



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

Índice

Abreviaturas	1
I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCIÓN	3
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. OBJETIVOS	4
V. METODOLOGÍA.....	5
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	5
1. Generalidades	5
1.1. La Articulación	5
1.2. Osteoartritis.....	6
2. Tratamientos.....	7
2.1. Terapias convencionales	7
2.2. Productos ortobiológicos	7
3. Células madre	9
2.1. Células madre mesenquimales	10
3. Obtención, aislamiento y administración.....	11
3.1. Obtención	12
3.2. Aislamiento y cultivo	13
3.3. Conservación, mantenimiento y transporte.....	14
4. Mecanismos de acción de MSCs en la articulación	15
4.1. Integración y diferenciación.....	16
4.2. Actividad paracrina.....	16
5. Inmunogenicidad y seguridad terapéutica	19
6. Otras estrategias terapéuticas	20
6.1. Combinación con otros productos	20
6.6.2. MSCs primed.....	21
VII. Conclusión	22
VIII. Valoración personal	22
IX. Bibliografía.....	23

Abreviaturas

A

ACS: suero autólogo condicionado

ADAMTS-5: desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 5

ADSVF: fracción vascular estromal de tejido adiposo

ATMSCs: células madre mesenquimales de tejido adiposo

B

bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico

BMAC: concentrado autólogo de médula ósea

BMMSCs: células madre mesenquimales de médula ósea

C

CCL: ligando de quimiocina

CXCL: quimioquina CXC ligando

D

DMEM: Dulbecos's modified Eagle's medium

F

FBS: suero fetal bovino

G

GAGs: glicosaminoglicanos

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos

H

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

I

IFN- γ : interferón gamma

IGF-1: factor de crecimiento insulínico 1

IL: interleucina

IL-ra: antagonista del receptor interleucina 1

iPSCs: células madre pluripotentes inducidas

IRAP: proteína antagonista del receptor IL-1

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular

K

Klf4: factor 4 Kruppel-like

L

LIF: Factor Inhibidor de Leucemia

M

M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MMP: metaloproteinasa

MSCs: células madre mesenquimales

N

NO: óxido nítrico

P

PBS: tampón fosfato salino

PGE-2: prostaglandina E2

PIGF: factor de crecimiento placentario

PRF: fibrina rica en plaquetas

PRP: plasma rico en plaquetas

S

SCF: stem cell factor

SDF-1: factor derivado del estroma 1

SOCS-1: supresor de señalización de citoquinas 1

T

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TSG-6: proteína inducida por TNF α 6

V

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

I. RESUMEN

Las patologías articulares, principalmente la osteoartritis, adquieren una especial relevancia en la especie equina, debido a la gran incidencia con la que se presentan en medicina deportiva. Las terapias convencionales que se han empleado frente a este tipo de patologías han mostrado poseer un carácter paliativo. Esto ha dado lugar a que estos últimos años las terapias regenerativas, especialmente del uso de MSCs, hayan experimentado un gran desarrollo con el objetivo de hallar un tratamiento realmente efectivo. De esta manera, se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de desvelar los mecanismos de acción de las MSCs. Aunque los hallazgos obtenidos son escasos, algunos de ellos, han mostrado que este tipo de células guardan un gran efecto terapéutico aplicable a patologías difíciles de tratar, como es el caso de las patologías articulares en la especie equina. A pesar de que inicialmente estos efectos beneficiosos eran atribuidos a su capacidad de diferenciación, varios ensayos han mostrado que influyen más sus propiedades paracrinas, especialmente su carácter inmunomodulador. No obstante, todos estos efectos beneficiosos pueden verse comprometidos por su posible carácter inmunógeno ya que, aunque si bien es cierto, que poseen una baja inmunogenicidad, se ha descubierto que no son completamente inmunoprivilegiadas, pudiendo afectar este hecho a su seguridad terapéutica. Al mismo tiempo, se han abierto diversas líneas de investigación con el fin de potenciar sus efectos, desarrollando para ello nuevas técnicas como la estimulación previa a su inoculación o la combinación con otros productos como los scaffolds o el PRP. Así pues, el campo de estudio de las MSCs sigue desarrollándose proporcionando respuestas a las incógnitas que se plantean.

ABSTRACT

Joint pathologies, mainly osteoarthritis, acquire a special relevance in the equine species, due to the high incidence in sports medicine. The conventional therapies which have been used against this type of pathologies have shown a palliative character. This fact has caused that in recent years regenerative therapies, especially the use of MSCs, have undergone a great development with the aim of finding a truly effective treatment. In this way, several studies have been developed with the purpose of revealing the action mechanisms of the MSCs. Although findings are scarce, some of them have shown that this type of cells hide a great therapeutic effect applicable to difficult pathologies, as joint pathologies in equine species. Although initially these beneficial effects were attributed to their differentiating capacity, some trials have shown that the influence of their paracrine properties are more important, especially their immunomodulatory nature. However, all these beneficial effects can be compromised by their

possible immunogenicity because, although it is true that they have low immunogenicity, it has been discovered that they are not completely immunoprivileged and this fact may affect their therapeutic safety. At the same time, several lines of research have been opened in order to enhance their effects, developing new techniques such as their stimulation prior to inoculation or their combination with other products such as scaffolds or PRP. Even with the entire field of study of MSCs, it continues to develop, providing more and more answers to these questions.

II. INTRODUCCIÓN

La especie equina es la especie animal en la que tiene una mayor relevancia las enfermedades del aparato musculoesquelético, debido a que se dedican a la actividad deportiva. Este hecho supone un gran impacto en el mundo ecuestre, ya que suponen cerca del 82% de los problemas de pérdida de rendimiento deportivo en caballos de carreras (Carmona, 2011). Dentro de este grupo de patologías pueden ser diversas las estructuras que pueden verse afectadas observándose desde afecciones tendinosas hasta articulares.

De entre las patologías articulares que afectan a la especie equina, la osteoartritis es una de las más destacadas. Su carácter progresivo combinado con el escaso poder de regeneración de las estructuras implicadas supone un gran reto terapéutico para el veterinario clínico. En esta patología, la falta de tratamientos eficaces que aseguren la regeneración de las estructuras articulares, ha dado lugar a la búsqueda nuevas estrategias terapéuticas que solventen exitosamente este problema. Para ello se han desarrollado líneas de investigación en base a las terapias regenerativas y sus efectos beneficiosos, adquiriendo una gran relevancia el uso de células madre mesenquimales.

El uso de éste tipo de células en medicina veterinaria se ha incrementado en los últimos años debido a los resultados favorables, que muchos de los ensayos realizados han dejado entrever. No obstante, las incógnitas que despiertan este campo de estudio, distan mucho de ser conocidas. A pesar de ello, los avances que se están experimentando sugieren resultados terapéuticos prometedores, ya no solo en la especie equina sino también en la especie humana.

III. JUSTIFICACIÓN

La industria equina es un sector de un gran impacto económico. Según el último análisis realizado por la consultora Deloitte en 2013 y en plena crisis en España, este impacto económico alcanzaba una cifra de 5.303 millones de euros es decir el 0.51% de PIB y genera más de 60.000 empleos directos e indirectos.

Además, según el último censo equino realizado por el MAPAMA en 2018, el nº de cabezas equinas en España es de 632.000 lo que coloca a España como 4º país de la UE por número de caballos (World Horse Welfare and Eurogroup).

Las enfermedades más frecuentes en el caballo de deporte son aquellas que afectan a su aparato musculoesquelético. Estudios realizados en caballos de carreras demuestran que estas lesiones producen importantes pérdidas económicas. Del total de lesiones que afectan al aparato locomotor, una gran parte, (más del 50%) son debidas a patologías osteoarticulares.

La terapia celular se define como el trasplante de células vivas a un organismo con el propósito de reparar un tejido o funciones perdidas. El tratamiento de la osteoartritis es, probablemente, uno de los campos en el que más esperanzas se han depositado en el uso de las MSCs, no sólo por el propio interés para la especie equina y la industria del caballo, sino también por la idoneidad de este modelo animal para la especie humana. El uso intra-articular de las células madre en caballos se plantea a través de dos tipos de estrategias terapéuticas: inyección directa de las MSCs en suspensión en la articulación, o bien el depósito de las células directamente en el defecto cartilaginoso, utilizando scaffolds y/o “andamiajes” biológicos.

Existe un número creciente de estudios sobre el efecto de la administración intra-articular de MSCs como tratamiento de distintas condiciones patológicas de la articulación equina. Mientras que la mayoría de ellos se centra en el uso autólogo de MSCs, algunos comienzan también a explorar el efecto de las MSCs alogénicas.

Aunque los mecanismos de acción exactos no están totalmente claros, parece que las propiedades paracrinas de las MSCs serían las principales responsables de su potencial terapéutico, mediante la estimulación de la reparación endógena y por su capacidad para regular el ambiente inflamatorio y catabólico de la articulación osteoartítica.

Así, aunque las MSCs han mostrado buenos resultados clínicos en diferentes tipos de lesiones condrales, se debe seguir investigando para mejorar su viabilidad, capacidad de migración y propiedades paracrinas.

IV. OBJETIVOS

Por todo lo mencionado anteriormente, el objetivo de éste trabajo es la realización de una revisión bibliográfica actualizada sobre el uso terapéutico de las MSCs en patologías articulares equinas, en la que se incluyen los principales estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en

esta especie, así como en otros modelos animales, los cuáles han permitido conocer los mecanismos de acción de estas células. De esta manera, se procurará obtener una visión general sobre la situación en la que se encuentra la medicina regenerativa equina a nivel articular, la naturaleza de este tipo de células y sus mecanismos de acción.

V. METODOLOGÍA

Para alcanzar estos objetivos, la estrategia de búsqueda se ha basado en:

- La búsqueda de información a través de bases de datos como Pubmed o Science Direct, de buscadores académicos como Google Scholar o de repositorios con contenido técnico, como ivis.org (International Veterinary Information Service).
- Se ha llevado a cabo una revisión tanto de artículos científicos como de actas de congresos relacionados con la clínica equina, así como también se han consultado libros de referencia en la disciplina.
- La búsqueda de información se ha realizado utilizando diversas palabras clave como “joint”, “horse”, “stem cell” y “cartilage” combinadas para la búsqueda de bibliografía relacionada con la especie equina.
- Debido a la gran variedad de modelos de estudio que se han empleado para la investigación de las terapias basadas en MSCs también se han revisado ensayos y avances realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo aquellos en los que se han visto implicadas otras especies animales además de la equina. Para ello se ha realizado una búsqueda con las palabras clave mencionadas anteriormente excluyendo “horse” de la búsqueda.
- Debido a la gran cantidad de citas en los últimos años se han incluido artículos posteriores al año 2000.
- Se han excluido todos aquellos resultados que no estén redactados en español o inglés

Para la administración de las citas bibliográficas se ha empleado el programa “RefWorks”

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Generalidades

1.1. La Articulación

Las articulaciones en la especie equina son estructuras anatómicas muy sensibles que soportan una gran carga mecánica, especialmente las articulaciones sinoviales presentes en las extremidades. Estas estructuras tienen la función de permitir el movimiento del animal y

distribuir las fuerzas a las que se somete el sistema musculoesquelético del caballo (Frandsen, Wilke, y Fails, 2009).

Las articulaciones se componen de varias estructuras sin las cuales serían incapaces de realizar su función locomotora. Las principales estructuras que las componen son: cartílago articular, hueso subcondral, líquido sinovial y cápsula articular principalmente, aunque pueden estar presentes otros tipos de estructuras intra-articulares como ligamentos o meniscos que proporcionan mayor estabilidad mecánica (Frandsen et al., 2009).

1.2. Osteoartritis

Un defecto en cualquiera de las estructuras articulares puede dar lugar a una inestabilidad articular haciendo peligrar su correcto funcionamiento y desembocando en una disminución del rendimiento deportivo del animal. Por todo ello este tipo de patologías adquiere una especial relevancia en la clínica equina. Dentro de este tipo de patologías, la osteoartritis adquiere una especial importancia por su gran incidencia (Zrimsek et al., 2007).

La osteoartritis es una enfermedad caracterizada por un deterioro progresivo y permanente del cartílago articular, esclerosis subcondral, neoformación ósea (osteofitos) y daño de tejidos blandos adyacentes (sinovitis-capsulitis) (Zrimsek, Kos, Mrkun, y Kosec, 2007)(Figura 1). En esta patología el balance anabólico y catabólico del cartílago articular se ve alterado y la degradación por parte de enzimas liberadas por los condrocitos como respuesta a las citoquinas proinflamatorias liberadas, predomina por encima de la capacidad de reparación (McIlwraith, 2015).

Una vez que esta patología se instaura, puede recurrirse a diversas opciones terapéuticas, las cuáles pueden agruparse en dos grandes grupos principales: terapias convencionales y regenerativas.



Figura 1: Signos de remodelación ósea en la articulación interfalangiana distal, hallazgo presente en la osteoartritis equina. (Imagen cedida por el servicio de medicina y cirugía equina del hospital veterinario de Zaragoza)

2. Tratamientos

2.1. Terapias convencionales

Hasta ahora no se han encontrado métodos terapéuticos completamente efectivos que aseguren la regeneración del cartílago, por lo cual, los tratamientos empleados han ido dirigidos a tener una función paliativa en gran parte de los casos, enfocándose en eliminar cualquier causa primaria, reducir la inflamación articular activa e interrumpir la pérdida o degeneración del cartílago articular, además de controlar los signos clínicos como son, disminuir el dolor, mejorar la movilidad y si es posible frenar la progresión de la enfermedad (Oke, Aghazadeh-Habashi, Weese y Jamali, 2006).

Dentro de este grupo, los tratamientos médicos como el uso de antiinflamatorios no esteroideos, corticoides, hialuronato de sodio, tiludronato, nutracéuticos, glicosaminoglicanos no sulfatados o antibióticos, han sido prácticas muy extendidas en la clínica equina. No obstante ninguno de ellos ha logrado una regeneración completa del cartílago dañado (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007). Las ondas de choque extracorpóreas ha sido otra de las estrategias que se han adoptado para el tratamiento de este tipo de enfermedades, pero al igual que el tratamiento médico, solo han demostrado ser eficaces reduciendo los signos clínicos, no la progresión de la enfermedad (Frisbie, Kawcak y McIlwraith, 2009).

Al mismo tiempo, se han desarrollado prácticas quirúrgicas basadas en la artroscopia con el mismo objetivo. No obstante, además de ser técnicas complejas, no han mostrado ser muy eficaces (Zayed et al., 2018).

2.2. Productos ortobiológicos

Otro tipo de terapias que está cobrando gran importancia estos últimos años son las terapias basadas en productos ortobiológicos, también conocidas como terapias regenerativas. Éstas, están basadas en amplificar la capacidad natural que presenta el organismo de regeneración (Monteiro, Bettencourt y Lepage, 2015). Las terapias ortobiológicas según su naturaleza pueden agruparse en dos grupos principalmente: terapias celulares y terapias no celulares.

2.2.1. Terapias no celulares

Dentro de las terapias no celulares, el suero autólogo condicionado, el plasma rico en plaquetas y la fibrina rica en plaquetas son las más utilizadas, aunque existen otras terapias de este tipo. A continuación se describen algunas de ellas.

- *Suero autólogo condicionado (ACS)*: también conocido como IRAP (proteína antagonista del receptor IL-1), es un producto biológico obtenido a partir de la sangre del paciente, la cual tras ser procesada e incubada es rica en citoquinas antiinflamatorias, principalmente en IL-1ra (antagonista del receptor interleucina 1) (Monteiro et al., 2015). La IL-1ra es un antagonista de la IL-1 y actúa uniéndose a su receptor de membrana dando como resultado una disminución de la inflamación. Sin embargo no posee la capacidad de regenerar el tejido perdido (Zayed et al., 2018).
- *Plasma rico en plaquetas (PRP)*: es otro producto biológico que al igual que el ACS deriva de la sangre del paciente. Por definición, el PRP es un volumen de la fracción plasmática de la sangre que presenta una concentración de plaquetas por encima de su valor fisiológico (Pietrzak y Eppley, 2005). Este tipo de terapia está enfocado a la capacidad que presentan las plaquetas para liberar determinados factores de crecimiento cuando son expuestas al colágeno (Harrison et al., 2011). Éstos juegan un rol muy importante en la actividad inflamatoria promoviendo la angiogénesis, la atracción de fibroblastos y células madre locales al lugar de lesión e induciendo la producción paracrina de más factores de crecimiento (Sundman et al., 2013), mejorando así la regeneración del cartílago. De esta manera aunque la utilización de PRPs no esta tan extendida en lesiones articulares como en lesiones tendinosas y ligamentosas, se ha observado que empleado vía intra-articular, presenta un potencial terapéutico en lesiones degenerativas del cartílago (Amable et al., 2013).
- *Fibrina rica en plaquetas (PRF)*: se trata de un producto con propiedades similares al PRP. Este producto al igual que los PRP se extrae de la sangre del paciente sin la utilización de ningún anticoagulante. Esto da lugar a que, que tras su centrifugación, se obtenga un coágulo de fibrina rico en leucocitos, plaquetas y factores de crecimiento (McLellan y Plevin, 2014). Este producto ha mostrado resultados clínicos superiores a los PRP debido a que, a diferencia de éstos, la estructura y soporte que brinda el coágulo de fibrina una liberación de los factores de crecimiento más lenta y prolongada que favorecen la regeneración tisular (Choukroun et al., 2006).

2.2.2. Terapias celulares

Las terapias biológicas celulares son otro grupo de terapias biológicas que también se encuentra en vías de estudio y que ha aportado resultados prometedores.

- *Aislamiento y trasplante de condrocitos*: se trata de una técnica descrita para tratar los defectos de espesor total del cartílago articular (Zayed et al., 2018). Éstos se obtienen mediante la digestión de la matriz extracelular del cartílago articular por colagenasas y

posteriormente pueden ser expandidas in vitro (Sandoval, López y Carmona, 2013). Una vez obtenida esta población celular pueden emplearse embebidas en una matriz de fibrina y utilizarse en pacientes que presenten lesiones en el cartílago articular. Aunque el mecanismo de acción de estas células en las patologías articulares no se conoce con seguridad, se piensa que su principal acción es inmunomoduladora favoreciendo la regeneración articular mediante el estímulo de las células residentes (Nixon et al., 2011). Sin embargo, los resultados clínicos de la regeneración de tejido fibroso en lugar del cartílago hialino, la reducción de las cualidades bioquímicas y biomecánicas y la naturaleza compleja e invasiva de esos procedimientos, junto con los altos costos, son serios inconvenientes para este tipo de procedimientos (Cokelaere, Malda y van Weeren, 2016).

- *Células madre mesenquimales (MSCs)*: el uso de MSCs como tratamiento frente a patologías articulares está cobrando una gran importancia debido al gran potencial terapéutico que han demostrado poseer. Éstas, junto con sus mecanismos de acción y aplicaciones prácticas serán vistas más detalladamente en los siguientes apartados.
- *Productos Point-of-care*: es un grupo de productos ortobiológicos que se procesan en el mismo momento de la obtención para una posterior administración inmediata. Pueden diferenciarse el concentrado autólogo de médula ósea (BMAC) y la fracción vascular estromal de tejido adiposo (ADSVF). La BMAC se obtiene a partir de la centrifugación de médula ósea eliminando así los glóbulos rojos, granulocitos, precursores mieloides inmaduros y plaquetas. El producto resultante se caracteriza por ser una fuente de células mononucleares, dentro de las cuáles se encuentran MSCs (Fortier et al. 2010). No obstante, la proporción de MSCs que presenta es muy baja (0,001-0,01%) (Bogers, 2018), lo cual da lugar a una gran controversia sobre si considerarlos verdaderas fuentes de éste tipo de células. Al mismo tiempo, se ha descrito un producto similar, ampliamente comercializado en medicina deportiva equina, obtenido a partir del tejido adiposo subcutáneo, conocido como fracción vascular estromal derivada de tejido adiposo (ADSVF) (Monteiro et al., 2015), que presenta las mismas limitaciones que el BMAC en cuanto a su bajo contenido de MSCs. Los defensores de estos productos, sugieren que los resultados clínicos favorables pueden estar relacionados sobre todo con sus efectos paracrinos o inmunomoduladores (Kol et al., 2013).

3. Células madre

Las células madre se caracterizan por ser células indiferenciadas con una gran capacidad de autorrenovación y proliferación, poseyendo además un alto potencial de diferenciación en

otros tipos celulares (Odorico, Kaufman y Thomson, 2001). Según su capacidad de diferenciación algunos autores como Bongso y Lee (2005) las clasifican en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes (Figura 2) (Bongso y Lee, 2005).

Autores como Whitworth y Banks (2014), en cambio, agrupan las células madre en dos grandes clases atendiendo a su origen diferenciando entre células madre embrionarias y células madre adultas (Figura 2) (Whitworth y Banks, 2014). Además de estos dos grupos existe un tercero conformado por un tipo de células denominadas células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Este tipo de células debe su origen a que las células madre adultas diferenciadas (como los fibroblastos) pueden ser reprogramadas a un estado embrionario en el que son pluripotentes mediante la introducción de los factores Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, mostrando así, las características fenotípicas de las células madre embrionarias (Takahashi y Yamanaka, 2006). Sin embargo se ha descrito que su uso puede inducir teratomas (Avior, Sagi y Benvenisty, 2016).

Células madre	Según su capacidad de diferenciación	En un organismo vivo	TOTIPOTENTES
		En células de las tres capas germinales	PLURIPOTENTES
		En células de un tejido u órgano	MULTIPOTENTES
		En un tipo celular especializado	UNIPOTENTES
	Según su origen	Embrión en estado de blastocisto	EMBRIONARIAS
		Tejidos	ADULTAS
		Células madre adultas ya diferenciadas	iPSCs

Figura 2: Clasificación de células madre según su origen y capacidad de diferenciación

2.1. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales son células madre adultas multipotentes que derivan de la capa embrionaria del mesodermo, lo cual las hace capaces de diferenciarse a células que conforman los tejidos derivados de esta capa, como el hueso, el cartílago, el estroma medular, ligamentos, tendones, grasa, músculo y otros tejidos conectivos (Weissman, Anderson y Gage, 2001).

Desde el descubrimiento de las MSCs hasta la actualidad, este tipo de células ha recibido diversas nomenclaturas hasta que finalmente, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso aplicar el acrónimo MSCs (Mesenchymal stem/stromal cells) (Horwitz et al., 2005). Estas MSCs, en la especie humana, según los estándares definidos por la ISCT se caracterizan por: su capacidad de adherencia al plástico, la expresión de determinados marcadores de superficie y la ausencia de otros y su multipotencialidad de diferenciación a otros tipos celulares como osteoblastos, adipocitos o condrocitos.

Las terapias basadas en MSCs han adquirido un gran interés en la clínica equina, especialmente desde la pasada década cuando se empezaron a reportar sus efectos terapéuticos en esta especie (De Schauwer, Van de Walle, Van Soom y Meyer, 2013). Estas células han demostrado poseer funciones regenerativas, antiinflamatorias, inmunomoduladoras y tróficas (Bogers, 2018) que han aportado resultados favorables en muchos de los estudios realizados. Estos resultados esperanzadores han provocado que gran parte de ellos se hayan enfocado en el tratamiento tanto de tejidos blandos intra-articulares como en la regeneración del cartílago (McIlwraith et al., 2011).

Al igual que con otras terapias basadas en células, factores como la fuente de células madre, la obtención y condiciones de expansión, la forma de transporte y envío, así como la vehiculación e implantación, deberán ser tomados en cuenta por la gran influencia que presentan sobre los resultados terapéuticos (Bogers, 2018).

3. Obtención, aislamiento y administración

Tanto en la especie equina como en otros modelos animales, la presencia de MSCs ha sido descrita en diversos tejidos, que los convierte potencialmente en fuentes de obtención.

La médula ósea es la fuente más común de MSCs (BMMSCs) (Govoni, 2015), pero las MSCs también se han aislado del tejido adiposo (ATMSCs) (Vidal y Lopez, 2011), sangre del cordón umbilical (Tessier, Bienzle, Williams y Koch, 2015), sangre periférica (Dhar et al., 2012), membrana sinovial, grasa intra-articular (Monteiro et al., 2015) y líquido sinovial (Murata et al., 2014). Además, se han llegado a identificar en otros tejidos como corazón (Zhang et al., 2015), pulmón (Gong et al., 2014), riñón (Jiang et al., 2015), cerebro (Lojewski et al., 2015), piel (Li et al., 2015), tendón (Rui et al., 2010), líquido amniótico y placenta (In't Anker et al., 2003; Hsu et al., 2011), y endometrio (Cabezas et al., 2018), entre otros.

Las MSCs más frecuentemente empleadas para el tratamiento de afecciones condrales son aquellas procedentes de médula ósea (BMMSCs) y de tejido adiposo (ATMSCs) (Caplan, 2007). A pesar de las grandes ventajas que presentan las MSCs procedentes de tejido adiposo

en cuanto a su sencilla obtención y al gran número de células que puede recolectarse, se ha visto que las MSCs procedentes de médula ósea (Vidal et al., 2008), membrana sinovial (Mochizuki, 2006) y grasa intra-articular (Vinardell, Sheehy, Buckley y Kelly, 2012) presentan un mayor potencial condrogénico. Además, estos últimos años, las MSCs procedentes del líquido sinovial han adquirido una gran relevancia, convirtiéndose en una valiosa fuente de MSCs para el tratamiento de lesiones del cartílago por sus grandes propiedades condrogénicas superiores incluso a las de MSCs procedentes de médula ósea (Zayed et al., 2018).

Como se ha mencionado anteriormente, las MSCs procedentes de médula ósea y tejido adiposo son las células más comúnmente utilizadas. Estos tejidos, pueden ser procesados y empleados en el mismo momento de la obtención (Point-of-care products) o pueden ser procesados en un laboratorio para su posterior expansión durante 2-4 semanas antes de su inoculación (Bogers, 2018). A continuación, en los siguientes apartados, se describirá con más detalle las técnicas de obtención, aislamiento, conservación y administración de las MSCs procesadas en el laboratorio (Figura 3).

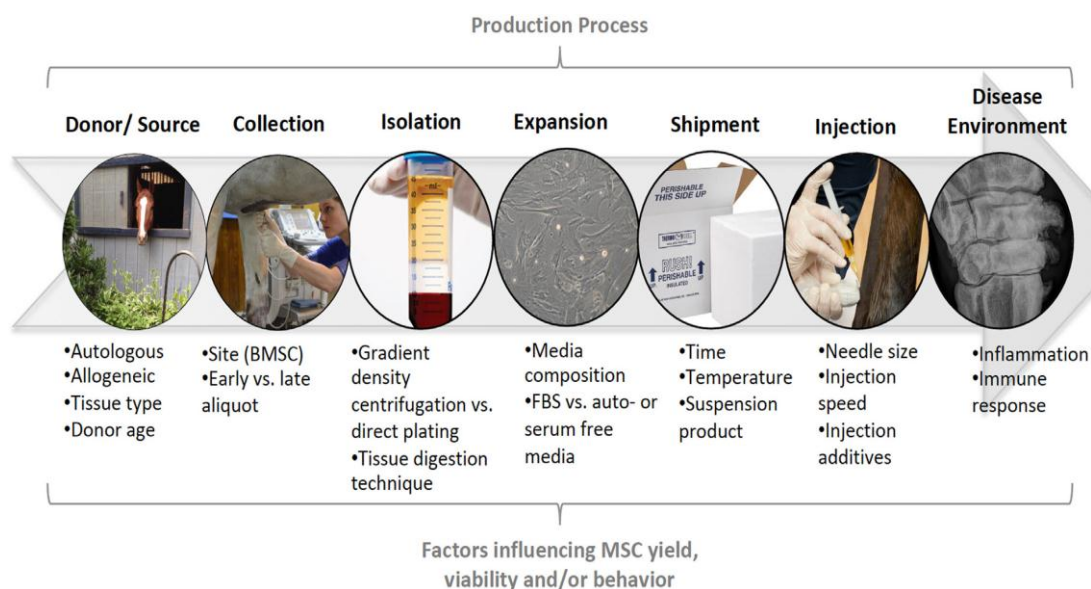


Figura 3: Proceso de obtención, aislamiento, cultivo y administración de BMMSCs (Bogers, 2018)

3.1. Obtención

La obtención de las BMMSCs en caballos se lleva a cabo a partir de médula ósea del esternón o del íleon extraída con una aguja Jamshidi de 10 a 11 G (Lombana et al., 2015). La punción cardíaca supone un peligro potencial en este procedimiento. Sin embargo la obtención esternal de BMMSCs en la 5ª esternebra, sirviendo como apoyo el empleo de ultrasonidos, evita el trauma iatrogénico en el ápex del corazón (Kasashima, Ueno, Tomita, Goodship y Smith, 2011). Ni la viabilidad, ni la densidad, ni la proliferación de MSCs son diferentes entre los aspirados de médula ósea procedentes del esternón o el íleon de caballos jóvenes (2-5 años)

(Adams et al., 2013); sin embargo, en caballos de mediana edad (13 años), las muestras del esternón tienen una mayor densidad de MSCs que las muestras ileales (Delling, Lindner, Ribitsch, Jülke y Brehm, 2012). Por lo tanto, el esternón es el más comúnmente elegido como el sitio de obtención de médula para el aislamiento de MSCs en caballos de mediana edad y adultos. Además, el mayor rendimiento de células, se produce en los 5 ml iniciales recolectados, por lo que no es necesario obtener grandes volúmenes de médula ósea (Adams et al., 2013). Se puede lograr un mayor rendimiento de células avanzando la aguja hacia el esternón 5 mm tres veces para cosechar desde cuatro lugares, en vez de cosechar desde uno solo (Peters y Watts, 2016).

Por otro lado la obtención de ATMSCs en caballos se lleva a cabo junto al nacimiento de la cola, en la zona subcutánea supragluteal. En esta zona se incide quirúrgicamente hasta llegar al tejido graso subcutáneo, donde se extrae la grasa, la cual posteriormente se procesa para aislar la fracción estromal vascular y las ATMSCs (de Mattos et al., 2009).

3.2. Aislamiento y cultivo

Una vez recogidas, las muestras de tejido adiposo o de médula ósea se envían a un laboratorio para su aislamiento y expansión en cultivo. Los métodos de aislamiento y cultivo de MSCs varían ligeramente entre los diversos laboratorios aunque todos comparten una estricta técnica aséptica y unas adecuadas medidas de control de calidad que contribuyan a aumentar la seguridad del producto (Devireddy, Boxer, Myers, Skasko y Screven, 2017). Las técnicas de aislamiento de MSCs que se llevan a cabo, se basan en su capacidad para adherirse al plástico (Taylor y Clegg, 2011). En general, en el caso de las BMMSCs, las células mononucleares derivadas de médula ósea se aíslan del aspirado de médula ósea mediante centrifugación de densidad de gradiente, como se describe para BMAC, y posteriormente se siembran sobre un plástico adherente donde proliferan hasta su confluencia. Una vez que confluyen, se extraen de dicho medio de cultivo y se siembran en otros nuevos hasta que vuelven a alcanzar la confluencia, realizando este procedimiento tantas veces como se considere necesario. A cada uno de estos cambios de medio se les denomina pase (Arnhold et al., 2007). Otro método alternativo es transferir la médula ósea pura en matraces de cultivo de tejido de plástico adherente y cultivarla a través de medios de crecimiento, lo cual implica la desventaja de reducir la densidad de las unidades formadoras de colonias (Chu et al., 2018).

En el caso del tejido adiposo, éste se digiere mecánica y enzimáticamente antes de su centrifugación para dar lugar a una óptima separación de la fracción celular y adiposa previa a su expansión en cultivo. La comparación de cultivos equinos de ATMSCs y BMMSCs muestra que las ATMSCs pueden experimentar una mayor proliferación celular (Vidal, Walker, Napoli y

Borjesson, 2011; Ranera et al., 2012), hecho que también se ha descrito en humanos (Kern, Eichler, Stoeve, Kluter y Bieback, 2006).

Las MSCs se expanden de forma habitual utilizando medios de cultivo celulares, como Dulbecos's modified Eagle's medium (DMEM), a los que pueden añadirse suero fetal bovino (FBS), factores de crecimiento, antibióticos y algunos aminoácidos como L-glutamina. La presencia de trazas de FBS procedente de los cultivos celulares en los preparados celulares para inocular pueden provocar reacciones inmunomediadas y consecuentemente inflamaciones articulares, en la mayoría de las ocasiones no revierten gravedad. Un estudio reveló que en el 89% de los caballos sometidos a una inyección sistémica de MSCs, se detectó la presencia de anticuerpos frente a proteínas del FBS, a pesar de que éstas fueron lavadas previamente a su administración (Owens, Kol, Walker y Borjesson, 2016).

Las xenoproteínas pueden causar efectos adversos al repetir la inyección, incluso si las MSCs son autólogas. Se ha observado que las BMMSCs equinas cultivadas en medio de cultivo adicionado con FBS pueden provocar una reacción inflamatoria tras la inyección intra-articular repetida, mientras que las BMMSC cultivadas durante 2 días en medios sin suero no la manifiestan (Joswig et al., 2017). En un intento por evitar los efectos desfavorables causados por la antigenicidad de las xenoproteínas, algunos laboratorios cultivan MSCs en medios sin suero, con lisado de plaquetas autólogo o suero autólogo durante al menos 48 h antes de su inoculación (Bogers, 2018). Sin embargo, Clark et al. (2016) encontraron que los medios libres de suero pueden causar alteraciones en la capacidad de las BMMSCs equinas para provocar una respuesta inmunomoduladora, lo cual puede afectar la eficacia terapéutica de las MSCs cultivadas sin suero. (Clark et al., 2016).

3.3. Conservación, mantenimiento y transporte

Algunos factores como el tiempo de envío, la temperatura y el producto de suspensión pueden influir en la viabilidad celular (Bronzini, Patruno, Iacopetti y Martinello, 2012; Garvican, Cree, Bull, Smith y Dudhia, 2014).

Una vez aisladas las MSCs, éstas pueden conservarse tanto en refrigeración como criopreservadas. Generalmente está recomendado la refrigeración, manteniendo una temperatura óptima de 4°C, siempre que sea posible, ya que se observa un mejor mantenimiento de la viabilidad celular (Mercati et al., 2014). Sin embargo si el periodo de conservación es superior a 24 horas se recomienda la criopreservación (Garvican et al., 2014). El inconveniente de criopreservarlas reside en que generalmente se emplean sustancias como el FBS o crioprotectores que pueden no ser adecuados para la administración *in vivo* (Barrachina,

Romero, Zaragoza, Rodellar y Vázquez, 2018). Aun así otros estudios han revelado que la criopreservación de MSCs equinas en medio de cultivo suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO) preservaba la viabilidad celular y, la administración después de la descongelación, era segura (Broeckx, Vries, Suls, Guest y Spaas, 2013).

Para ralentizar la reducción de la viabilidad de las MSCs durante el transporte se ha sugerido emplear productos como el suero. No obstante, debido a que el suero autólogo puede no estar disponible, se han buscado alternativas que aporten los mismos efectos (Barrachina et al., 2018a). La suplementación de solución salina tamponada con fosfato (PBS) ha mostrado buenos resultados incluso sin la combinación con productos biológicos (Bronzini et al., 2012). Este hecho junto a la significativa reducción de la viabilidad celular que experimentaron el uso de otros medios biológicos como aspirado de BM, plasma, suero, plasma rico en plaquetas (PRP) a las 24 horas, convierte al PBS en uno de los medios de elección (Garvican et al., 2014).

En el momento de la administración, la adición de otros fármacos intra-articulares, así como la selección del calibre de la aguja pueden influir en la viabilidad de las MSCs. La adición de altos niveles de antibióticos como aminoglucósidos, enrofloxacina y ceftiofur se ha observado que compromete la viabilidad de este tipo de células (Parker, Clegg y Taylor, 2012; Bohannon et al., 2013). En un estudio *in vitro* realizado se observó, que tanto la gentamicina como la amikacina a dosis comúnmente empleadas en la administración intra-articular, causan un porcentaje de mortalidad mayor del 95% de BMMSCs equinas en menos de 2 h (Bohannon et al., 2013). Además, se ha descrito que la inoculación a través de agujas de pequeño calibre reduce la viabilidad y el potencial proliferativo de las MSCs equinas (Garvican et al., 2014; Lang, Schnabel, Cassano y Fortier, 2017). En un esfuerzo por optimizar la viabilidad celular, las MSCs no se deben inyectar al mismo tiempo que los antibióticos anteriormente citados y las agujas empleadas para la inyección intra-articular deben tener un calibre mínimo de 20G. Algunos estudios sugieren que factores que afectan a la viabilidad de las MSCs como la velocidad de inyección o la longitud de la aguja pueden variar dependiendo de la especie (Agashi, Chau y Shakesheff, 2009; Mamidi et al., 2012).

4. Mecanismos de acción de MSCs en la articulación

La gran mayoría de los mecanismos de acción de las MSCs resultan hasta el momento desconocidos. Sin embargo en un esfuerzo por desvelarlos, muchos de los avances han mostrado resultados que permiten interpretar mejor el potencial terapéutico de este tipo de células, tanto en la especie humana como en el resto de especies, incluida la equina.

4.1. Integración y diferenciación

Ante los primeros resultados favorables que se obtuvieron en el estudio de las MSCs, sus propiedades regenerativas fueron atribuidas principalmente a su capacidad de diferenciación. No obstante, con el paso de los años y los avances que se han logrado, se ha descubierto que solo un mínimo porcentaje es capaz de integrarse en el tejido y diferenciarse, lo cual no es suficiente para justificar los efectos beneficiosos observados (Prockop, 2007).

Algunos estudios han mostrado que las MSCs en la articulación son capaces de integrarse en tejidos como el menisco o la membrana sinovial, pero no en el cartílago (Murphy, Fink, Hunziker y Barry, 2003). Sin embargo, otros sí que han revelado anidamiento de estas células en el cartílago hasta 6 meses después de su inoculación (Mokbel et al., 2011).

Por todo ello, la capacidad de integración y diferenciación de las MSCs en las estructuras articulares, y su supervivencia, resultan todavía grandes incógnitas tanto en medicina humana como en veterinaria. A pesar de que se sigue considerando que este mecanismo participa en la acción terapéutica de las MSCs en las patologías articulares, actualmente se tiende a atribuir más protagonismo a los mecanismos paracrinos de estas células (Barry y Murphy, 2013).

4.2. Actividad paracrina

Esta actividad paracrina da lugar a efectos tróficos, anti-fibróticos, de quimioatracción e inmunomodulación (Kong, Zheng, Qin y Ho., 2017). Los efectos tróficos que pueden observarse se traducen principalmente, en mecanismos antiapoptóticos, de soporte y angiogénicos (Kong et al., 2017) (Figura 4). Esta capacidad que poseen las MSCs para limitar la apoptosis de otros tipos celulares (efecto anti-apoptótico) se debe a la expresión de diversos factores, especialmente en condiciones de hipoxia, como el factor de crecimiento hepatocítico (HGF), VEGF, IGF-1, el TGF- β , el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) o el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Rehman et al., 2004).

A su vez también presentan efectos de soporte, reclutando y manteniendo precursores de las células del tejido dañado a través de la secreción de determinados factores solubles como el stem cell factor (SCF), LIF, IL-6, factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y el factor derivado del estroma 1 (SDF-1) (Sugiyama, Kohara, Noda y Nagasawa, 2006). Por otro lado, los efectos angiogénicos se deben a la liberación de factores pro-angiogénicos, como bFGF, VEGF, el factor de crecimiento placentario (PIGF) o la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), combinados con los factores anti-apoptóticos anteriormente nombrados (Kinnaird et al., 2004; Rehman et al., 2004).

En el caso de los efectos anti-fibróticos, no se conocen en detalle pero se ha observado que la secreción de determinados factores como el bFGF y HGF por las MSCs contribuyen a evitar la fibrosis exagerada (Suga et al., 2009). Éstos, junto con la producción de moléculas inmunosupresoras que regulan la actividad de las células inflamatorias como la prostaglandina E2 (PGE2), la interleucina-10 (IL-10) y el óxido nítrico (NO), disminuyen el proceso de fibrosis (Seo y Jung, 2016).

A las MSCs también se les ha atribuido efectos de quimioatracción por su capacidad de secretar moléculas que favorezcan el reclutamiento y regulación de diversas células, muchas de las cuáles se encuentran involucradas en el proceso de inflamación. Algunas de las moléculas involucradas son CCL2 (MCP-1), CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL20, CCL26, CX3CL1, CXCL5, CXCL11, CXCL1, CXCL12 (SDF-1), CXCL8, CXCL2 y la CXCL10. Éstas actúan sobre diversos tipos de células entre las que se encuentran eosinófilos, basófilos, neutrófilos, linfocitos T y B, monocitos células natural killer (NK), células dendríticas y progenitores hematopoyéticos y endoteliales (da Silva Meirelles, Fontes, Covas y Caplan, 2009).

Otra de las propiedades que se ha observado que presentan las MSCs y que se le ha brindado gran importancia es su capacidad inmunorreguladora. En muchas de las patologías articulares como la osteoartritis, la presencia de diversas moléculas como las citoquinas proinflamatorias entre las que se encuentran el TNF- α , IFN- γ o la IL-1 β , entre otros, ponen en marcha la secreción de metaloproteinasas (MMPs) que inducen los procesos catabólicos que dan lugar a la degradación del cartílago. De esta manera se ha observado que individuos tratados con MSCs han experimentado una disminución de la expresión génica de estas moléculas como la IL-1 β , MMP-1 y MMP-13, y un aumento del supresor de señalización de citoquinas 1 (SOCS-1), proteína que actúa inhibiendo la transducción de la señales producidas por las citoquinas. Al mismo tiempo se ha observado un aumento de IL-1ra, la cual actúa inhibiendo la actividad proinflamatoria de las IL-1, y una disminución de desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 5 (ADAMTS-5), enzimas que participan en la destrucción del cartílago (Egan, Lawlor, Alexander y Wicks, 2003). Estos resultados apoyan la creencia de que las MSCs actúan reduciendo los efectos de la respuesta inflamatoria (Van Buul et al., 2012).

Por otro lado también se ha observado que el uso de MSCs, producía una disminución de la proliferación de linfocitos y de la producción de TNF- α y IFN- γ mediante la producción de factores antiinflamatorios e inmunomoduladores como TSG-6, IL-6 y PGE2 a niveles más altos de inflamación (Aggarwal y Pittenger, 2005; Djouad et al., 2007; Maggini et al., 2010; Carrade et al., 2012; van Buul et al., 2012), el cual es un grupo de factores solubles que inhiben la proliferación de células T (Carrade et al., 2012).

Todos estos efectos antiinflamatorios también se han reportado en estudios que incluyen modelos experimentales equinos. En uno de ellos, Frisbie et al. (2009) respaldaron el potencial antiinflamatorio de las MSCs en un ensayo clínico con 24 caballos, a los que se les indujo un quiste subcondral. De estos 24 animales, 8 serían tratados con BMMSCs autólogas (obtenidas del propio individuo). A pesar de que no observaron efectos significativos de las MSCs en la reparación de lesiones osteoartríticas, sí notaron una reducción de la inflamación en las articulaciones de los caballos tratados con MSCs (Frisbie et al., 2009). Por otro lado, Wilke, Nydam y Nixon (2007) sugieren que este carácter antiinflamatorio es transitorio. En su estudio, un grupo de caballos adultos con lesiones cartilaginosas inducidas en la articulación femorotibial fueron tratados con BMMSCs autólogas. A los treinta días tras la inoculación de MSCs, las lesiones que habían estado expuestas a estas células presentaban una mejor regeneración que los controles, un efecto que probablemente se puede atribuir a la reducción de la inflamación.

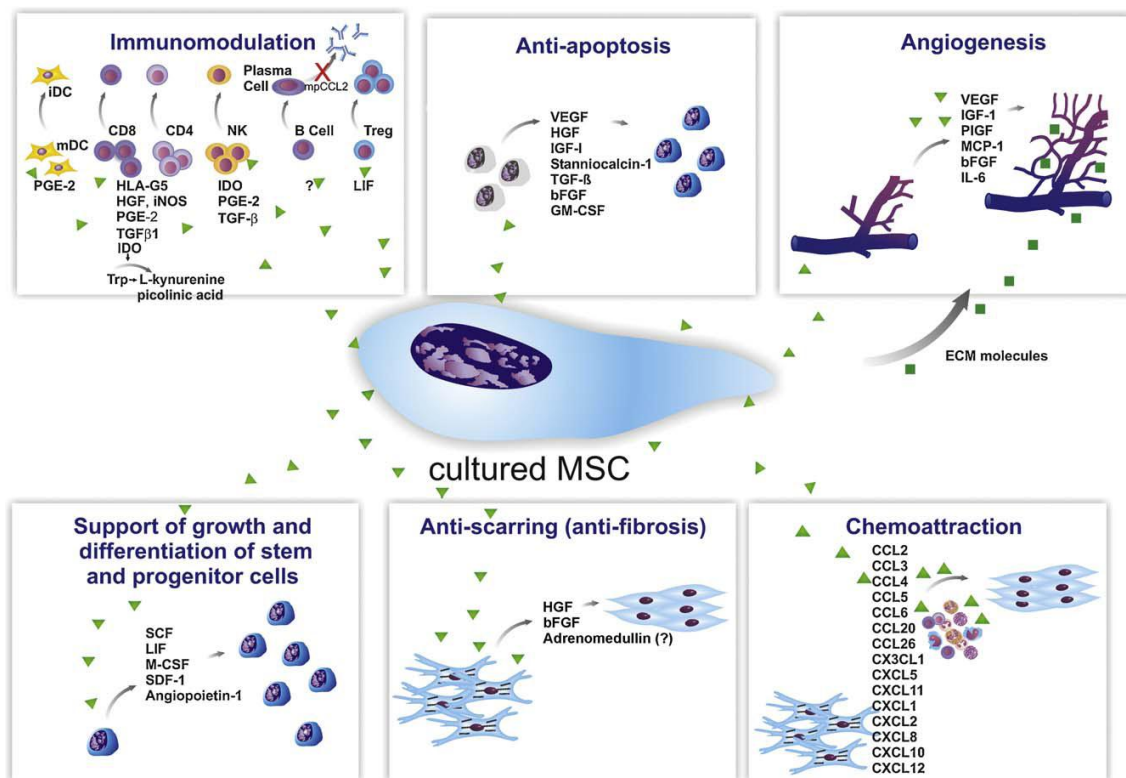


Figura 4: Propiedades paracrinicas de las MSCs (da Silva Meirelles et al., 2009)

Sin embargo, a los 8 meses tras la administración de MSCs, no se observaron diferencias histológicas, inmunocitoquímicas o bioquímicas entre las articulaciones tratadas y los controles (Wilke, Nydam y Nixon, 2007). Este hecho puede atribuirse al escaso poder de implantación de las MSCs al cartílago que da lugar a una actividad inflamatoria de corta duración (Murphy et al., 2003; ter Huurne et al., 2012; Desando et al., 2013; Whitworth y Banks, 2014).

5. Inmunogenicidad y seguridad terapéutica

Hasta ahora las MSCs se creían un grupo de células inmunoprivilegiadas. No obstante, descubrimientos recientes han puesto en tela de juicio estas creencias, dando lugar a una gran controversia respecto al tema. Ante estas dudas sobre la baja inmunogenicidad de las MSCs, se han llevado a cabo diversos estudios en los que se han evaluado los efectos de la administración de MSCs autólogas (obtenidas del propio individuo), alogénicas (obtenidas de individuos de la misma especie) y xenogénicas (obtenidas de individuos de especies diferentes). Uno de ellos reveló resultados que reflejaban una respuesta inmune ante la reexposición de las MSCs xenogénicas por incompatibilidad con el MHC I (Complejo Mayor de Histocompatibilidad I), viéndose un aumento de los linfocitos CD4+, hecho que no se observó con las MSCs alogénicas o autólogas (Pigott, Ishihara, Wellman, Russell y Bertone, 2013).

En otro estudio realizado *in vitro*, se observó que en MSCs alogénicas negativas a MHC II, si eran estimuladas con interferón, al cabo de 4 días daban lugar a una expresión marcadamente aumentada de MHC II (Schnabel, Pezzanite, Antczak, Felipe, y Fortier, 2014). Este descubrimiento puede tener repercusiones *in vivo* ya que al administrarse en ambientes con altos niveles de IFN- γ , como son los casos en los que la inflamación está presente, pueden perjudicar su eficacia (Lohan, Treacy, Griffin, Ritter y Ryan, 2017).

Joswig et al. (2017) realizaron un estudio comparado entre MSCs autólogas y alogénicas en articulaciones sanas observando que aunque tras una primera inyección no se apreciaban diferencias clínicas entre ambos grupos, en una segunda administración, los caballos tratados con MSCs alogénicas experimentaron una respuesta adversa significativamente mayor en comparación con el grupo tratado con MSCs autólogas, mostrando un recuento total elevado de células sinoviales nucleadas (Joswig et al., 2017). Lohan et al. (2017), sin embargo, defiende que la producción de una sinovitis mononuclear persistente tras la inyección intra-articular es independiente del origen de las MSCs (Lohan et al., 2017). Al mismo tiempo, un estudio realizado para valorar la posible respuesta inmune a la administración de MSCs alogénicas, mostró únicamente una respuesta inflamatoria que se resolvió a los 10 días tras la inyección, defendiendo así, la seguridad de esta estrategia terapéutica al haber una ausencia de efectos no deseados persistentes o reacciones de hipersensibilidad (Ardanaz et al., 2016).

6. Otras estrategias terapéuticas

6.1. Combinación con otros productos

Una de las estrategias que se han diseñado para favorecer la acción de MSCs es su uso combinado con otros productos. Uno de estos productos son los conocidos andamiajes, también llamados scaffolds. Estos andamiajes son unas estructuras tridimensionales de diversa naturaleza que actúan como soporte y vehículo de las MSCs (Song, Baksh y Tuan, 2004) (Figura 5). La función principal de los scaffolds en lesiones del cartílago

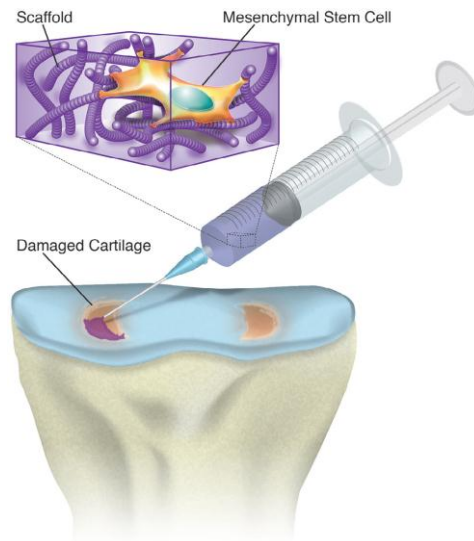


Figura 5: Aplicación de MSCs en scaffolds en un defecto del cartílago articular (Whitworth y Banks, 2014)

consiste en facilitar la deposición de matriz extracelular y promover la expresión de proteínas condrogénicas, dando lugar a una inducción y mantenimiento del fenotipo condrogénico de estas células (Lee y Atala, 2013).

Se han descrito scaffolds de diversa naturaleza entre los que se pueden encontrar scaffolds de agarosa (Zayed et al., 2018), matriz extracelular sinovial (Reisbig, Hussein, Pinnell y Bertone, 2018), o incluso celulosa bacteriana (Favi et al., 2013), entre otros.

Además de los scaffolds, también se han

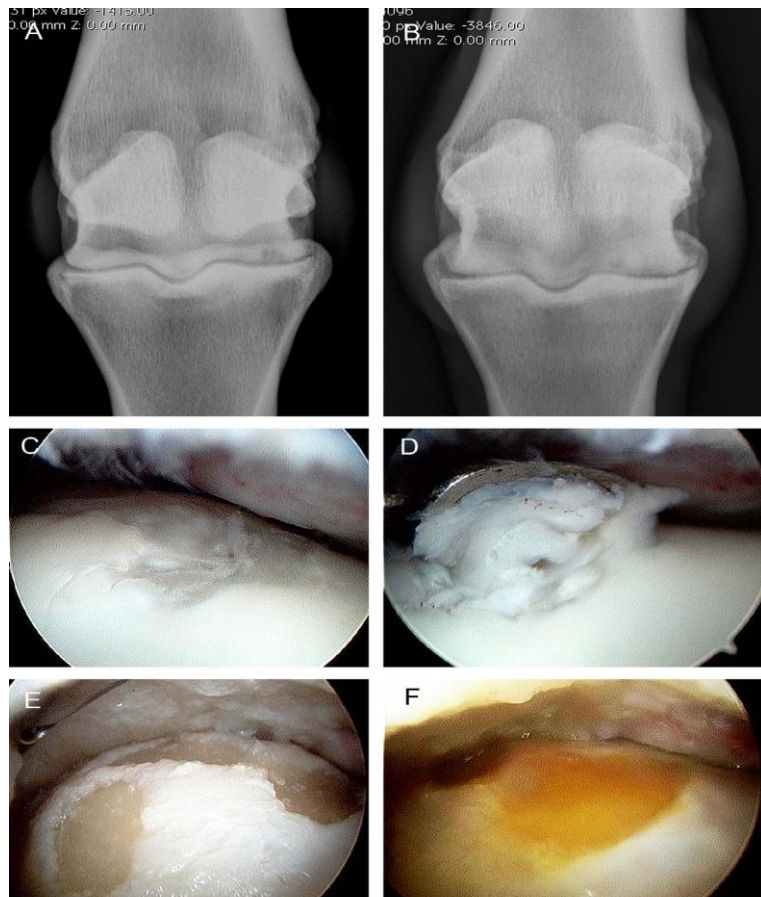


Figura 6: Tratamiento de un caso de osteoartritis en un caballo de mediana edad tratado con MSCs vehiculadas con PRP en la articulación metatarsofalángica. Las imágenes A y B muestran estrechamiento del espacio articular y remodelación ósea del hueso subcondral. La artroscopia muestra erosión del cartílago en la zona del cóndilo medial del tercer metatarsiano (imagen C) que es desbridada hasta el hueso subcondral sano (D). Las áreas desbridadas del cartílago (imagen E) son preparadas para la aplicación de MSCs vehiculadas por PRP (imagen F) (Ortved y Nixon, 2016)).

estudiado otros productos biológicos para vehicular MSCs. Este es el caso del plasma rico en plaquetas (PRP). Su interés reside en la gran cantidad de factores de crecimiento de los que dispone, los cuáles estimulan el proceso de condrogénesis (Figura 6). Sin embargo se ha descrito la formación de tejido óseo ectópico en algunos de los casos tratados (Goodrich et al., 2016). Esto se debe a que los factores de crecimiento presentes en el PRP además de estimular la condrogénesis también estimulan el proceso de osteogénesis (Perut et al., 2013). No obstante, en otros de los estudios realizados en los que se ha empleado esta combinación, no se ha visto este efecto adverso. Goodrich et al. (2016) lo atribuye al tiempo de duración del estudio, ya que defiende que la formación de tejido óseo ectópico es un efecto que tiene lugar a largo plazo (Goodrich et al., 2016).

6.6.2. MSCs primed

Otra de las estrategias terapéuticas que actualmente se encuentra en vías de estudio es el uso de las MSCs estimuladas o MSCs primed. Estas MSCs se exponen a ambientes inflamatorios, generalmente ante citoquinas proinflamatorias con el objetivo de estimularlas, dando lugar a una mayor expresión de su potencial inmunosupresor (Cassano, Schnabel, Goodale y Fortier, 2018). A pesar de que diversos autores defienden esta estrategia terapéutica, otros en cambio, sostienen que esta estimulación puede ser innecesaria ya que al inocularse en un contexto in vivo, las propias células inmunitarias del receptor realizarán esta función (Lohan et al., 2017).

A su vez, se ha observado que la estimulación con algunas de estas citoquinas, como el IFN- γ , dan lugar a una mayor expresión del MHC I, potenciando así, el carácter inmunogénico de estas células, el cual puede comprometer su efectividad terapéutica (Sivanathan et al., 2015).

En el caso de la especie equina, algunos estudios han mostrado resultados que inducen a pensar que el ambiente sinovial inflamatorio puede que no sea suficiente para la activación de este potencial. Sin embargo la exposición previa a su inoculación a ambientes con citoquinas pueden dar lugar a una estimulación de la expresión de MHC, aunque no de las moléculas coestimuladoras, lo cual pone en duda la posibilidad de que la exposición de las MSCs a este ambiente produzca un aumento de su inmunogenicidad (Barrachina et al., 2016).

Por otro lado, MSCs estimuladas con IFN- γ y TNF- α han mostrado una disminución en la producción de glicosaminoglicanos (GAGs) y en los niveles de agregano. Esto implica que las citoquinas proinflamatorias tienen un efecto inhibitorio sobre el potencial condrogénico de las MSCs, aunque la tasa de proliferación de estas células no se ha visto alterada (Broeckx et al., 2018). No obstante, otro de los ensayos experimentales llevado a cabo en un modelo equino,

ha revelado resultados beneficiosos que sugieren la superioridad terapéutica de las MSCs primed alogénicas frente a las MSCs sin previo estímulo, a pesar de que estas primeras han mostrado una ligera respuesta inflamatoria transitoria tras una segunda administración (Barrachina et al., 2018b).

VII. Conclusión

El ámbito de estudio de las MSCs en medicina regenerativa equina está experimentando un gran avance estos últimos años. Este tipo de células han mostrado poseer efectos terapéuticos beneficiosos debido especialmente a su capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora. A pesar de todo ello, todavía existe un cierto desconocimiento sobre su naturaleza y mecanismos de acción, por lo que deben seguir desarrollándose estudios que permitan un mayor esclarecimiento de dichos mecanismos. Esto permitirá en un futuro, que el uso de las MSCs, sea la herramienta terapéutica de elección en las artropatías equinas.

Conclusion

The study of MSCs in equine regenerative medicine is experiencing a great advance in recent years. This type of cells have been shown to have beneficial therapeutic effects, especially due to their anti-inflammatory and immunomodulatory properties. In spite of this, there is still a certain lack of knowledge about its nature and action mechanisms, which is the reason that studies should continue to be carried out to allow a greater clarification of these mechanisms. This will allow that the use of MSCs, would be the best choice to treat equine arthropathies in the future.

VIII. Valoración personal

Durante la realización de este trabajo he podido ampliar mi conocimiento sobre los avances que ha experimentado el uso de células madre, especialmente en ámbito de la clínica equina. Esto me ha brindado la oportunidad de llegar a comprender la magnitud del tema, ya que ante la ausencia de tratamientos efectivo frente a determinadas patologías articulares en caballos, las MSCs pueden convertirse en una de las terapias más revolucionarias de la clínica equina.

Además debo agradecer tanto personal como profesionalmente la colaboración y el apoyo que me han brindado mis tutores, tanto Antonio Romero Lasheras como Clementina Rodellar Penella, los cuales han sabido guiarme y ayudarme en la elaboración de este trabajo,

aportándome consejos muy valiosos, sin los cuales este trabajo no se hubiese podido llevar a cabo.

IX. Bibliografía

- Adams, M., Goodrich, L., Rao, S., Olea-Popelka, F., Phillips, N., Kisiday, J., & McIlwraith, C. (2013). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSC s) from the ilium and sternum: Are there differences? *Equine Veterinary Journal*, *45*(3), 372-375.
- Agashi, K., Chau, D. Y., & Shakesheff, K. M. (2009). The effect of delivery via narrow-bore needles on mesenchymal cells. *Regenerative medicine*, *4*(1), 49-64.
- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, *105*(4), 1815-1822.
- Amable, P. R., Carias, R. B. V., Teixeira, M. V. T., da Cruz Pacheco, Í., do Amaral, Ronaldo José Farias Corrêa, Granjeiro, J. M., & Borojevic, R. (2013). Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Research & Therapy*, *4*(3), 67-80.
- Ardanaz, N., Vazquez, F., Romero, A., Remacha, A., Barrachina, L., Sanz, A., . . . Prades, M. (2016). Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: Effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 65-74.
- Arnhold, S. J., Goletz, I., Klein, H., Stumpf, G., Beluche, L. A., Rohde, C., . . . Litzke, L. F. (2007). Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, *68*(10), 1095-1105.
- Avior, Y., Sagi, I., & Benvenisty, N. (2016). Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(3), 170-182.
- Barrachina, L., Remacha, A., Romero, A., Vázquez, F., Albareda, J., Prades, M., . . . Rodellar, C. (2016). Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *171*, 57-65.
- Barrachina, L., Remacha, A. R., Romero, A., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., . . . Rodellar, C. (2018a). Assessment of effectiveness and safety of repeat administration of proinflammatory primed allogeneic mesenchymal stem cells in an equine model of chemically induced osteoarthritis. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 241-258.

- Barrachina, L., Romero, A., Zaragoza, P., Rodellar, C., & Vázquez, F. J. (2018b). Practical considerations for clinical use of mesenchymal stem cells: From the laboratory to the horse. *The Veterinary Journal*, *238*, 49-57.
- Barry, F., & Murphy, M. (2013). Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nature Reviews Rheumatology*, *9*(10), 584-594.
- Bogers, S. H. (2018). Cell-based therapies for joint disease in veterinary medicine: What we have learned and what we need to know. *Frontiers in Veterinary Science*, *5*, 70-87.
- Bohannon, L., Owens, S., Walker, N., Carrade, D., Galuppo, L., & Borjesson, D. (2013). The effects of therapeutic concentrations of gentamicin, amikacin and hyaluronic acid on cultured bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Equine Veterinary Journal*, *45*(6), 732-736.
- Bongso, A., & Lee, E. H. (2005). Stem cells: Their definition, classification and sources. *Stem cells: From bench to bedside* (pp. 1-13) World Scientific.
- Broeckx, S., de Vries, C., Suls, M., Guest, D., & Spaas, J. (2013). Guidelines to optimize survival and migration capacities of equine mesenchymal stem cells. *J Stem Cell Res Ther*, *3*(3), 1-5.
- Broeckx, S., Spaas, J., Chiers, K., Duchateau, L., Van Hecke, L., Van Brantegem, L., . . . Pille, F. (2018). Equine allogeneic chondrogenic induced mesenchymal stem cells: A GCP target animal safety and biodistribution study. *Research in Veterinary Science*, *117*, 246-254.
- Bronzini, I., Patruno, M., Iacopetti, I., & Martinello, T. (2012). Influence of temperature, time and different media on mesenchymal stromal cells shipped for clinical application. *The Veterinary Journal*, *194*(1), 121-123.
- Cabezas, J., Rojas, D., Navarrete, F., Ortiz, R., Rivera, G., Saravia, F., . . . Castro, F. (2018). Equine mesenchymal stem cells derived from endometrial or adipose tissue share significant biological properties, but have distinctive pattern of surface markers and migration. *Theriogenology*, *106*, 93-102.
- Caplan, A. I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, *213*(2), 341-347.
- Carmona, J. U., & Giraldo-Murillo, C. E. (2007). Fisiopatología y tratamiento convencional de la osteoartritis en el caballo. *Vet Zootec*, *1*, 60-73.
- Carmona, J. U., & 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. Carrade, D. D., Lame, M. W., Kent, M. S., Clark, K. C., Walker, N. J., & Borjesson, D. L. (2012). Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. *Cell Medicine*, 4(1), 1-11.
- Carrade, D. D., Lame, M. W., Kent, M. S., Clark, K. C., Walker, N. J., & Borjesson, D. L. (2012). Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. *Cell Medicine*, 4(1), 1-11.
- Cassano, J. M., Schnabel, L. V., Goodale, M. B., & Fortier, L. A. (2018). Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 82-95.
- Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M., Schoeffler, C., Dohan, S. L., . . . Dohan, D. M. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 101(3), e56-e60.
- Chu, C. R., Fortier, L. A., Williams, A., Payne, K. A., McCarrel, T. M., Bowers, M. E., & Jaramillo, D. (2018). Minimally manipulated bone marrow concentrate compared with microfracture treatment of full-thickness chondral defects: A one-year study in an equine model. *Jbjs*, 100(2), 138-146.
- Clark, K. C., Kol, A., Shahbenderian, S., Granick, J. L., Walker, N. J., & Borjesson, D. L. (2016). Canine and equine mesenchymal stem cells grown in serum free media have altered immunophenotype. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(2), 245-256.
- Cokelaere, S., Malda, J., & van Weeren, R. (2016). Cartilage defect repair in horses: Current strategies and recent developments in regenerative medicine of the equine joint with emphasis on the surgical approach. *The Veterinary Journal*, 214, 61-71.
- da Silva Meirelles, L., Fontes, A. M., Covas, D. T., & Caplan, A. I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(5-6), 419-427.
- de Mattos Carvalho, A., Alves, A. L. G., Golim, M. A., Moroz, A., Hussni, C. A., de Oliveira, Patrícia Galvão Gomes, & 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.

- De Schauwer, C., Van de Walle, Gerlinde R, Van Soom, A., & Meyer, E. (2013). Mesenchymal stem cell therapy in horses: Useful beyond orthopedic injuries? *Veterinary Quarterly*, 33(4), 234-241.
- Delling, U., Lindner, K., Ribitsch, I., Jülke, H., & Brehm, W. (2012). Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76(1), 52-56.
- Desando, G., Cavallo, C., Sartoni, F., Martini, L., Parrilli, A., Veronesi, F., . . . Grigolo, B. (2013). Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Research & Therapy*, 15(1), 1-16.
- Devine, S. M., Bartholomew, A. M., Mahmud, N., Nelson, M., Patil, S., Hardy, W., . . . Stock, W. (2001). Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Experimental Hematology*, 29(2), 244-255.
- Devireddy, L. R., Boxer, L., Myers, M. J., Skasko, M., & Screven, R. (2017). Questions and challenges in the development of mesenchymal stromal/stem cell-based therapies in veterinary medicine. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 23(5), 462-470.
- Dhar, M., Neilsen, N., Beatty, K., Eaker, S., Adair, H., & Geiser, D. (2012). Equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: Isolation, identification, trilineage differentiation and effect of hyperbaric oxygen treatment. *Equine Veterinary Journal*, 44(5), 600-605.
- Djouad, F., Delorme, B., Maurice, M., Bony, C., Apparailly, F., Louis-Pleence, P., . . . Jorgensen, C. (2007). Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 9(2), 1-12.
- Egan, P. J., Lawlor, K. E., Alexander, W. S., & Wicks, I. P. (2003). Suppressor of cytokine signaling-1 regulates acute inflammatory arthritis and T cell activation. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 915-924.
- Favi, P. M., Benson, R. S., Neilsen, N. R., Hammonds, R. L., Bates, C. C., Stephens, C. P., & Dhar, M. S. (2013). Cell proliferation, viability, and in vitro differentiation of equine mesenchymal stem cells seeded on bacterial cellulose hydrogel scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1935-1944.
- Fortier, L. A., Potter, H. G., Rickey, E. J., Schnabel, L. V., Foo, L. F., Chong, L. R., . . . Nixon, A. J. (2010). Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 92(10), 1927-1937.

- Frandsen, R. D., Wilke, W. L., & Fails, A. D. (2009). Anatomy and physiology of farm animals. (pp. 87-104) Wiley-Blackwell.
- Frisbie, D. D., Kawcak, C. E., & McIlwraith, C. W. (2009). Evaluation of the effect of extracorporeal shock wave treatment on experimentally induced osteoarthritis in middle carpal joints of horses. *American Journal of Veterinary Research*, 70(4), 449-454.
- Frisbie, D. D., Kisiday, J. D., Kawcak, C. E., Werpy, N. M., & McIlwraith, C. W. (2009). Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(12), 1675-1680.
- Garvican, E. R., Cree, S., Bull, L., Smith, R. K., & Dudhia, J. (2014). Viability of equine mesenchymal stem cells during transport and implantation. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(4), 94-104.
- Gimble, J. M., Guilak, F., Nuttall, M. E., Sathishkumar, S., Vidal, M., & Bunnell, B. A. (2008). In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 35(3), 228-238.
- Gong, X., Sun, Z., Cui, D., Xu, X., Zhu, H., Wang, L., . . . Han, X. (2014). Isolation and characterization of lung resident mesenchymal stem cells capable of differentiating into alveolar epithelial type II cells. *Cell Biology International*, 38(4), 405-411.
- Goodrich, L. R., Chen, A. C., Werpy, N. M., Williams, A. A., Kisiday, J. D., Su, A. W., . . . Chu, C. R. (2016). Addition of mesenchymal stem cells to autologous platelet-enhanced fibrin scaffolds in chondral defects: Does it enhance repair? *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 98(1), 23-34.
- Govoni, K. (2015). HORSE SPECIES SYMPOSIUM: Use of mesenchymal stem cells in fracture repair in horses. *Journal of Animal Science*, 93(3), 871-878.
- Harrison, S., Vavken, P., Kevy, S., Jacobson, M., Zurakowski, D., & Murray, M. M. (2011). Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *The American Journal of Sports Medicine*, 39(4), 729-734.
- Horwitz, E., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., . . . Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393-395.
- Hsu, S., Huang, T., Cheng, S., Weng, S., Tsai, C., Tseng, C., . . . Yen, B. L. (2011). Chondrogenesis from human placenta-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*, 17(11-12), 1549-1560.

- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W. A., Claas, F. H., Willemze, R., . . . Kanhai, H. H. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, *102*(4), 1548-1549.
- Jiang, M. H., Li, G., Liu, J., Liu, L., Wu, B., Huang, W., . . . Li, C. (2015). Nestin kidney resident mesenchymal stem cells for the treatment of acute kidney ischemia injury. *Biomaterials*, *50*, 56-66.
- Joswig, A., Mitchell, A., Cummings, K. J., Levine, G. J., Gregory, C. A., Smith, R., & Watts, A. E. (2017). Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*(1), 42-53.
- Kasashima, Y., Ueno, T., Tomita, A., Goodship, A., & Smith, R. (2011). Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Veterinary Journal*, *43*(3), 288-294.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, *24*(5), 1294-1301.
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M., Lee, C., Barr, S., Fuchs, S., & Epstein, S. (2004). Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation Research*, *94*(5), 678-685.
- Kol, A., Walker, N., Galuppo, L., Clark, K., Buerchler, S., Bernanke, A., & Borjesson, D. (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.
- Kong, L., Zheng, L., Qin, L., & Ho, K. K. (2017). Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *Journal of Orthopaedic Translation*, *9*, 89-103.
- Lang, H. M., Schnabel, L. V., Cassano, J. M., & Fortier, L. A. (2017). Effect of needle diameter on the viability of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Veterinary Surgery*, *46*(5), 731-737.
- Lee, S. J., & Atala, A. (2013). Scaffold technologies for controlling cell behavior in tissue engineering. *Biomedical Materials*, *8*(1), 010201.

- Li, Q., Sun, W., Wang, X., Zhang, K., Xi, W., & Gao, P. (2015). Skin-Derived mesenchymal stem cells alleviate atherosclerosis via modulating macrophage function. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(11), 1294-1301.
- Lohan, P., Treacy, O., Griffin, M. D., Ritter, T., & Ryan, A. E. (2017). Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells and their extracellular vesicles: Are we still learning? *Frontiers in Immunology*, 8, 1626.
- Lojewski, X., Srimasorn, S., Rauh, J., Francke, S., Wobus, M., Taylor, V., . . . Schwarz, S. (2015). Perivascular mesenchymal stem cells from the adult human brain harbor no intrinsic neuroectodermal but high mesodermal differentiation potential. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(10), 1223-1233.
- Lombana, K. G., Goodrich, L. R., Phillips, J. N., Kisiday, J. D., Ruple-Czerniak, A., & McIlwraith, C. W. (2015). An investigation of equine mesenchymal stem cell characteristics from different harvest sites: More similar than not. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 67.
- Maggini, J., Mirkin, G., Bognanni, I., Holmberg, J., Piazzón, I. M., Nepomnaschy, I., . . . Vermeulen, M. (2010). Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*, 5(2), e9252.
- Mamidi, M. K., Singh, G., Husin, J. M., Nathan, K. G., Sasidharan, G., Zakaria, Z., . . . Das, A. K. (2012). Impact of passing mesenchymal stem cells through smaller bore size needles for subsequent use in patients for clinical or cosmetic indications. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 229-239.
- McIlwraith, C. (2015). Traumatic arthritis and posttraumatic osteoarthritis in the horse. *Joint disease in the horse* (2nd ed., pp. 33-49) Elsevier.
- McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D., Rodkey, W. G., Kisiday, J. D., Werpy, N. M., Kawcak, C. E., & Steadman, J. R. (2011). Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 27(11), 1552-1561.
- McLellan, J., & Plevin, S. (2014). Temporal release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) in the horse: A comparative in vitro analysis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 12(1), 44-53.
- Mercati, F., Pascucci, L., Curina, G., Scocco, P., Tardella, F. M., Dall'Aglio, C., . . . Ceccarelli, P. (2014). Evaluation of storage conditions on equine adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *The Veterinary Journal*, 200(2), 339-342.

- Mochizuki, T., Muneta, T., Sakaguchi, Y., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., & Sekiya, I. (2006). Higher chondrogenic potential of fibrous synovium–and adipose synovium–derived cells compared with subcutaneous fat–derived cells: Distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis & Rheumatism*, *54*(3), 843-853.
- Mokbel, A. N., El Tookhy, O. S., Shamaa, A. A., Rashed, L. A., Sabry, D., & El Sayed, A. M. (2011). Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *12*(1), 259-277.
- Monteiro, S. O., Bettencourt, E. V., & Lepage, O. M. (2015). Biologic strategies for intra-articular treatment and cartilage repair. *Journal of Equine Veterinary Science*, *35*(3), 175-190.
- Murata, D., Miyakoshi, D., Hatazoe, T., Miura, N., Tokunaga, S., Fujiki, M., . . . Misumi, K. (2014). Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. *The Veterinary Journal*, *202*(1), 53-61.
- Murphy, J. M., Fink, D. J., Hunziker, E. B., & Barry, F. P. (2003). Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, *48*(12), 3464-3474.
- Nixon, A. J., Begum, L., Mohammed, H. O., Huibregtse, B., O'callaghan, M. M., & Matthews, G. L. (2011). Autologous chondrocyte implantation drives early chondrogenesis and organized repair in extensive full-and partial-thickness cartilage defects in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research*, *29*(7), 1121-1130.
- Odorico, J. S., Kaufman, D. S., & Thomson, J. A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, *19*(3), 193-204.
- Oke, S., Aghazadeh-Habashi, A., Weese, J. S., & Jamali, F. (2006). Evaluation of glucosamine levels in commercial equine oral supplements for joints. *Equine Veterinary Journal*, *38*(1), 93-95.
- Ortved, K. F., & Nixon, A. J. (2016). Cell-based cartilage repair strategies in the horse. *The Veterinary Journal*, *208*, 1-12.
- Owens, S. D., Kol, A., Walker, N. J., & Borjesson, D. L. (2016). Allogeneic mesenchymal stem cell treatment induces specific alloantibodies in horses. *Stem Cells International*, *2016*, 5830103.
- Parker, R. A., Clegg, P., & Taylor, S. (2012). The in vitro effects of antibiotics on cell viability and gene expression of equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Veterinary Journal*, *44*(3), 355-360.

- Perut, F., Filardo, G., Mariani, E., Cenacchi, A., Pratelli, L., Devescovi, V., . . . Baldini, N. (2013). Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cytotherapy*, *15*(7), 830-839.
- Peters, A. E., & Watts, A. E. (2016). Biopsy needle advancement during bone marrow aspiration increases mesenchymal stem cell concentration. *Frontiers in Veterinary Science*, *3*, 23.
- Pietrzak, W. S., & Eppley, B. L. (2005). Platelet rich plasma: Biology and new technology. *The Journal of Craniofacial Surgery*, *16*(6), 1043-1054
- Pigott, J. H., Ishihara, A., Wellman, M. L., Russell, D. S., & Bertone, A. L. (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.
- Prockop, D. (2007). "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *82*(3), 241-243.
- Ranera, B., Ordovás, L., Lyahyai, J., Bernal, M., Fernandes, F., Remacha, A., . . . Cons, C. (2012). Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Veterinary Journal*, *44*(1), 33-42.
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., . . . March, K. L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, *109*(10), 1292-1298.
- Reisbig, N. A., Hussein, H. A., Pinnell, E., & Bertone, A. L. (2018). Evaluation of equine synovial-derived extracellular matrix scaffolds seeded with equine synovial-derived mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, *79*(1), 124-133.
- Rui, Y., Lui, P. P. Y., Li, G., Fu, S. C., Lee, Y. W., & Chan, K. M. (2010). Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells. *Tissue Engineering Part A*, *16*(5), 1549-1558.
- Sandoval, J., López, C., & Carmona, J. (2013). Therapies intended for joint regeneration in the horse. *Archivos De Medicina Veterinaria*, *45*(3), 229-236.
- Schnabel, L. V., Pezzanite, L. M., Antczak, D. F., Felipe, M. J. B., & Fortier, L. A. (2014). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, *5*(1), 13-26.

- Seo, B. F., & Jung, S. (2016). The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in prevention or treatment of excessive scars. *Stem Cells International*, 2016, 6937976.
- Sivanathan, K. N., Rojas-Canales, D. M., Hope, C. M., Krishnan, R., Carroll, R. P., Gronthos, S., . . . Coates, P. T. (2015). Interleukin-17A-induced human mesenchymal stem cells are superior modulators of immunological function. *Stem Cells*, 33(9), 2850-2863.
- Song, L., Baksh, D., & Tuan, R. (2004). Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: Cells, scaffold and biology. *Cytotherapy*, 6(6), 596-601.
- Suga, H., Eto, H., Shigeura, T., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., . . . Yoshimura, K. (2009). IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through ac-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Stem Cells*, 27(1), 238-249.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6), 977-988.
- Sundman, E. A., Cole, B. J., Karas, V., Della Valle, C., Tetreault, M. W., Mohammed, H. O., & Fortier, L. A. (2014). The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis. *The American Journal of Sports Medicine*, 42(1), 35-41.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.
- Taylor, S. E., & Clegg, P. D. (2011). Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 27(2), 263-274.
- ter Huurne, M., Schelbergen, R., Blattes, R., Blom, A., de Munter, W., Grevers, L. C., . . . Jorgensen, C. (2012). Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 64(11), 3604-3613.
- Tessier, L., Bienzle, D., Williams, L. B., & Koch, T. G. (2015). Phenotypic and immunomodulatory properties of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS One*, 10(4), e0122954.
- Van Buul, G., Villafuertes, E., Bos, P., Waarsing, J., Kops, N., Narcisi, R., . . . Van Osch, G. (2012). Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(10), 1186-1196.

- Vidal, M. A., & Lopez, M. J. (2011). Adipogenic differentiation of adult equine mesenchymal stromal cells. *Adipose-derived stem cells* (pp. 61-75) Springer.
- Vidal, M. A., Robinson, S. O., Lopez, M. J., Paulsen, D. B., Borkhsenius, O., Johnson, J. R., . . . Gimble, J. M. (2008). Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Surgery*, *37*(8), 713-724.
- Vidal, M. A., Walker, N. J., Napoli, E., & Borjesson, D. L. (2011). Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells and Development*, *21*(2), 273-283.
- Vinardell, T., Sheehy, E. J., Buckley, C. T., & Kelly, D. J. (2012). A comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources. *Tissue Engineering Part A*, *18*(11-12), 1161-1170.
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *17*(1), 387-403.
- Whitworth, D. J., & Banks, T. A. (2014). Stem cell therapies for treating osteoarthritis: Prescient or premature? *The Veterinary Journal*, *202*(3), 416-424.
- Wilke, M. M., Nydam, D. V., & Nixon, A. J. (2007). Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research*, *25*(7), 913-925.
- Zayed, M., Adair, S., Ursini, T., Schumacher, J., Misk, N., & Dhar, M. (2018). Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse. *Research in Veterinary Science*, *118*, 317-323.
- Zhang, Y., Sivakumaran, P., Newcomb, A. E., Hernandez, D., Harris, N., Khanabdali, R., . . . Hewitt, A. W. (2015). Cardiac repair with a novel population of mesenchymal stem cells resident in the human heart. *Stem Cells*, *33*(10), 3100-3113.
- Zrimšek, P., Kos, V. K., Mrkun, J., & Kosec, M. (2007). Diagnostic value of MMP-2 and MMP-9 in synovial fluid for identifying osteoarthritis in the distal interphalangeal joint in horses. *Acta Veterinaria Brno*, *76*(1), 87-95.