition Reviews*. 50 (3), 65-70.
149. Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I, Dick W, Heberer M, Martin I. (2002). Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*. 85 (4), 737-746.
150. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. (2004). The PDGF family: Four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 15 (4), 197-204.
151. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*. 3 (4), 393-403.
152. Frisbie DD. (2005). Future directions in treatment of joint disease in horses. *The Veterinary Clinics of North America.Equine Practice*. 21 (3), 713-24, viii.
153. Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW. (2006). A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology: V.C.O.T.* 19 (3), 142-146.
154. Frisbie DD, Kisiday JD, Kawcak CE, Werpy NM, McIlwraith CW. (2009). Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 27 (12), 1675-1680.
155. Frisbie DD, Smith RK. (2010). Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal*. 42 (1), 86-89.
156. Fryszak Z, Schovanek J, Iacobone M, Karasek D. (2015). Insulin-like growth factors in a clinical setting: Review of IGF-I. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 159 (3), 347-351.
157. Fukuta S, Oyama M, Kavalkovich K, Fu FH, Niyibizi C. (1998). Identification of types II, IX and X collagens at the insertion site of the bovine achilles tendon. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 17 (1), 65-73.
158. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology*. 17 (3), 638-650.
159. Gaben-Cogneville AM, Aron Y, Idriss G, Jahchan T, Pello JY, Swierczewski E. (1983). Differentiation under the control of insulin of rat preadipocytes in primary culture. isolation of homogeneous cellular fractions by gradient centrifugation. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 762 (3), 437-444.
160. Galmiche MC, Koteliensky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. (1993). Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 82 (1), 66-76.
161. Gaughan EM. (1994). Managing tendinitis in the horse. *Veterinary Medicine*. 89 (8), 789-794.
162. Genovese RL, Rantanen NW, Hauser ML, Simpson BS. (1986). Diagnostic ultrasonography of equine limbs. *The Veterinary Clinics of North America.Equine Practice*. 2 (1), 145-226.
163. Gillis C. (1996) Tendon and ligament rehabilitation. *Proceedings*.
164. Gittel C, Brehm W, Burk J, Juelke H, Staszuk C, Ribitsch I. (2013). Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: Comparison of cellular properties. *BMC Veterinary Research*. 9 221-6148-9-221.

165. Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RK. (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.
166. Goh JC, Ouyang HW, Teoh SH, Chan CK, Lee EH. (2003). Tissue-engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. *Tissue Engineering*. 9 Suppl 1 S31-44.
167. Goncalves NN, Ambrosio CE, Piedrahita JA. (2014). Stem cells and regenerative medicine in domestic and companion animals: A multispecies perspective. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. 49 Suppl 4 2-10.
168. Goodship AE, Birch HL, Wilson AM. (1994). The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 10 (2), 323-349.
169. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, Abdullah KM. (2003). Wound healing: The role of growth factors. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*. 39 (10), 787-800.
170. Griffin MD, Ryan AE, Alagesan S, Lohan P, Treacy O, Ritter T. (2013). Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: What have we learned so far? *Immunology and Cell Biology*. 91 (1), 40-51.
171. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringden O, Sylven C, Le Blanc K. (2004). Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 127 (5), 1293-1300.
172. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science*. 116 (Pt 9), 1827-1835.
173. Gu LH, Zhang TT, Li Y, Yan HJ, Qi H, Li FR. (2015). Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells transplanted via different routes in diabetic rats. *Cellular & Molecular Immunology*. 12 (4), 444-455.
174. Guest DJ, Smith MR, Allen WR. (2010). Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*. 42 (7), 636-642.
175. Gutierrez-Nibeyro SD. (2011). Commercial cell-based therapies for musculoskeletal injuries in horses. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 27 (2), 363-371.
176. Hago BE, Plummer JM, Vaughan LC. (1990). Equine synovial tendon sheaths and bursae: An histological and scanning electron microscopical study. *Equine Veterinary Journal*. 22 (4), 264-272.
177. Haleem-Smith H, Calderon R, Song Y, Tuan RS, Chen FH. (2012). Cartilage oligomeric matrix protein enhances matrix assembly during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 113 (4), 1245-1252.
178. Halper J. (2014). Proteoglycans and diseases of soft tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 802 49-58.
179. Hangody L, Feczko P, Bartha L, Bodo G, Kish G. (2001). Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. (391 Suppl) (391 Suppl), S328-36.
180. Hankemeier S, Keus M, Zeichen J, Jagodzinski M, Barkhausen T, Bosch U, Krettek C, Van Griensven M. (2005). Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: Potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. *Tissue Engineering*. 11 (1-2), 41-49.
181. Hatsushika D, Muneta T, Nakamura T, Horie M, Koga H, Nakagawa Y, Tsuji K, Hishikawa S, Kobayashi E, Sekiya I. (2014). Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis and Cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 22 (7), 941-950.
182. Haupt JL, Donnelly BP, Nixon AJ. (2006). Effects of platelet-derived growth factor-BB on the metabolic function and morphologic features of equine tendon in explant culture. *American Journal of Veterinary Research*. 67 (9), 1595-1600.
183. Hawkins JF, Ross MW. (1995). Transection of the accessory ligament of the superficial digital flexor muscle for the treatment of superficial digital flexor tendinitis in standardbreds: 40 cases (1988-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 206 (5), 674-678.

184. Heinemeier K, Langberg H, Olesen JL, Kjaer M. (2003). Role of TGF-beta1 in relation to exercise-induced type I collagen synthesis in human tendinous tissue. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985). 95 (6), 2390-2397.
185. Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. (1981). Specific receptors for platelet-derived growth factor on cells derived from connective tissue and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78 (6), 3664-3668.
186. Hessel LN, Bosch G, van Weeren PR, Ionita JC. (2015). Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems. *Equine Veterinary Journal*. 47 (3), 319-325.
187. Hiraki Y, Shukunami C. (2005). Angiogenesis inhibitors localized in hypovascular mesenchymal tissues: Chondromodulin-I and tenomodulin. *Connective Tissue Research*. 46 (1), 3-11.
188. Hollenberg CH, Vost A. (1969). Regulation of DNA synthesis in fat cells and stromal elements from rat adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*. 47 (11), 2485-2498.
189. Holley RW, Baldwin JH, Greenfield S, Armour R. (1985). A growth regulatory factor that can both inhibit and stimulate growth. *Ciba Foundation Symposium*. 116 241-252.
190. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B. (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 75 (3), 555-562.
191. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyritz RE, Brenner MK. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine*. 5 (3), 309-313.
192. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A, International Society for Cellular Therapy. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 7 (5), 393-395.
193. Hosaka Y, Kirisawa R, Yamamoto E, Ueda H, Iwai H, Takehana K. (2002). Localization of cytokines in tendinocytes of the superficial digital flexor tendon in the horse. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 64 (10), 945-947.
194. Hosaka Y, Teraoka H, Yamamoto E, Ueda H, Takehana K. (2005). Mechanism of cell death in inflamed superficial digital flexor tendon in the horse. *Journal of Comparative Pathology*. 132 (1), 51-58.
195. Hsu C, Chang J. (2004). Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *The Journal of Hand Surgery*. 29 (4), 551-563.
196. Huang S, Wang Z. (2010). Influence of platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic differentiation of skeletal muscle satellite cells: An in vitro study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 110 (4), 453-462.
197. Huang S, Wang Z. (2012). Platelet-rich plasma-derived growth factors promote osteogenic differentiation of rat muscle satellite cells: In vitro and in vivo studies. *Cell Biology International*. 36 (12), 1195-1205.
198. Ibrahim S, Saunders K, Kydd JH, Lunn DP, Steinbach F. (2007). Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 119 (1-2), 63-80.
199. Ichiryu N, Fairchild PJ. (2013). Immune privilege of stem cells. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 1029 1-16.
200. Ireland D, Harrall R, Curry V, Holloway G, Hackney R, Hazleman B, Riley G. (2001). Multiple changes in gene expression in chronic human achilles tendinopathy. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 20 (3), 159-169.
201. Isakova IA, Lanclos C, Bruhn J, Kuroda MJ, Baker KC, Krishnappa V, Phinney DG. (2014). Allo-reactivity of mesenchymal stem cells in rhesus macaques is dose and haplotype dependent and limits durable cell engraftment in vivo. *PloS One*. 9 (1), e87238.
202. Ishikawa T, Banas A, Hagiwara K, Iwaguro H, Ochiya T. (2010). Stem cells for hepatic regeneration: The role of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 5 (2), 182-189.
203. Ishimura M, Ohgushi H, Habata T, Tamai S, Fujisawa Y. (1997). Arthroscopic meniscal repair using fibrin glue. part I: Experimental study. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 13 (5), 551-557.

204. Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, Dufour J, Kirijan JC, Bunnell BA. (2005). Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells and Development*. 14 (4), 440-451.
205. Jacobsen E, Dart AJ, Mondori T, Horadogoda N, Jeffcott LB, Little CB, Smith MM. (2015). Focal experimental injury leads to widespread gene expression and histologic changes in equine flexor tendons. *PloS One*. 10 (4), e0122220.
206. Jarvinen TA, Kannus P, Jarvinen TL, Jozsa L, Kalimo H, Jarvinen M. (2000). Tenascin-C in the pathobiology and healing process of musculoskeletal tissue injury. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 10 (6), 376-382.
207. Jelinsky SA, Archambault J, Li L, Seeherman H. (2010). Tendon-selective genes identified from rat and human musculoskeletal tissues. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 28 (3), 289-297.
208. Jelinsky SA, Rodeo SA, Li J, Gulotta LV, Archambault JM, Seeherman HJ. (2011). Regulation of gene expression in human tendinopathy. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 12 86-2474-12-86.
209. Jennische E, Matejka GL. (1992). IGF-I binding and IGF-I expression in regenerating muscle of normal and hypophysectomized rats. *Acta Physiologica Scandinavica*. 146 (1), 79-86.
210. Jepsen KJ, Wu F, Peragallo JH, Paul J, Roberts L, Ezura Y, Oldberg A, Birk DE, Chakravarti S. (2002). A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (38), 35532-35540.
211. Jones GC, Corps AN, Pennington CJ, Clark IM, Edwards DR, Bradley MM, Hazleman BL, Riley GP. (2006). Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human achilles tendon. *Arthritis and Rheumatism*. 54 (3), 832-842.
212. Józsa LG, Kannus P. (1997). Human tendons: anatomy, physiology, and pathology. Human Kinetics Publishers.
213. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplantation*. 6 (2), 125-134.
214. Kang HJ, Kang ES. (1999). Ideal concentration of growth factors in rabbit's flexor tendon culture. *Yonsei Medical Journal*. 40 (1), 26-29.
215. Kang JW, Kang KS, Koo HC, Park JR, Choi EW, Park YH. (2008). Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*. 17 (4), 681-693.
216. Kannus P. (2000). Structure of the tendon connective tissue. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 10 (6), 312-320.
217. Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. (1979). Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood*. 53 (6), 1043-1052.
218. Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S. (2007). Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 25 (11), 2837-2844.
219. Kasashima Y, Takahashi T, Smith RK, Goodship AE, Kuwano A, Ueno T, Hirano S. (2004). Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in japanese thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Veterinary Journal*. 36 (4), 346-350.
220. Kashiwagi K, Mochizuki Y, Yasunaga Y, Ishida O, Deie M, Ochi M. (2004). Effects of transforming growth factor-beta 1 on the early stages of healing of the achilles tendon in a rat model. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery / Nordisk Plastikkirurgisk Forening [and] Nordisk Klubb for Handkirurgi*. 38 (4), 193-197.
221. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 24 (5), 1294-1301.
222. Kersh KD, McClure SR, Van Sickle D, Evans RB. (2006). The evaluation of extracorporeal shock wave therapy on collagenase induced superficial digital flexor tendonitis. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology: V.C.O.T.* 19 (2), 99-105.
223. Kessler PD, Byrne BJ. (1999). Myoblast cell grafting into heart muscle: Cellular biology and potential applications. *Annual Review of Physiology*. 61 219-242.

224. Klass BR, Rolfe KJ, Grobbelaar AO. (2009). In vitro flexor tendon cell response to TGF-beta1: A gene expression study. *The Journal of Hand Surgery*. 34 (3), 495-503.
225. Klein JD, Fauza DO. (2011). Amniotic and placental mesenchymal stem cell isolation and culture. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 698 75-88.
226. Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, Longaker MT, Chang J. (2002). Flexor tendon healing in vitro: Effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. *The Journal of Hand Surgery*. 27 (4), 615-620.
227. Kluter H, Schlenke P, Muller-Steinhardt M, Paulsen M, Kirchner H. (1997). Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion*. 37 (4), 362-367.
228. Knoepfler PS. (2009). Deconstructing stem cell tumorigenicity: A roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* (Dayton, Ohio). 27 (5), 1050-1056.
229. Koch CA, Jordan CE, Platt JL. (2006). Complement-dependent control of teratoma formation by embryonic stem cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 177 (7), 4803-4809.
230. Koch TG, Berg LC, Betts DH. (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.
231. Koerner J, Nescic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP. (2006). Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* (Dayton, Ohio). 24 (6), 1613-1619.
232. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. (2009). Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: A review. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA*. 17 (11), 1289-1297.
233. Kol A, Walker NJ, Galuppo LD, Clark KC, Buerchler S, Bernanke A, Borjesson DL. (2013). Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression. *Equine Veterinary Journal*. 45 (2), 193-198.
234. Komarek J, Valis P, Repko M, Chaloupka R, Krbec M. (2010). Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte transplantation: Long-term results. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae Et Traumatologiae Cechoslovaca*. 77 (4), 291-295.
235. Kon E, Filardo G. (2011). PRP or not PRP? that is the question. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA*. 19 (6), 870-871.
236. Kraushaar BS, Nirschl RP. (1999). Tendinosis of the elbow (tennis elbow). clinical features and findings of histological, immunohistochemical, and electron microscopy studies. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*. 81 (2), 259-278.
237. Kraus-Hansen AE, Fackelman GE, Becker C, Williams RM, Pipers FS. (1992). Preliminary studies on the vascular anatomy of the equine superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*. 24 (1), 46-51.
238. Ksiazek K. (2009). A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Research*. 12 (2), 105-116.
239. Kyrzcz-Krzemien S, Helbig G, Torba K, Koclega A, Krawczyk-Kulis M. (2015). Safety and efficacy of hematopoietic stem cells mobilization in patients with multiple sclerosis. *Hematology* (Amsterdam, Netherlands).
240. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine*. 6 (11), 1229-1234.
241. Lake SP, Ansorge HL, Soslowsky LJ. (2008). Animal models of tendinopathy. *Disability and Rehabilitation*. 30 (20-22), 1530-1541.
242. Lama VN, Smith L, Badri L, Flint A, Andrei AC, Murray S, Wang Z, Liao H, Toews GB, Krebsbach PH, Peters-Golden M, Pinsky DJ, Martinez FJ, Thannickal VJ. (2007). Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *The Journal of Clinical Investigation*. 117 (4), 989-996.
243. Lane JG, Healey RM, Chase DC, Amiel D. (2013). Use of platelet-rich plasma to enhance tendon function and cellularity. *American Journal of Orthopedics* (Belle Mead, N.J.). 42 (5), 209-214.
244. Lange-Consiglio A, Tassan S, Corradetti B, Meucci A, Perego R, Bizzaro D, Cremonesi F. (2013). Investigating the efficacy of amnion-derived compared with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in equine tendon and ligament injuries. *Cytherapy*. 15 (8), 1011-1020.

245. Le Blanc K. (2003). Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 5 (6), 485-489.
246. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* (London, England). 363 (9419), 1439-1441.
247. Lee IC, Wang JH, Lee YT, Young TH. (2007). The differentiation of mesenchymal stem cells by mechanical stress or/and co-culture system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 352 (1), 147-152.
248. Lee JY, Zhou Z, Taub PJ, Ramcharan M, Li Y, Akinbiyi T, Maharam ER, Leong DJ, Laudier DM, Ruike T, Torina PJ, Zaidi M, Majeska RJ, Schaffler MB, Flatow EL, Sun HB. (2011a). BMP-12 treatment of adult mesenchymal stem cells in vitro augments tendon-like tissue formation and defect repair in vivo. *PLoS One*. 6 (3), e17531.
249. Lee WS, Suzuki Y, Graves SS, Iwata M, Venkataraman GM, Mielcarek M, Peterson LJ, Ikehara S, Torok-Storb B, Storb R. (2011b). Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 17 (4), 465-475.
250. Lemire JM, Chan CK, Bressler S, Miller J, LeBaron RG, Wight TN. (2007). Interleukin-1beta selectively decreases the synthesis of versican by arterial smooth muscle cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 101 (3), 753-766.
251. Li Y, Ramcharan M, Zhou Z, Leong DJ, Akinbiyi T, Majeska RJ, Sun HB. (2015). The role of scleraxis in fate determination of mesenchymal stem cells for tenocyte differentiation. *Scientific Reports*. 5 13149.
252. Liao HT, James IB, Marra K, Rubin JP. (2015). The effects of platelet-rich plasma on cell proliferation and adipogenic potential of adipose-derived stem cells. *Tissue Engineering, Part A*.
253. Lindsey RC, Mohan S. (2015). Skeletal effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I therapy. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
254. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. (2007). Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* (Dayton, Ohio). 25 (3), 750-760.
255. Lopez MJ, Jarazo J. (2015). State of the art: Stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Veterinary Journal*. 47 (2), 145-154.
256. Lotz M. (2001). Cytokines in cartilage injury and repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. (391 Suppl) (391 Suppl), S108-15.
257. Lovati AB, Corradetti B, Cremonesi F, Bizzaro D, Consiglio AL. (2012). Tenogenic differentiation of equine mesenchymal progenitor cells under indirect co-culture. *The International Journal of Artificial Organs*. 35 (11), 996-1005.
258. Lundin AC, Aspenberg P, Eliasson P. (2014). Trigger finger, tendinosis, and intratendinous gene expression. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 24 (2), 363-368.
259. Maeda T, Sakabe T, Sunaga A, Sakai K, Rivera AL, Keene DR, Sasaki T, Stavnezer E, Iannotti J, Schweitzer R, Ilic D, Baskaran H, Sakai T. (2011). Conversion of mechanical force into TGF-beta-mediated biochemical signals. *Current Biology: CB*. 21 (11), 933-941.
260. Maffulli N, Barras V, Ewen SW. (2000). Light microscopic histology of achilles tendon ruptures. A comparison with unruptured tendons. *The American Journal of Sports Medicine*. 28 (6), 857-863.
261. Maffulli N, Longo UG, Franceschi F, Rabitti C, Denaro V. (2008). Movin and bonar scores assess the same characteristics of tendon histology. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 466 (7), 1605-1611.
262. Mafi R, Hindocha S, Mafi P, Griffin M, Khan WS. (2011). Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. *The Open Orthopaedics Journal*. 5 Suppl 2 242-248.
263. Maier M, Milz S, Tischer T, Munzing W, Manthey N, Stabler A, Holzknecht N, Weiler C, Nerlich A, Refior HJ, Schmitz C. (2002). Influence of extracorporeal shock-wave application on normal bone in an animal model in vivo. scintigraphy, MRI and histopathology. *The Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*. 84 (4), 592-599.

264. Malaviya P, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Barry FP, Murphy JM, Vogel KG. (2000). An in vivo model for load-modulated remodeling in the rabbit flexor tendon. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society.* 18 (1), 116-125.
265. Mambelli LI, Santos EJ, Frazao PJ, Chaparro MB, Kerkis A, Zoppa AL, Kerkis I. (2009). Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Engineering. Part C, Methods.* 15 (1), 87-94.
266. Manning CN, Havlioglu N, Knutsen E, Sakiyama-Elbert SE, Silva MJ, Thomopoulos S, Gelberman RH. (2014). The early inflammatory response after flexor tendon healing: A gene expression and histological analysis. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society.* 32 (5), 645-652.
267. Marcoux M. (1999). Current techniques in equine surgery and lameness. *The Canadian Veterinary Journal.* 40 (9), 677.
268. Marfe G, Rotta G, De Martino L, Tafani M, Fiorito F, Di Stefano C, Poletti M, Ranalli M, Russo MA, Gambacurta A. (2012). A new clinical approach: Use of blood-derived stem cells (BDSCs) for superficial digital flexor tendon injuries in horses. *Life Sciences.* 90 (21-22), 825-830.
269. Marr CM, McMillan I, Boyd JS, Wright NG, Murray M. (1993). Ultrasonographic and histopathological findings in equine superficial digital flexor tendon injury. *Equine Veterinary Journal.* 25 (1), 23-29.
270. Martin JA, Mehr D, Pardubsky PD, Buckwalter JA. (2003). The role of tenascin-C in adaptation of tendons to compressive loading. *Biorheology.* 40 (1-3), 321-329.
271. Martinello T, Bronzini I, Perazzi A, Testoni S, De Benedictis GM, Negro A, Caporale G, Mascarello F, Iacopetti I, Patruno M. (2013). Effects of in vivo applications of peripheral blood-derived mesenchymal stromal cells (PB-MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on experimentally injured deep digital flexor tendons of sheep. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society.* 31 (2), 306-314.
272. Marx RE. (2004). Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 62 (4), 489-496.
273. Matrisian LM. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology.* 14 (7), 455-463.
274. McCarrel T, Fortier L. (2009). Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society.* 27 (8), 1033-1042.
275. McCarrel TM, Mall NA, Lee AS, Cole BJ, Butty DC, Fortier LA. (2014). Considerations for the use of platelet-rich plasma in orthopedics. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.).* 44 (8), 1025-1036.
276. McClure SR, VanSickle D, Evans R, Reinertson EL, Moran L. (2004). The effects of extracorporeal shock-wave therapy on the ultrasonographic and histologic appearance of collagenase-induced equine forelimb suspensory ligament desmitis. *Ultrasound in Medicine & Biology.* 30 (4), 461-467.
277. McIlwraith CW, Fortier LA, Frisbie DD, Nixon AJ. (2011). Equine models of articular cartilage repair. *Cartilage.* 2 (4), 317-326.
278. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. (2012). The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone & Joint Research.* 1 (11), 297-309.
279. McNeilly CM, Banes AJ, Benjamin M, Ralphs JR. (1996). Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *Journal of Anatomy.* 189 (Pt 3) (Pt 3), 593-600.
280. Mehta S, Watson JT. (2008). Platelet rich concentrate: Basic science and current clinical applications. *Journal of Orthopaedic Trauma.* 22 (6), 432-438.
281. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. (2001). Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet (London, England).* 357 (9252), 279-280.
282. Mendias CL, Gumucio JP, Lynch EB. (2012). Mechanical loading and TGF-beta change the expression of multiple miRNAs in tendon fibroblasts. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985).* 113 (1), 56-62.
283. Mensing N, Gasse H, Hambruch N, Haeger JD, Pfarrer C, Staszky C. (2011). Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Veterinary Research.* 7 42-6148-7-42.

284. Millar NL, Wei AQ, Molloy TJ, Bonar F, Murrell GA. (2009). Cytokines and apoptosis in supraspinatus tendinopathy. *The Journal of Bone and Joint Surgery.British Volume*. 91 (3), 417-424.
285. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 24 (2), 376-385.
286. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. (2003). Matrix cells from wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 21 (1), 50-60.
287. Mizuno K, Muneta T, Morito T, Ichinose S, Koga H, Nimura A, Mochizuki T, Sekiya I. (2008). Exogenous synovial stem cells adhere to defect of meniscus and differentiate into cartilage cells. *Journal of Medical and Dental Sciences*. 55 (1), 101-111.
288. Moller HD, Evans CH, Maffulli N. (2000). Current aspects of tendon healing. *Der Orthopade*. 29 (3), 182-187.
289. Molloy T, Wang Y, Murrell G. (2003a). The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*. 33 (5), 381-394.
290. Molloy T, Wang Y, Murrell G. (2003b). The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*. 33 (5), 381-394.
291. Morcos MB, Aswad A. (1978). Histological studies of the effects of ultrasonic therapy on surgically split flexor tendons. *Equine Veterinary Journal*. 10 (4), 267-268.
292. Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Presta M, Rifkin DB. (1988). Multiple forms of an angiogenesis factor: Basic fibroblast growth factor. *Biochimie*. 70 (1), 83-87.
293. Movin T, Gad A, Reinholt FP, Rolf C. (1997). Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 68 (2), 170-175.
294. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*. 113 (Pt 7), 1161-1166.
295. Murphy DJ, Nixon AJ. (1997). Biochemical and site-specific effects of insulin-like growth factor I on intrinsic tenocyte activity in equine flexor tendons. *American Journal of Veterinary Research*. 58 (1), 103-109.
296. Musaro A. (2005). Growth factor enhancement of muscle regeneration: A central role of IGF-1. *Archives Italiennes De Biologie*. 143 (3-4), 243-248.
297. Muttini A, Russo V, Rossi E, Mattioli M, Barboni B, Tosi U, Maffulli N, Valbonetti L, Abate M. (2015). Pilot experimental study on amniotic epithelial mesenchymal cell transplantation in natural occurring tendinopathy in horses. ultrasonographic and histological comparison. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. 5 (1), 5-11.
298. Nagase H, Woessner JF, Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (31), 21491-21494.
299. Nauth A, Giannoudis PV, Einhorn TA, Hankenson KD, Friedlaender GE, Li R, Schemitsch EH. (2010). Growth factors: Beyond bone morphogenetic proteins. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 24 (9), 543-546.
300. Nazari-Shafti TZ, Bruno IG, Martinez RF, Coleman ME, Alt EU, McClure SR. (2015). High yield recovery of equine mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix/Wharton's jelly using a semi-automated process. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 1235 131-146.
301. Nicpon J, Marycz K, Grzesiak J. (2013). Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cell injection in horses suffering from bone spavin. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 16 (4), 753-754.
302. Nimni ME. (1997). Polypeptide growth factors: Targeted delivery systems. *Biomaterials*. 18 (18), 1201-1225.
303. Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. (2008a). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *American Journal of Veterinary Research*. 69 (7), 928-937.
304. Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. (2008b). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *American Journal of Veterinary Research*. 69 (7), 928-937.
305. Nobert KM. (2011). The regulation of veterinary regenerative medicine and the potential impact of such regulation on clinicians and firms commercializing these treatments. *The Veterinary Clinics of North America.Equine Practice*. 27 (2), 383-391.

306. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 8 (2), 166-177.
307. O'Meara B, Bladon B, Parkin TD, Fraser B, Lischer CJ. (2010). An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the thoroughbred racehorse. *Equine Veterinary Journal*. 42 (4), 322-326.
308. Oryan A, Goodship AE, Silver IA. (2008). Response of a collagenase-induced tendon injury to treatment with a polysulphated glycosaminoglycan (adequan). *Connective Tissue Research*. 49 (5), 351-360.
309. Oshiro W, Lou J, Xing X, Tu Y, Manske PR. (2003). Flexor tendon healing in the rat: A histologic and gene expression study. *The Journal of Hand Surgery*. 28 (5), 814-823.
310. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M. (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.
311. Palmer SE, Genovese R, Longo KL, Goodman N, Dyson S. (1994). Practical management of superficial digital flexor tendinitis in the performance horse. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 10 (2), 425-481.
312. Paoloni J, De Vos RJ, Hamilton B, Murrell GA, Orchard J. (2011). Platelet-rich plasma treatment for ligament and tendon injuries. *Clinical Journal of Sport Medicine: Official Journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. 21 (1), 37-45.
313. Parkinson J, Samiric T, Ilic MZ, Cook J, Feller JA, Handley CJ. (2010). Change in proteoglycan metabolism is a characteristic of human patellar tendinopathy. *Arthritis and Rheumatism*. 62 (10), 3028-3035.
314. Parry DA, Craig AS. (1977). Quantitative electron microscope observations of the collagen fibrils in rat-tail tendon. *Biopolymers*. 16 (5), 1015-1031.
315. Pascucci L, Curina G, Mercati F, Marini C, Dall'Aglio C, Paternesi B, Ceccarelli P. (2011). Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: Towards the definition of minimal stemness criteria. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 144 (3-4), 499-506.
316. Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P. (2008). Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*. 56 (1), 1-8.
317. Patterson-Kane JC, Wilson AM, Firth EC, Parry DA, Goodship AE. (1997). Comparison of collagen fibril populations in the superficial digital flexor tendons of exercised and nonexercised thoroughbreds. *Equine Veterinary Journal*. 29 (2), 121-125.
318. Patterson-Kane JC, Firth EC. (2009). The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in thoroughbred racehorses. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. 181 (2), 79-89.
319. Pearce CJ, Ismail M, Calder JD. (2009). Is apoptosis the cause of noninsertional achilles tendinopathy? *The American Journal of Sports Medicine*. 37 (12), 2440-2444.
320. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92 (11), 4857-4861.
321. Perez-Castro AV, Vogel KG. (1999). In situ expression of collagen and proteoglycan genes during development of fibrocartilage in bovine deep flexor tendon. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 17 (1), 139-148.
322. Peroni JF, Borjesson DL. (2011). Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 27 (2), 351-362.
323. Petersen W, Pufe T, Zantop T, Tillmann B, Tsokos M, Mentlein R. (2004). Expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 in degenerative achilles tendons. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. (420) (420), 286-291.
324. Pezzanite LM, Fortier LA, Antczak DF, Cassano JM, Brosnahan MM, Miller D, Schnabel LV. (2015). Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. *Stem Cell Research & Therapy*. 6 54-015-0053-x.

325. Picinich SC, Mishra PJ, Mishra PJ, Glod J, Banerjee D. (2007). The therapeutic potential of mesenchymal stem cells. cell- & tissue-based therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 7 (7), 965-973.
326. Pigott JH, Ishihara A, Wellman ML, Russell DS, Bertone AL. (2013). Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 156 (1-2), 99-106.
327. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (New York, N.Y.). 284 (5411), 143-147.
328. Prockop DJ. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* (New York, N.Y.). 276 (5309), 71-74.
329. Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN. (2005a). The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 15 (4), 211-222.
330. Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN. (2005b). The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 15 (4), 211-222.
331. Rada JA, Cornuet PK, Hassell JR. (1993). Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Experimental Eye Research*. 56 (6), 635-648.
332. Radcliffe CH, Flaminio MJ, Fortier LA. (2010). Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells and Development*. 19 (2), 269-282.
333. Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vazquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martin-Burriel I. (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 (1-2), 147-154.
334. Rantanen NW, McKinnon AO. (1998). *Equine diagnostic ultrasonography*. Williams & Wilkins.
335. Rantanen N, Jorgensen J, Genovese R. (2003). *Ultrasonographic evaluation of the equine limb: Technique. Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Saunders, Philadelphia, USA. 166-188.
336. Reed GL. (2002). Platelet secretion. *Platelets*. 2 309-318.
337. Reef VB, Genovese RL, Davis WM. (1997) Initial long term results of horses with superficial digital flexor tendonitis treated with intralesional beta-aminopropionitrile fumarate. *Proc. Am. Ass. equine Practnrs*.
338. Rees JD, Maffulli N, Cook J. (2009). Management of tendinopathy. *The American Journal of Sports Medicine*. 37 (9), 1855-1867.
339. Rees JD, Stride M, Scott A. (2014). Tendons--time to revisit inflammation. *British Journal of Sports Medicine*. 48 (21), 1553-1557.
340. Rees SG, Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B, Dent CM. (2000). Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. *The Biochemical Journal*. 350 Pt 1 181-188.
341. Rees SG, Waggett AD, Dent CM, Caterson B. (2007). Inhibition of aggrecan turnover in short-term explant cultures of bovine tendon. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 26 (4), 280-290.
342. Rees SG, Waggett AD, Kerr BC, Probert J, Gealy EC, Dent CM, Caterson B, Hughes CE. (2009). Immunolocalisation and expression of keratocan in tendon. *Osteoarthritis and Cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 17 (2), 276-279.
343. Remacha AR, Barrachina L, Alvarez-Arguedas S, Ranera B, Romero A, Vazquez FJ, Zaragoza P, Yanez R, Martin-Burriel I, Rodellar C. (2015). Expression of genes involved in immune response and in vitro immuno-suppressive effect of equine MSCs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 165 (3-4), 107-118.
344. Rendu F, Brohard-Bohn B. (2001). The platelet release reaction: Granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 12 (5), 261-273.
345. Ricco S, Renzi S, Del Bue M, Conti V, Merli E, Ramoni R, Lucarelli E, Gnudi G, Ferrari M, Grolli S. (2013). Allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in combination with platelet rich plasma are safe and effective in the therapy of superficial digital flexor tendonitis in the horse. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 26 (1 Suppl), 61-68.

346. Riemersma DJ, Schamhardt HC, Hartman W, Lammertink JL. (1988). Kinetics and kinematics of the equine hind limb: In vivo tendon loads and force plate measurements in ponies. *American Journal of Veterinary Research*. 49 (8), 1344-1352.
347. Riley G. (2008). Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*. 4 (2), 82-89.
348. Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. (1994). Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: Changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 53 (6), 367-376.
349. Riley GP, Curry V, DeGroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, Bank RA. (2002). Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 21 (2), 185-195.
350. Riley GP. (2005). Gene expression and matrix turnover in overused and damaged tendons. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 15 (4), 241-251.
351. Rios DL, Lopez C, Alvarez ME, Samudio IJ, Carmona JU. (2015). Effects over time of two platelet gel supernatants on growth factor, cytokine and hyaluronan concentrations in normal synovial membrane explants challenged with lipopolysaccharide. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 16 153-015-0605-3.
352. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH. (1986). Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83 (12), 4167-4171.
353. Robinson NE, Causa MDH, Sprayberry KA. (1998). Current therapy in equine medicine. *Journal of veterinary medical education*. 25 32-32.
354. Robinson SN, Simmons PJ, Yang H, Alousi AM, Marcos de Lima J, Shpall EJ. (2011). Mesenchymal stem cells in ex vivo cord blood expansion. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. 24 (1), 83-92.
355. Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, Stagg J, Galipeau J. (2007). Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 179 (3), 1549-1558.
356. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. (1986). The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 46 (2), 155-169.
357. Rucklidge GJ, Milne G, Robins SP. (1996). Collagen type X: A component of the surface of normal human, pig, and rat articular cartilage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 224 (2), 297-302.
358. Saito T, Dennis JE, Lennon DP, Young RG, Caplan AI. (1995). Myogenic expression of mesenchymal stem cells within myotubes of mdx mice in vitro and in vivo. *Tissue Engineering*. 1 (4), 327-343.
359. Sakiyama-Elbert SE, Das R, Gelberman RH, Harwood F, Amiel D, Thomopoulos S. (2008). Controlled-release kinetics and biologic activity of platelet-derived growth factor-BB for use in flexor tendon repair. *The Journal of Hand Surgery*. 33 (9), 1548-1557.
360. Samiric T, Ilic MZ, Handley CJ. (2004). Characterisation of proteoglycans and their catabolic products in tendon and explant cultures of tendon. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 23 (2), 127-140.
361. Samiric T, Parkinson J, Ilic MZ, Cook J, Feller JA, Handley CJ. (2009). Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 28 (4), 230-236.
362. Sanchez M, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I. (2003). Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: A case report. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 35 (10), 1648-1652.
363. Sanchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. (2009). Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*. 39 (5), 345-354.
364. Sarkar K, Uthoff HK. (1980). Ultrastructure of the common extensor tendon in tennis elbow. *Virchows Archiv.A, Pathological Anatomy and Histology*. 386 (3), 317-330.
365. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, Fortier LA. (2007). Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 25 (2), 230-240.

366. Schnabel LV, Sonea HO, Jacobson MS, Fortier LA. (2008). Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures. *Equine Veterinary Journal*. 40 (3), 260-265.
367. Schnabel LV, Lynch ME, van der Meulen MC, Yeager AE, Kornatowski MA, Nixon AJ. (2009). Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 27 (10), 1392-1398.
368. Schnabel LV, Fortier LA, McIlwraith CW, Nobert KM. (2013). Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *Veterinary Journal* (London, England: 1997). 197 (3), 570-577.
369. Schnabel LV, Pezzanite LM, Antczak DF, Felipe MJ, Fortier LA. (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 Research & Therapy*. 5 (1), 13.
370. Schuh JC, Ross C, Meschter C. (1988). Concurrent mercuric blister and dimethyl sulphoxide (DMSO) application as a cause of mercury toxicity in two horses. *Equine Veterinary Journal*. 20 (1), 68-71.
371. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. (2005). Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell and Tissue Research*. 320 (2), 269-276.
372. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* (New York, N.Y.). 219 (4587), 983-985.
373. Shalaby MR, Ammann AJ. (1988). Suppression of immune cell function in vitro by recombinant human transforming growth factor-beta. *Cellular Immunology*. 112 (2), 343-350.
374. Sharma P, Maffulli N. (2006). Biology of tendon injury: Healing, modeling and remodeling. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 6 (2), 181-190.
375. Shelbourne KD, Jari S, Gray T. (2003). Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: A natural history study. *The Journal of Bone and Joint Surgery.American Volume*. 85-A Suppl 2 8-16.
376. Shukunami C, Takimoto A, Oro M, Hiraki Y. (2006). Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Developmental Biology*. 298 (1), 234-247.
377. Smith R, Goodship A. (2004). Tendon and ligament physiology. *Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and Clinical Sciences of the Equine Athlete*. Elsevier Limited, Philadelphia, USA. 130-151.
378. Smith R, Davis C. (2006). Diagnosis and management of tendon and ligament disorders. *Equine Surgery*. 1089 98-107.
379. Smith JJ, Ross MW, Smith RK. (2006). Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology: V.C.O.T.* 19 (1), 43-47.
380. Smith RK, Zunino L, Webbon PM, Heinegard D. (1997). The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 16 (5), 255-271.
381. Smith RK, Birch H, Patterson-Kane J, Firth EC, Williams L, Cherdchutham W, van Weeren WR, Goodship AE. (1999). Should equine athletes commence training during skeletal development?: Changes in tendon matrix associated with development, ageing, function and exercise. *Equine Veterinary Journal. Supplement*. (30) (30), 201-209.
382. Smith RK, Birch HL, Goodman S, Heinegard D, Goodship AE. (2002a). The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration--hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*. 133 (4), 1039-1050.
383. Smith RK, Birch HL, Goodman S, Heinegard D, Goodship AE. (2002b). The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration--hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*. 133 (4), 1039-1050.
384. Smith RK, Gerard M, Dowling B, Dart AJ, Birch HL, Goodship AE. (2002c). Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: A proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons. *Equine Veterinary Journal. Supplement*. (34) (34), 241-244.

385. Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE. (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.
386. Smith RK, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. (2013). Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PloS One*. 8 (9), e75697.
387. Solursh M. (1991). Formation of cartilage tissue in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*. 45 (3), 258-260.
388. Sotiropoulou PA, Papamichail M. (2007). Immune properties of mesenchymal stem cells. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 407 225-243.
389. Souza MV, van Weeren PR, van Schie HT, van de Lest CH. (2010). Regional differences in biochemical, biomechanical and histomorphological characteristics of the equine suspensory ligament. *Equine Veterinary Journal*. 42 (7), 611-620.
390. Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW, Ross R. (1987). Effects of growth factors in vivo. I. cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. *The American Journal of Pathology*. 129 (3), 601-613.
391. Spurlock SL, Spurlock GH, Bernstad S, Michanek P, Chester ST. (1999). Treatment of acute superficial flexor tendon injuries in performance horses with high molecular weight sodium hyaluronate. *Journal of Equine Veterinary Science*. 19 (5), 338-344.
392. Stack G, Snyder EL. (1994). Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion*. 34 (1), 20-25.
393. Stewart AA, Byron CR, Ponden HC, Stewart MC. (2008). Effect of dexamethasone supplementation on chondrogenesis of equine mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*. 69 (8), 1013-1021.
394. Sun HB, Li Y, Fung DT, Majeska RJ, Schaffler MB, Flatow EL. (2008). Coordinate regulation of IL-1beta and MMP-13 in rat tendons following subrupture fatigue damage. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 466 (7), 1555-1561.
395. Suwalski A, Dabboue H, Delalande A, Bensamoun SF, Canon F, Midoux P, Saillant G, Klatzmann D, Salvétat JP, Pichon C. (2010). Accelerated achilles tendon healing by PDGF gene delivery with mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials*. 31 (19), 5237-5245.
396. Svensson L, Aszodi A, Reinholt FP, Fassler R, Heinegard D, Oldberg A. (1999). Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (14), 9636-9647.
397. Takenaka K. (2015). Xenotransplantation assay for cancer stem cells. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*. 73 (5), 756-764.
398. Tan SC, Chan O. (2008). Achilles and patellar tendinopathy: Current understanding of pathophysiology and management. *Disability and Rehabilitation*. 30 (20-22), 1608-1615.
399. Taylor SE, Vaughan-Thomas A, Clements DN, Pinchbeck G, Macrory LC, Smith RK, Clegg PD. (2009). Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 10 27-2474-10-27.
400. Taylor SE, Clegg PD. (2011). Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 27 (2), 263-274.
401. Thomopoulos S, Williams GR, Gimbel JA, Favata M, Soslowsky LJ. (2003). Variation of biomechanical, structural, and compositional properties along the tendon to bone insertion site. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 21 (3), 413-419.
402. Thomopoulos S, Das R, Silva MJ, Sakiyama-Elbert S, Harwood FL, Zampiak E, Kim HM, Amiel D, Gelberman RH. (2009). Enhanced flexor tendon healing through controlled delivery of PDGF-BB. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 27 (9), 1209-1215.
403. Thomopoulos S, Kim HM, Das R, Silva MJ, Sakiyama-Elbert S, Amiel D, Gelberman RH. (2010). The effects of exogenous basic fibroblast growth factor on intrasynovial flexor tendon healing in a canine model. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*. 92 (13), 2285-2293.
404. Thomopoulos S, Parks WC, Rifkin DB, Derwin KA. (2015). Mechanisms of tendon injury and repair. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 33 (6), 832-839.
405. Thorpe CT, Clegg PD, Birch HL. (2010). A review of tendon injury: Why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine Veterinary Journal*. 42 (2), 174-180.

406. Thorpe CT, Chaudhry S, Lei II, Varone A, Riley GP, Birch HL, Clegg PD, Screen HR. (2015). Tendon overload results in alterations in cell shape and increased markers of inflammation and matrix degradation. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 25 (4), e381-91.
407. Tins BJ, McCall IW, Takahashi T, Cassar-Pullicino V, Roberts S, Ashton B, Richardson J. (2005). Autologous chondrocyte implantation in knee joint: MR imaging and histologic features at 1-year follow-up. *Radiology*. 234 (2), 501-508.
408. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 105 (1), 93-98.
409. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology*. 3 (9), 778-784.
410. Toupadakis CA, Wong A, Genetos DC, Cheung WK, Borjesson DL, Ferraro GL, Galuppo LD, Leach JK, Owens SD, Yellowley CE. (2010). Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *American Journal of Veterinary Research*. 71 (10), 1237-1245.
411. Trebault A, Chan EK, Midwood KS. (2007). Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochemical Society Transactions*. 35 (Pt 4), 695-697.
412. Trippel SB. (1998). Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. (355 Suppl) (355 Suppl), S301-13.
413. Tyndall A, Walker UA, Cope A, Dazzi F, De Bari C, Fibbe W, Guiducci S, Jones S, Jorgensen C, Le Blanc K, Luyten F, McGonagle D, Martin I, Bocelli-Tyndall C, Pennesi G, Pistoia V, Pitzalis C, Uccelli A, Wulffraat N, Feldmann M. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: A review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology division, London, UK, 31 October 2005. *Arthritis Research & Therapy*. 9 (1), 301.
414. U Carmona J, Lopez C, A Sandoval J. (2013). Review of the currently available systems to obtain platelet related products to treat equine musculoskeletal injuries. *Recent Patents on Regenerative Medicine*. 3 (2), 148-159.
415. Van Loon VJ, Scheffer CJ, Genn HJ, Hoogendoorn AC, Greve JW. (2014). Clinical follow-up of horses treated with allogeneic equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for different tendon and ligament disorders. *The Veterinary Quarterly*. 34 (2), 92-97.
416. Vaughan LC, Edwards GB, Gerring EL. (1985). Tendon injuries in horses treated with carbon fibre implants. *Equine Veterinary Journal*. 17 (1), 45-50.
417. Verfaillie CM. (2002). Adult stem cells: Assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology*. 12 (11), 502-508.
418. Vidal MA, Kilroy GE, Johnson JR, Lopez MJ, Moore RM, Gimble JM. (2006). Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity. *Veterinary Surgery: VS*. 35 (7), 601-610.
419. Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. (2007). Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary Surgery: VS*. 36 (7), 613-622.
420. Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. (2008). Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Surgery: VS*. 37 (8), 713-724.
421. Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. (2009). Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biology*. 10 29-2121-10-29.
422. Vogel KG, Hernandez DJ. (1992). The effects of transforming growth factor-beta and serum on proteoglycan synthesis by tendon fibrocartilage. *European Journal of Cell Biology*. 59 (2), 304-313.
423. Voleti PB, Buckley MR, Soslowsky LJ. (2012). Tendon healing: Repair and regeneration. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 14 47-71.
424. Vyas P, Appelbaum FR, Craddock C. (2015). Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 21 (1), 8-15.

425. Wadhwa M, Seghatchian MJ, Lubenko A, Contreras M, Dilger P, Bird C, Thorpe R. (1996). Cytokine levels in platelet concentrates: Quantitation by bioassays and immunoassays. *British Journal of Haematology*. 93 (1), 225-234.
426. Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. (1998). Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human achilles tendon. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 16 (8), 457-470.
427. Wang H, Pang B, Li Y, Zhu D, Pang T, Liu Y. (2012). Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 14 (4), 423-430.
428. Wang JH. (2006). Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomechanics*. 39 (9), 1563-1582.
429. Waselau M, Sutter WW, Genovese RL, Bertone AL. (2008). Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in standardbred racehorses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 232 (10), 1515-1520.
430. Watanabe T, Imamura Y, Hosaka Y, Ueda H, Takehana K. (2007). Graded arrangement of collagen fibrils in the equine superficial digital flexor tendon. *Connective Tissue Research*. 48 (6), 332-337.
431. Watts AE, Yeager AE, Kopyov OV, Nixon AJ. (2011a). Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model. *Stem Cell Research & Therapy*. 2 (1), 4.
432. Watts AE, Yeager AE, Kopyov OV, Nixon AJ. (2011b). Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model. *Stem Cell Research & Therapy*. 2 (1), 4.
433. Watts AE, Nixon AJ, Yeager AE, Mohammed HO. (2012). A collagenase gel/physical defect model for controlled induction of superficial digital flexor tendonitis. *Equine Veterinary Journal*. 44 (5), 576-586.
434. Webbon PM. (1978). A histological study of macroscopically normal equine digital flexor tendons. *Equine Veterinary Journal*. 10 (4), 253-259.
435. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. (2001). Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 17 387-403.
436. White NA, Moore JN. (1998). Current techniques in equine surgery and lameness. WB Saunders.
437. Williams IF, McCullagh KG, Goodship AE, Silver IA. (1984). Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. *Research in Veterinary Science*. 36 (3), 326-338.
438. Williams LB, Koenig JB, Black B, Gibson TW, Sharif S, Koch TG. (2015). Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an LPS induced synovitis model. *Equine Veterinary Journal*.
439. Xu Y, Malladi P, Chiou M, Bekerman E, Giaccia AJ, Longaker MT. (2007). In vitro expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis. *Tissue Engineering*. 13 (12), 2981-2993.
440. Xu Y, Murrell GA. (2008). The basic science of tendinopathy. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 466 (7), 1528-1538.
441. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 24 (11), 2582-2591.
442. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. (1998). Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 16 (4), 406-413.
443. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frasson F, Mancardi G, Uccelli A. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 106 (5), 1755-1761.
444. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. (2006). Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 24 (11), 2412-2419.
445. Zhang F, Liu H, Stile F, Lei MP, Pang Y, Oswald TM, Beck J, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC. (2003). Effect of vascular endothelial growth factor on rat achilles tendon healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 112 (6), 1613-1619.
446. Zhang J, La X, Fan L, Li P, Yu Y, Huang Y, Ding J, Xing Y. (2015). Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell transplantation in rat burn models. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 8 (5), 5129-5136.

- 447. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*. 7 (2), 211-228.
- 448. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Research*. 2 (6), 477-488.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Expresión marcadores de superficie en BM-MSCs y AT-MSCs

Muestras	b2m	GAPDH	FN	CD29_Nor	CD44_Nor	CD90_Nor
BMQ8	0,41755273	0,4881295	0,45146407	0,92488585	0,58306102	0,11804001
BMQ11	0,2058816	0,17113571	0,1877064	1,09682778	1,01823166	0,06617044
BMQ13	0,51145343	0,73068974	0,61132133	0,83663599	0,61795858	0,18346096
BMQ14	0,64254179	0,85398329	0,74075633	0,86741315	0,88714211	0,49681441
BMQ15	0,43833921	1	0,6620719	0,6620719	0,61049429	0,62984921
BMQ16	0,69648523	0,53746272	0,6118291	1,13836565	0,78134805	0,42948274
BMQ17	1	0,96537383	0,98253439	1,01777608	0,76156318	0,28385585
BMQ22	0,83870916	0,52371039	0,66275237	1,26549403	0,85458414	0,26064529
BMQ23	0,21013713	0,33208096	0,26416385	0,79548026	0,63231593	0,63252579
FTQ9	0,58516886	0,49394616	0,53762618	1,08843074	1,03444485	0,76973444
FTQ11	0,38982582	0,84464236	0,57381478	0,67935828	1,30766451	0,78667315
FTQ15	0,85061978	0,65700237	0,74756887	1,13784805	1,3376694	1,15953071
FTQ16	0,17240926	0,17796654	0,17516586	0,98426291	1,48602937	1,36325535
FTQ17	0,31408428	0,35604885	0,33440895	0,93922211	1,76770844	1,13783902
FTQ22	0,5081475	0,26788074	0,36894841	1,37728606	2,24375107	2,71040603
FTQ23	0,87728828	0,30893722	0,52060254	1,68514023	1,47543079	0,77533549

Muestras	CD34-Nor	CD45-Nor	CD105_Nor	CD49d_Nor	CD73_Nor	CD166_Nor
BMQ8	0	0	0,54423947	0,23343943	0,47433864	0,67024967
BMQ11	0	0	1,1570943	0,1474146	1,16578369	0,88890139
BMQ13	0	0	0,85503393	0,31362079	0,92841352	1,13917563
BMQ14	0	0	0,49172985	0,35589849	0,63593428	0,99018123
BMQ15	0	0	0,85487229	1,51040996	0,96907706	0,78593039
BMQ16	0	0	1,18290825	0,39430995	0,93084701	0,92165911
BMQ17	0	0	1,01777608	0,26829844	1,01777608	1,01777608
BMQ22	0	0	1,01873795	0,3094355	0,86311822	0,65195356
BMQ23	0	0	1,40000192	0,97203279	1,31210995	1,79247179
FTQ9	0,33961066	0	0,32865714	0,16823044	0,58729091	0,38689665
FTQ11	0,00662828	0	0,20951726	0,54849619	0,75238817	0,78391047
FTQ15	0,34267892	0	0,62016511	0,19645403	1,04704557	1,1225595
FTQ16	0,42541168	0	0,96340651	0,13348446	0,92415553	0,42674897
FTQ17	0,52591611	0	1,2626797	0,2913265	1,29411291	1,30843147
FTQ22	2,18550675	0	1,30676842	0,24044121	2,34958296	0,94964917
FTQ23	1,92085119	0	1,0760473	0,39919753	1,52606212	0,54479559

Muestras	CD146_Norm	CD106_Norm	CD13_Norm	CD31_Norm
BMQ8	0,0413909	0,003673	0,13681512	0
BMQ11	0,04758647	0,03318282	0,46749683	0
BMQ13	0,04545103	0,001789	0,00645236	0
BMQ14	0,95833215	0,00050182	1,34997158	0
BMQ15	0,36704079	0,00447625	1,03939785	0
BMQ16	0,13090735	0,00572009	0,02264963	0
BMQ17	0,17834421	0,00260486	0,00312525	0
BMQ22	0,08153472	0,0176866	0,05803643	0
BMQ23	0,27422344	0,05394114	0,35340875	0
FTQ9	0,30338718	0,01485434	0,14612482	0
FTQ11	1,74272262	0,00137521	0,03727523	0
FTQ15	0,29196656	0,00241863	0,02335171	0
FTQ16	0,10144573	3,75061553	0,09096878	0
FTQ17	0,26798559	1,49284852	0	0
FTQ22	1,15878286	2,71040603	0,08441735	0
FTQ23	0,33051818	1,76041793	0,07761468	0

ANEXO 2. Datos puntuación total parámetros ecográficos de cada extremidad en cada uno de los tiempos medidos

ANIMAL	Tratamiento	extremidad	TES-sem 0	FPS-sem 0	CSA-sem 0
Lobo	Células BM	AI	12	10	35
Lobo	RL	AD	11	12	47
Bizco	Células BM	AD	10	12	47
Bizco	RL	AI	11	9	37
Pastor	Células BM	AD	11	10	35
Pastor	RL	AI	10	9	40
Jerezano	Células BM	AI	12	12	35
Jerezano	PRP	AD	12	12	63
Lucky	Células BM	AI	12	10	28
Lucky	PRP	AD	12	11	66
Toscan	Células BM	AI	12	12	70
Toscan	PRP	AD	9	10	60
Malacatón	Células AT	AI	9	10	51
Malacatón	RL	AD	12	12	55
Espabil	Células AT	AD	9	9	50
Espabil	RL	AI	4	3	45
Perico	Células AT	AI	12	12	40
Perico	RL	AD	10	9	30
Bárbaro	Células AT	AI	12	12	70
Bárbaro	PRP	AD	12	12	70
Totías	Células AT	AD	12	12	22
Totías	PRP	AI	12	10	25
Néctar	Células AT	AD	10	11	72
Néctar	PRP	AI	9	10	75

ANIMAL	Tratamiento	extremidad	TES-sem2	FPS-sem2	CSA-sem2
Lobo	Células BM	AI	11	10	41
Lobo	RL	AD	11	12	47
Bizco	Células BM	AD	9	12	40
Bizco	RL	AI	10	9	35
Pastor	Células BM	AD	11	10	35
Pastor	RL	AI	10	9	40
Jerezano	Células BM	AI	10	12	35
Jerezano	PRP	AD	10	12	63
Lucky	Células BM	AI	9	9	28
Lucky	PRP	AD	10	11	56
Toscan	Células BM	AI	9	10	60
Toscan	PRP	AD	10	10	58
Malacatón	Células AT	AI	10	10	45
Malacatón	RL	AD	12	12	43
Espabil	Células AT	AD	9	10	42
Espabil	RL	AI	8	6	45
Perico	Células AT	AI	10	12	44
Perico	RL	AD	9	9	65
Bárbaro	Células AT	AI	10	10	60
Bárbaro	PRP	AD	10	12	63
Totías	Células AT	AD	11	10	32
Totías	PRP	AI	10	10	25
Néctar	Células AT	AD	8	11	67
Néctar	PRP	AI	9	10	70

ANIMAL	Tratamiento	extremidad	TES-sem6	FPS-sem6	CSA-sem6
Lobo	Células BM	AI	9	9	35
Lobo	RL	AD	10	12	39
Bizco	Células BM	AD	9	12	39
Bizco	RL	AI	9	9	37
Pastor	Células BM	AD	9	8	35
Pastor	RL	AI	10	9	40
Jerezano	Células BM	AI	9	10	29
Jerezano	PRP	AD	9	10	55
Lucky	Células BM	AI	9	9	28
Lucky	PRP	AD	10	11	63
Toscan	Células BM	AI	7	10	52
Toscan	PRP	AD	9	10	55
Malacatón	Células AT	AI	9	10	45
Malacatón	RL	AD	11	12	43
Espabil	Células AT	AD	9	9	42
Espabil	RL	AI	8	6	45
Perico	Células AT	AI	9	12	36
Perico	RL	AD	9	9	60
Bárbaro	Células AT	AI	10	9	60
Bárbaro	PRP	AD	10	12	60
Totías	Células AT	AD	10	10	32
Totías	PRP	AI	8	10	27
Néctar	Células AT	AD	9	11	61
Néctar	PRP	AI	9	10	66

ANIMAL	Tratamiento	extremidad	TES-sem10	FPS-sem10	CSA-sem10
Lobo	RL	AD	10	12	36
Bizco	Células BM	AD	8	10	33
Bizco	RL	AI	9	9	30
Pastor	Células BM	AD	7	8	33
Pastor	RL	AI	8	9	40
Jerezano	Células BM	AI	8	8	29
Jerezano	PRP	AD	7	9	43
Lucky	Células BM	AI	7	9	26
Lucky	PRP	AD	8	9	52
Toscan	Células BM	AI	7	9	46
Toscan	PRP	AD	8	10	48
Malacatón	Células AT	AI	7	8	43
Malacatón	RL	AD	11	10	43
Espabil	Células AT	AD	7	9	38
Espabil	RL	AI	8	7	42
Perico	Células AT	AI	7	8	32
Perico	RL	AD	7	8	60
Bárbaro	Células AT	AI	8	9	42
Bárbaro	PRP	AD	9	8	50
Totías	Células AT	AD	6	8	27
Lobo	Células BM	AI	8	9	29
Totías	PRP	AI	5	9	26
Néctar	Células AT	AD	7	9	54
Néctar	PRP	AI	7	8	62

ANIMAL	Tratamiento	extremidad	TES -sem20	FPS -sem20	CSA -sem20
Lobo	Células BM	AI	4	7	25
Lobo	RL	AD	4	8	30
Bizco	Células BM	AD	4	8	33
Bizco	RL	AI	8	7	30
Pastor	Células BM	AD	3	6	24
Pastor	RL	AI	6	7	35
Jerezano	Células BM	AI	6	4	25
Jerezano	PRP	AD	5	7	33
Lucky	Células BM	AI	5	5	17
Lucky	PRP	AD	3	9	32
Toscan	Células BM	AI	3	9	39
Toscan	PRP	AD	4	9	40
Malacatón	Células AT	AI	5	8	40
Malacatón	RL	AD	8	9	48
Espabil	Células AT	AD	4	7	38
Espabil	RL	AI	6	7	42
Perico	Células AT	AI	5	8	32
Perico	RL	AD	7	7	60
Bárbaro	Células AT	AI	5	7	31
Bárbaro	PRP	AD	5	6	37
Totías	Células AT	AD	4	7	18
Totías	PRP	AI	4	6	25
Néctar	Células AT	AD	6	5	48
Néctar	PRP	AI	7	6	55

ANIMAL	Tratamiento	extremidad	TES- sem 45	FPS -sem45	CSA- sem45
Lobo	Células BM	AI	2	5	16
Lobo	RL	AD	1	3	17
Bizco	Células BM	AD	4	8	35
Bizco	RL	AI	1	5	17
Pastor	Células BM	AD	2	5	10
Pastor	RL	AI	3	7	20
Jerezano	Células BM	AI	2	3	13
Jerezano	PRP	AD	1	4	21
Lucky	Células BM	AI	1	3	10
Lucky	PRP	AD	2	7	22
Toscan	Células BM	AI	2	6	30
Toscan	PRP	AD	2	5	23
Malacatón	Células AT	AI	6	7	43
Malacatón	RL	AD	5	7	50
Espabil	Células AT	AD	3	5	30
Espabil	RL	AI	5	6	35
Perico	Células AT	AI	5	7	21
Perico	RL	AD	8	6	60
Bárbaro	Células AT	AI	3	5	16
Bárbaro	PRP	AD	3	5	27
Totías	Células AT	AD	4	4	15
Totías	PRP	AI	5	4	23
Néctar	Células AT	AD	5	5	46
Néctar	PRP	AI	6	5	60

ANEXO 3. Datos puntuación total parámetros histológicos de cada extremidad

Caballo	extremidad	Tratamiento	CN-TOTAL	CO-TOTAL	GS-TOTAL	TM-TOTAL	V-TOTAL
BÁRBARO	AI	PRP	8	7	17	7	9
BÁRBARO	AD	Células AT	16	15	30	8	19
BIZCO	AD	Células BM	17	12	32	19	15
BIZCO	AI	RL	20	19	31	26	24
ESPABIL	AD	Células AT	18	7	15	22	24
ESPABIL	AI	RL	26	30	31	26	34
JEREZANO	AI	PRP	23	8	0	12	20
JEREZANO	AD	Células BM	1	0	0	1	5
LOBO	AI	RL	15	17	32	15	6
LOBO	AD	Células BM	10	4	11	9	11
LUCKY	AI	PRP	10	2	3	4	26
LUCKY	AD	Células BM	11	2	7	8	10
MALACATÓN	AI	RL	8	4	3	6	6
MALACATÓN	AD	Células AT	3	0	0	0	3
NÉCTAR	AD	Células AT	10	1	4	9	1
NÉCTAR	AI	PRP	0	0	0	18	0
PASTOR	AI	Células BM	26	17	23	32	19
PASTOR	AD	RL	19	24	25	22	22
PERICO	AI	RL	17	7	24	25	9
PERICO	AD	Células AT	15	2	16	9	5
TORTIAS	AD	Células AT	18	21	21	15	29
TORTIAS	AI	PRP	22	8	11	20	15
TOSCÁN	AD	PRP	12	3	4	6	8
TOSCÁN	AI	Células BM	10	0	6	6	8

ANEXO 4. Expresión fénica de los genes relacionados con la regeneración tisular

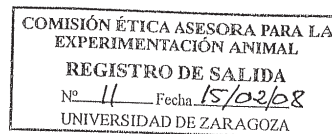
Animales	GAPDH	B2M	FN	COL1A1	COL1A1-N	COL3A1	COL3A1-N	COMP	COMP-N	Aggrecan	Aggrecan-N
Lobo Z-1	0,079274	0,186523	0,1216	0,026876	0,22102301	0,020874	0,171659	0,060614	0,49847	0,032016	0,263291
Lobo Z-3	0,219206	0,157317	0,185701	0,278314	1,49872378	0,05504	0,296389	0,036314	0,195549	0,109683	0,590645
Lobo Z-8	0,185478	0,183283	0,184377	0,409367	2,22026965	0,277523	1,50519	0,559929	0,306867	0,805866	4,370751
Bizco Z-1	0,19654	0,097706	0,138576	0,032829	0,2369006	0,003967	0,028629	0,087396	0,630672	0,071215	0,51391
Bizco Z-3	0,770734	0,145827	0,335252	0,298634	0,89077721	0,044727	0,133413	0,73472	2,19155	0,454917	1,356941
BizcoZ-8	0,271356	0,279676	0,275485	1	3,62996538	0,085323	0,309719	0,909862	3,302768	1	3,629965
Pastor Z-1	0,41995	0,230419	0,31107	0,120496	0,38735805	0,00511	0,016426	0,189665	0,609719	0,210937	0,678101
Pastor Z-3	0,641259	0,198314	0,35661	0,55707	1,56212599	0,012889	0,036144	0,077846	0,218295	0,312912	0,877461
Pastor Z-8	0,031467	0,015787	0,022288	0,208459	9,3528786	0,138453	6,211941	0,001914	0,085877	0,004446	0,199473
Jerezano Z-1	0,468167	0,16965	0,281823	0,114836	0,40747365	0,011456	0,040651	0,153635	0,545146	0,403261	1,430901
Jerezano Z-3	0,354805	0,176631	0,250339	0,928201	3,70778178	0,030017	0,119906	0,068224	0,272526	0,159224	0,636036
Jerezano Z-8	0,039595	0,045767	0,042569	0,009052	0,21264047	0,000425	0,009979	0,016305	0,383023	0,022368	0,52545
Lucky Z-1	1	1	1	0,104836	0,1048356	0,014761	0,014761	1	1	0,044986	0,044986
Lucky Z-3	0,314127	0,070175	0,148472	0,802465	5,40481809	0,001084	0,0073	0,158891	1,070177	0,092293	0,621617
Lucky Z-8	0,035774	0,021989	0,028047	0,110462	3,93848849	0,007272	0,259277	0,071186	2,538115	0,094035	3,35277
Toscan Z-1	0,192834	0,156855	0,173916	0,206362	1,18655852	0,01848	0,106256	0,194998	1,121216	0,077646	0,446454
Toscan Z-3	0,066813	0,051458	0,058635	0,199937	3,40985761	0,014534	0,24787	0,084463	1,440489	0,055432	0,945377
Toscan Z-8	0,037323	0,057664	0,046392	0,267155	5,75867843	0,214177	4,616717	0,003838	0,082728	0,02351	0,506768

Animales	Decorin	Decorin-N	Scleraxis	Scleraxis-N	TenascinaC	TenascinaC-N	MMP3	MMP3-N	TNMD	TNMD-N
Lobo Z-1	0,169437	1,393397	0,008536	0,0702	0,028217	0,232048	0,012982	0,10676	0,026388	0,217006
Lobo Z-3	0,307793	1,657466	0,016601	0,089394	0,273458	1,472572	0,060803	0,327422	0,225479	1,214205
Lobo Z-8	1	5,423669	0,071707	0,388915	0,80352	4,358028	0,602986	3,270397	0,138974	0,753748
Bizco Z-1	0,062364	0,45004	0,114424	0,825713	0,008816	0,063617	0,003501	0,025262	0,030355	0,21905
Bizco Z-3	0,775166	2,312193	0,070634	0,21069	0,303029	0,903885	0,090934	0,271242	0,387814	1,156785
BizcoZ-8	0,466386	1,692966	1	3,629965	0,294081	1,067502	0,577779	2,097318	0,518303	1,88142
Pastor Z-1	0,225997	0,726514	0,087794	0,282232	0,036656	0,11784	0,001504	0,004836	0,053199	0,17102
Pastor Z-3	0,209505	0,58749	0,001262	0,00354	0,101864	0,285645	0,005088	0,014268	0,936354	2,625707
Pastor Z-8	0,042318	1,898688	0,000886	0,039756	0,048175	2,161441	0,091335	4,097918	0,002793	0,125297
Jerezano Z-1	0,208165	0,738637	0,036557	0,129716	0,062112	0,220394	0,024009	0,085191	0,140219	0,457544
Jerezano Z-3	0,141083	0,563568	0,001011	0,00404	0,232697	0,929529	0,097408	0,389105	0,698907	2,791848
Jerezano Z-8	0,023722	0,557267	0,011359	0,266844	0,062298	1,463445	0,013255	0,31137	0,000127	0,002986
Lucky Z-1	0,674759	0,674759	0,141513	0,141513	0,137118	0,137118	0,067103	0,067103	0,086534	0,086534
Lucky Z-3	0,133135	0,896698	0,00352	0,023707	0,057463	0,38703	0,027401	0,184555	1	6,73527
Lucky Z-8	0,017461	0,622561	0,047502	1,693668	0,053891	1,921453	1	35,65458	0,01139	0,406123
Toscan Z-1	0,221283	1,272353	0,143403	0,824552	0,076793	0,411554	0,014014	0,08058	0,446725	2,568616
Toscan Z-3	0,063902	1,089834	0,018422	0,314183	0,067349	1,148612	0,003949	0,06735	0,591583	10,08927
Toscan Z-8	0,067043	1,445145	0,010627	0,22907	0,085311	1,83892	0,00552	0,118986	0,006329	0,136434

Animales	Decorin	Decorin-N	Scleraxis	Scleraxis-N	Tenascina	Tenascina-N	MMP3	MMP3-N	TNMD	TNMD-N
Malacaton Z-1	0,010789	0,080749	0,002543	0,019033	0,023034	0,172398	0,002557	0,019137	0,009269	0,069375
Malacaton Z-3	0,083536	0,224243	0,004059	0,010897	0,131859	0,35396	0,073649	0,197702	0,006991	0,018765
Malacaton Z-8	0,044687	0,151109	0,043492	0,147069	0,126216	0,426801	0,074043	0,250379	0,003802	0,012858
Espabil Z-1	0,383244	1,884906	0,008155	0,040111	0,147776	0,726803	0,015542	0,076438	0,052957	0,260458
Espabil Z-3	0,001725	0,131671	0,000909	0,069401	0,044005	3,359013	0,000138	0,010535	0,07722	5,89437
Espabil Z-8	0,023294	1,330057	0,046379	2,648142	0,375828	21,45914	0,001608	0,091803	0,057282	3,270679
Perico Z-1	0,002407	0,060199	0,049675	1,242199	0,016436	0,411008	0,000177	0,004417	0,014015	0,350466
Perico Z-3	0,01299	0,09843	0,022854	0,173179	0,045973	0,348363	0,000266	0,002014	0,118454	0,897593
Perico Z-8	0,2422	1,189275	0,150071	0,736897	0,269249	1,322095	0,010118	0,049683	0,01482	0,072771
Barbaro Z-1	0,034594	0,835945	0,055393	1,338534	0,085419	2,064092	0,011127	0,268869	0,037428	0,90442

Barbaro Z-3	0,005024	0,356236	0,001063	0,075415	0,023986	1,700903	0,00167	0,118403	0,012812	0,90855
Barbaro Z-8	0,358647	2,094544	0,038143	0,222761	1	5,84013	0,028053	0,163833	0,249021	1,454313
Totias Z-1	5,99E-05	0,486592	0,00211	17,14045	0,000473	3,844573	3,69E-06	0,030006	0,000959	7,789901
Totias Z-3	0,004309	0,483506	0,002706	0,303573	0,029855	3,349795	0,001718	0,192792	0,271806	30,49726
Totias Z-8	0,05526	2,706278	0,002799	0,13708	0,02844	1,392801	0,003493	0,171056	0,004156	0,203542
Nectar Z-1	0,021119	0,167952	0,012435	0,098894	0,106751	0,84896	0,014279	0,11356	0,010351	0,082322
Nectar Z-3	0,086499	1,910036	0,00304	0,067137	0,065523	1,446865	0,006516	0,14388	0,018269	0,403419
Nectar Z-8	0,449017	0,709913	0,009532	0,015071	0,136788	0,216266	0,133198	0,210592	0,005097	0,008058

ANEXO 5.



Ref. PI36/07

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
COMISIÓN ÉTICA ASESORA PARA LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

CONTROL DE BUENA PRÁCTICA EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Título procedimiento de experimentación:

Estudio del tratamiento de tendinitis en caballos mediante el uso de células madres mesenquimales.

Título del proyecto en el que se incluye:

Caracterización de células troncales mesenquimales equinas para su uso como implantes autólogos en el tratamiento de lesiones del aparato locomotor.

Investigador responsable en la U.Z.: Inmaculada Martín Burriel

Duración: 4 años

Fecha estimada de inicio del procedimiento: Enero, 2008

Animales que implica:

especie (s): Equina
peculiaridades: Razas cruzadas de silla
número: 12

Fecha de presentación: 19 de diciembre de 2007

Reunida la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal el día 11 de febrero de 2008, y una vez revisada la documentación disponible en relación al procedimiento de experimentación descrito, considera:

QUE EL PROCEDIMIENTO CUMPLE LOS PRINCIPIOS ÉTICOS Y DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES UTILIZADOS PARA EXPERIMENTACIÓN QUE SE HA IMPUESTO LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA. Por ello, se emite **informe FAVORABLE**.

Se recuerda que para cumplir la normativa vigente, RD 1201/2005, el presente procedimiento necesita la AUTORIZACIÓN PREVIA Y EXPRESA de la autoridad competente.

Esta evaluación será válida únicamente para ESTE PROCEDIMIENTO y durante un periodo de tiempo de tres años, salvo modificación sustancial del procedimiento presentado. La realización del procedimiento queda supeditada igualmente a la disponibilidad de las instalaciones necesarias en el momento en que se plantee la realización del mismo.

En Zaragoza, a 12 de febrero de 2008

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN

Jorge Palacio Liesa



EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN

José Ángel Villar Rivacoba

