



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Tratamiento de la insuficiencia renal mediante células madre mesenquimales en
pequeños animales

Mesenchymal stem cell-based therapy for kidney diseases in small animals

Autor/es

Ane Arrillaga Pinedo

Director/es

Dra. Carolina Serrano Casorrán

Facultad de Veterinaria

2019

ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT	3
1. 1. Resumen	3
1. 2. Abstract	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	6
3. 1. Justificación	6
3. 2. Objetivos	6
4. METODOLOGÍA.....	6
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
5. 1. La enfermedad renal crónica en pequeños animales	7
5. 2. Las CMMs	9
5. 3. Obtención de las CMMs	9
5. 4. Fuentes de CMMs.....	10
5. 4. 1. Tejidos de los que pueden aislarse CMMs	10
5. 4. 2. CMMs autólogas vs. CMMs alogénicas.....	11
5. 5. Vías de administración de las CMMs.....	12
5. 5. 1. Ensayos realizados en gatos	12
5. 5. 2. Ensayos realizados en perros.....	16
5. 5. 3. Diferencias con respecto a los resultados obtenidos en roedores	17
5. 6. Situación actual de la terapia y perspectivas de futuro.....	18
5. 7. Protocolo de administración de CMMs por vía intraarterial	18
6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	21
6. 1. Conclusiones.....	21
6. 2. Conclusions.....	21
7. VALORACIÓN PERSONAL.....	22
8. BIBLIOGRAFÍA.....	23
9. ANEXOS	27

1. RESUMEN / ABSTRACT

1. 1. Resumen

En medicina veterinaria, actualmente, no hay tratamientos que permitan mejorar la función renal en aquellos pacientes con insuficiencia renal. Ante los resultados obtenidos en algunos modelos murinos, se ha tratado de evaluar la eficacia de la terapia mediante células madre mesenquimales (CMMs) en el tratamiento de esta patología en pequeños animales.

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre esta terapia, comparando los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados hasta el momento, para finalmente proponer un posible protocolo de administración de estas células.

Se trata de una terapia que aún debe demostrar una evidencia definitiva de su eficacia en pequeños animales, y aún presenta grandes interrogantes. No obstante, cada vez se conocen mejor las principales ventajas e inconvenientes de las diferentes fuentes y vías de administración.

Entre todos los tejidos que se han puesto a prueba, el tejido adiposo es el que presenta un mayor número de ventajas para la obtención de CMMs, debido a su abundancia, su facilidad de obtención y su potencial de proliferación de CMMs.

En cuanto a las vías de administración, en la especie felina, especie en la que más estudios se han realizado hasta el momento, la vía intrarrenal ha sido la menos exitosa, prefiriéndose las vías intravasculares, entre las cuales la vía intravenosa ha sido la más investigada. La vía de administración intraarterial es la menos estudiada y, pese a todos los inconvenientes que presenta, se trata de una vía prometedora; pues, no sólo permite la activación de los mecanismos de las terapias basadas en células, al igual que la vía intravenosa, sino que además permite la llegada de una mayor cantidad de células al riñón. Por ello, en el protocolo propuesto en este trabajo, se ha optado por la vía de administración intraarterial de CMMs obtenidas de tejido adiposo.

1. 2. Abstract

In veterinary medicine, nowadays, there are no treatments which allow the improvement the renal function in patients with kidney disease. Due to the results the mesenchymal stem cell-based therapy has shown in some murine models, its effectiveness has been tested in small animals.

The aim of this work is to carry out a bibliographic review on this therapy, comparing the results obtained in the different studies completed so far, to finally propose a possible protocol of MSC (mesenchymal stem cell) administration.

This therapy still needs to show definitive evidence of efficacy in small animals and there is still much to know about it. However, some of the most important advantages and disadvantages of the different sources and administration routes are already known.

Among all the tissues that have been tested, adipose tissue has the greatest number of advantages for obtaining MSCs, due to its abundance, the easy harvesting and its great potential of MSC proliferation.

When it comes to the administration routes, in the feline species, the one with the largest number of studies, the intrarrenal route has been the less successful one, with the intravascular routes being preferred, among which the intravenous route has been the most investigated one. Intraarterial route is the less studied one to date, and in spite of all of its disadvantages, it is a promising route, as it not only activates the mechanisms of cell-based therapies, but it also allows the arrival of a greater number of MSCs to the kidney. Thus, in the protocol proposed in this paper, the intraarterial administration route has been chosen for the administration of adipose tissue-derived MSCs.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal crónica (ERC) es la patología renal más frecuente tanto en perros como en gatos. Puede afectar a animales de cualquier edad, pero su prevalencia aumenta en pacientes geriátricos, pudiendo afectar hasta al 10% de los perros y hasta al 35% de los gatos de edades avanzadas (Brown, 2007). La esperanza de vida tras su detección puede ser muy variable, dependiendo de manera importante del estadio en el que se detecte la enfermedad.

Se define como la discapacidad estructural y/o funcional de uno o ambos riñones, que persiste durante largos periodos, normalmente durante tres meses o más (Suárez *et al.*, 2015; Vidane *et al.*, 2017). Histológicamente, se caracteriza por nefritis tubulointersticial y fibrosis.

La mayoría de tratamientos actuales de la ERC están destinados a retrasar la progresión de la enfermedad, siendo el trasplante renal la única terapia definitiva. En la búsqueda de nuevos tratamientos, recientemente se ha propuesto el uso de la medicina regenerativa, basándose en los alentadores resultados obtenidos en algunos modelos de roedores.

El concepto de medicina regenerativa hace referencia al uso de células o tejidos vivos para reparar o reemplazar tejidos u órganos cuya funcionalidad está afectada (Quimby y Dow, 2015). Este trabajo, se centra, concretamente, en la terapia mediante células madre mesenquimales (CMMs), que ejercen potentes efectos antiinflamatorios y antifibróticos (Quimby *et al.*, 2016), y parecen tener potencial tanto en el tratamiento de la insuficiencia renal aguda (IRA) como en el de la crónica (Quimby y Dow, 2015).

Las células madre son todas aquellas células capaces de generar células idénticas a sí mismas mediante división celular y que, a su vez, también pueden diferenciarse para dar lugar a cualquier tipo de célula especializada del organismo. Las CMMs son multipotenciales pero no pluripotenciales, es decir, sólo pueden diferenciarse a un número limitado de tipos celulares.

En veterinaria, hasta el momento, el campo en el que más se han estudiado y empleado las células madre ha sido el de las enfermedades musculoesqueléticas (Meyer-Lindenberg y Kilchling, 2018), principalmente en équidos y perros. Su aplicación en el tratamiento de las enfermedades renales es muy reciente, restringiéndose en la mayoría de casos a estudios experimentales y siendo su accesibilidad muy limitada o incluso nula como ocurre en nuestro país.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3. 1. Justificación

La ERC es una de las patologías más frecuentes en pequeños animales y, actualmente, puesto que en la gran mayoría de casos el trasplante renal no es factible, no existen tratamientos que permitan mejorar la función renal. De este modo, si la terapia con CMMs en estos pacientes fuese factible, segura y eficaz, supondría un gran avance en la medicina veterinaria. Por tanto, realizar una revisión bibliográfica sobre este tema para definir la situación actual y determinar la viabilidad de la técnica está plenamente justificado desde un punto de vista clínico.

3. 2. Objetivos

Este trabajo persigue dos objetivos principales:

1. Realizar una revisión bibliográfica acerca del uso de CMMs en el tratamiento de la insuficiencia renal en pequeños animales.
2. Elaborar un protocolo de administración de CMMs en animales con insuficiencia renal, con el fin de obtener un efecto terapéutico sobre el riñón.

4. METODOLOGÍA

La revisión bibliográfica se ha realizado en su mayoría mediante artículos y publicaciones obtenidos de bases de datos como PubMed o Elsevier, entre otras, teniendo en cuenta aquellos artículos publicados en los últimos 10-15 años; además de libros sobre nefrología y urología de pequeños animales. Las principales palabras clave empleadas para la búsqueda de dichos los artículos han sido: *mesenchymal stem cell therapy, kidney disease, bone marrow, adipose tissue, allogeneic, autologous, intravascular, intrarrenal, intravenous, intraarterial, paracrine, immunologic*.

El diseño del protocolo de administración de las CMMs se ha propuesto en base a la información recopilada a partir de las diferentes fuentes bibliográficas, así como del protocolo cedido por la Doctora Allyson Berent, que ya se está aplicando en el Animal Medical Center de EE.UU.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. 1. La enfermedad renal crónica en pequeños animales

Tal y como se ha indicado previamente, la ERC es una enfermedad muy prevalente en pequeños animales, lo que hace que despierte un gran interés entre los investigadores y clínicos que deben enfrentarse a ella tan asiduamente, especialmente en gatos, que la sufren con mayor frecuencia.

Tanto en la especie felina como en la canina, la causa puede ser congénita o adquirida, con un amplio diagnóstico diferencial. En el caso de los gatos, muchas veces no es posible identificar la causa, y el diagnóstico más frecuente es el de nefritis tubulointersticial, que se considera un proceso inflamatorio idiopático; en aquellos casos en los que puede hallarse un proceso subyacente, el linfoma, la enfermedad poliquística renal, la nefritis por PIF (Peritonitis Infecciosa Felina), la amiloidosis o las nefrolitiasis son las más frecuentes (Suárez *et al.*, 2015).

La sintomatología de la ERC suele ser inespecífica en su mayoría, es decir, hay otras muchas enfermedades que podrían provocarla. Entre los signos clínicos más frecuentes ocasionados por esta enfermedad se encuentran: los relacionados con el síndrome urémico (signos digestivos como anorexia, vómitos o diarreas; úlceras en la mucosa oral; hematemesis; desorientación, estupor, coma), la poliuria-polidipsia, la palidez de mucosas debida a la anemia, los signos oculares y neurológicos relacionados con la hipertensión arterial sistémica, los signos clínicos debidos a los cambios en el potasio sérico (debilidad muscular y ventroflexión del cuello en gatos en casos de hipopotasemia, y arritmias en casos de hiperpotasemia), la debilidad, el mal aspecto del pelo y la pérdida de condición corporal.

Además de la historia y exploración clínica, para el diagnóstico de esta enfermedad se cuenta con toda una serie de pruebas diagnósticas que nos permiten evaluar la función renal, tales como: la medición de la creatinina sérica, la medición de la densidad urinaria, el ratio proteína-creatinina en orina (UPC) y las pruebas de imagen, entre otras. Sin embargo, es importante tener en cuenta que todos estos marcadores no se alteran a la vez, sino que algunos requieren un menor grado de daño renal que otros para alterarse. La creatinina, que es uno de los marcadores más empleados, por ejemplo, no aumenta por encima de los límites establecidos hasta que el porcentaje de nefronas afectadas es superior al 75% (Cortadellas y Fernández del Palacio, 2012); la SDMA (dimetilarginina simétrica), sin embargo, parece que aumenta con tan sólo un 40% de reducción de la tasa de filtración glomerular (TFG) (Relford *et al.*, 2016). La

SDMA es un nuevo biomarcador que además de requerir un menor daño renal para aumentar, no se ve afectada por la delgadez, resultando una prueba más sensible en animales con pérdida de masa muscular (Relford *et al.*, 2016). Así, la *International Renal Interest Society* (IRIS) ha introducido dentro de sus recomendaciones el uso de esta molécula en casos en los que los niveles séricos de creatinina son normales o en pacientes con baja condición corporal.

En el *Manual de nefrología y urología clínica canina y felina* publicado por O. Cortadellas en 2010, el protocolo diagnóstico que se propone para aquellos pacientes sospechosos de ERC consiste en llevar a cabo una determinación de la creatinina sérica en primer lugar, para después en función de los valores obtenidos, realizar unas pruebas u otras con el fin de determinar si realmente está afectada la funcionalidad renal:

- Si la creatinina sérica es < 1,4 mg/dl en el perro y < 1,6 mg/dl en el gato: realizar pruebas adicionales, tales como el ratio UPC y pruebas de imagen, entre otras; ya que, dichos valores de creatinina pueden ser normales o puede tratarse de un paciente IRIS I.
- Si la creatinina sérica se encuentra entre 1,4-2 mg/dl en el perro y entre 1,6-2,8 mg/dl en el gato: evaluar la densidad urinaria. En aquellos casos en los que la densidad urinaria es < 1030 en el perro e < 1035 en el gato, clasificaremos al animal como IRIS II; mientras que en aquellos casos en los que esta densidad es > 1030 en perros o > 1035 en gatos, deberemos evaluar posibles causas pre- y postrenales de azotemia y reevaluar en 6 meses.
- Si la creatinina sérica es > 2 mg/dl en el perro y > 2,8 mg/dl en el gato: en aquellos casos en los que tengamos sospecha de azotemia pre- o postrenal, deberemos corregirla y reevaluar. En aquellos casos en los que se trate de una azotemia renal, clasificaremos al animal como IRIS III o IV.

La clasificación de los animales con ERC se lleva a cabo mediante la clasificación propuesta por la IRIS. Esta clasificación emplea la concentración de creatinina sérica para realizar un primer estadiaje de los pacientes, tal y como se muestra en la Tabla 1 (Anexo 1). En segundo lugar, la IRIS realiza una subclasificación de dichos animales en función de la proteinuria y de la presión arterial, tal y como se muestra en las Tablas 2 y 3 (Anexo 1), respectivamente.

Histológicamente, dejando a un lado las lesiones específicas, se ha determinado que la ERC se caracteriza por nefritis tubulointersticial y fibrosis (Reynolds y Lefebvre, 2013; Chakrabarti *et al.*, 2012), por lo que se cree que las CMMs, gracias a sus potentes efectos antiinflamatorios y antifibróticos, podrían contribuir a mejorar la función renal.

5. 2. Las CMMs

El gran interés de estas células para investigadores y clínicos se debe a tres motivos: 1) el fácil aislamiento a partir de la mayoría de órganos y tejidos adultos; 2) la alta capacidad proliferativa y de autorrenovación, lo que permite obtener la cantidad de células necesarias para su aplicación clínica; 3) las propiedades regenerativas, antiinflamatorias, antifibróticas e inmunomoduladoras en el lugar de la lesión. (Talavera *et al.*, 2017)

Estas células tienen capacidad de anidamiento (“homing” en inglés), es decir, tienen la capacidad de migrar a determinados tejidos, especialmente a aquellos que están dañados o bajo condiciones patológicas (Chamberlain *et al.*, 2007). De este modo, las células pueden llegar a los riñones aunque no sean administradas directamente en los mismos.

Inicialmente se pensaba que el mecanismo por el que las CMMs contribuían a la mejora de la función renal consistía en la sustitución de las células dañadas mediante diferenciación. Hoy en día, sin embargo, la mayoría de investigadores señalan que los mecanismos paracrinós e inmunomoduladores son los principales responsables del efecto terapéutico que ejercen estas células, pues el porcentaje de injerto de las mismas es muy pequeño, generalmente inferior al 1% (Tögel *et al.*, 2007). En un estudio llevado a cabo por Westenfelder y Tögel en 2011, por ejemplo, se observó que a las 72 horas post inducción de una IRA e infusión de las CMMs, estas células no podían detectarse en los riñones ni en otros órganos, pese a que en los tres meses posteriores a la administración de las mismas, la función renal se mantuvo normal y no se observó fibrosis intersticial, además de asociarse a una baja expresión de niveles de genes profibróticos.

En este punto, el objeto de estudio sería valorar en qué consisten dichos efectos paracrinós, es decir, los efectos que una célula ejerce sobre otras mediante la secreción de alguna sustancia. Estudios *in vitro* han demostrado que las CMMs pueden producir factores de crecimiento, citoquinas y mediadores antiinflamatorios, que mantienen o mejoran la función renal y disminuyen la inflamación renal (Quimby *et al.*, 2016).

5. 3. Obtención de las CMMs

Para la obtención de estas células, en primer lugar debe tomarse una muestra de tejido, que seguidamente es enviada al laboratorio en condiciones controladas y asépticas para su

procesado. Una vez allí, el tejido es sometido a procesos de disgregación mecánica, procesamiento enzimático y centrifugación con desechado del sobrenadante, para obtener la fracción de CMMs. Después, dicha fracción se cultiva en unas condiciones específicas, con el objetivo de aumentar el número de células. Cuando las células crecen y el cultivo alcanza la confluencia, son despegadas y de nuevo subcultivadas ampliando progresivamente su número en los distintos pases de cultivo hasta alcanzar la cantidad que se necesita y teniendo en cuenta que, si se realizan demasiados pases, las células en cultivo pueden sufrir alteraciones biológicas (Talavera *et al.*, 2017).

Hay dos tipos diferentes de productos de CMMs: a) CMMs expandidas en cultivo; y, b) fracción vascular estromal (FVS) o CMMs no expandidas. Los cultivos de CMMs contienen poblaciones relativamente homogéneas de CMMs; mientras que la FVS es el producto inicial de la digestión enzimática del tejido adiposo, conteniendo una mezcla de múltiples tipos celulares como adipocitos y células endoteliales que no dan lugar a CMMs. Actualmente, no se dispone de suficiente información para determinar si la FVS ofrece alguna ventaja o desventaja en las aplicaciones a las que se destina (Quimby y Dow, 2015).

5. 4. Fuentes de CMMs

5. 4. 1. Tejidos de los que pueden aislarse CMMs

Tanto en animales como en humanos, se han identificado muchos tejidos que podrían ser fuentes potenciales de células madre mesenquimales (Ribitsch *et al.*, 2010). A la hora de decantarnos por una fuente u otra, cuatro aspectos fundamentales son: la abundancia del tejido, la facilidad de obtención de las CMMs, y el potencial de proliferación y las características fenotípicas de las mismas, teniendo en cuenta que puede haber variaciones en función de la especie de la que se trate.

Las más utilizadas son el tejido adiposo (Quimby *et al.*, 2011; Quimby *et al.*, 2013; Parys *et al.*, 2016; Quimby *et al.*, 2016; Thomson *et al.*, 2019; Roselli *et al.*, 2016) y la médula ósea (Yoo *et al.*, 2010; Quimby *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2016; Roselli *et al.*, 2016); no obstante, hay otras muchas que pueden utilizarse, incluso tejidos extraembrionarios como la membrana amniótica (Vidane *et al.*, 2017) o el cordón umbilical (Lee *et al.*, 2017).

El tejido adiposo ofrece ventajas importantes con respecto a la médula ósea: 1) es más fácilmente accesible que la médula ósea, de modo que esta fuente es menos invasiva y conlleva un menor riesgo para el paciente; 2) suele estar disponible en grandes cantidades; 3) algunos estudios muestran que las células derivadas de tejido adiposo presentan un mayor potencial de proliferación (Webb *et al.*, 2012; Barberini *et al.*, 2014), aunque la fuente con mayor potencial de proliferación de CMMs podría variar entre especies (Quimby, 2019).

No obstante, tanto en el estudio de Webb *et al.* como en el de Barberini *et al.* se comprobó que las CMMs de ambas procedencias (tejido adiposo y médula ósea) son fenotípicamente muy similares y que ambas tienen la capacidad de diferenciarse en condrocitos, osteoblastos y adipocitos *in vitro*. Además, en medicina humana, hay diferentes estudios que muestran que las CMMs derivadas de médula ósea presentan una ventaja importante en comparación con las derivadas de otras fuentes. Se trata de la expresión del factor tisular (TF/CD142), un desencadenante clave de la coagulación que hace que estas células sean procoagulantes en presencia de sangre o plasma, y que según lo publicado en algunos artículos científicos, se encuentra en mayores niveles en las CMMs derivadas de tejido adiposo (Christy *et al.*, 2017 y Shiratsuki *et al.*, 2015) y en las derivadas de placenta decidua (Moll *et al.*, 2019) que en las derivadas de médula ósea. De ahí que algunos investigadores de humana señalen la importancia de testar la hemocompatibilidad de las células antes de la administración de las mismas a los pacientes, especialmente cuando van a emplearse vías intravasculares.

5. 4. 2. CMMs autólogas vs. CMMs alogénicas

Otra cuestión importante es si las CMMs provienen del propio paciente al que se le van a administrar o de un donante; en el primer caso se denominan autólogas y en el segundo alogénicas. El uso de células madre alogénicas es posible gracias a que se trata de células inmunoprivilegiadas, de modo que no se produce rechazo por parte del receptor.

La multitud de factores implicados en la mayoría de estudios realizados en pequeños animales, hace realmente complicado decantarse por uno de estos dos tipos de células; quizás, se requieran más estudios orientados específicamente a evaluar el potencial de unas y otras. En uno de los estudios realizados con tal propósito, llevado a cabo en perros a los que se les provocó experimentalmente un daño en la médula espinal, se observaron mejores resultados con las células autólogas que con las alogénicas, de hecho, la mayoría de las CMMs alogénicas desaparecieron de la médula en las cuatro siguientes semanas a su administración (Jung *et al.*, 2009).

Sin embargo, es importante tener en cuenta las ventajas de evitarse tener que obtener las células del paciente afectado, ya que ello conlleva manejo y estrés en la mayoría de casos; además, en un ensayo realizado por Quimby *et al.* en 2011, en el que se empleaban CMMs autólogas de médula ósea, observaron que la obtención de suficientes CMMs de cultivos de gatos mayores es difícil y lleva mucho tiempo. La existencia de estudios que apoyan la teoría de que las CMMs se ven afectadas por la uremia (Noh *et al.*, 2012; Idziak *et al.*, 2014; Klinkhammer *et al.*, 2014) sería otra razón que apoyaría el uso de CMMs alogénicas, ya que ello limitaría la obtención de estas células de pacientes urémicos.

5. 5. Vías de administración de las CMMs

Hay tres opciones principales de administración de estas células: la vía intrarrenal, la vía intravenosa y la vía intraarterial (mediante cirugía mínimamente invasiva). En el caso de las vías intravasculares existen múltiples opciones, habiéndose puesto a prueba varias de ellas: la vena cefálica en perros y gatos, la vena de la cola en roedores, la arteria femoral, la arteria renal, etc. La vía de administración ideal debería de cumplir al menos tres requisitos: debería de ser de fácil acceso, de modo que conlleve el menor manejo y estrés para el animal; debería de suponer el menor riesgo posible para el paciente; y, finalmente, debería de ser eficaz, permitiendo obtener el efecto terapéutico buscado sobre los riñones.

Al igual que otros muchos parámetros y cuestiones de este tratamiento, a día de hoy, aún está por determinar cuál es la mejor vía de administración. Hay múltiples razones que hacen que resulte realmente difícil sacar conclusiones acerca de ello a partir de la bibliografía: el limitado número de estudios, realizados en la mayoría de casos con un número limitado de animales, los múltiples factores implicados en cada uno de esos estudios (especie, fuente de las CMMs, cantidad de CMMs administrada, estrés, ...), y la falta de estudios que comparen unas vías con otras. No obstante, a continuación, se recogen los resultados obtenidos en los diferentes ensayos llevados a cabo en pequeños animales, para tratar de ver cuáles han sido las vías que mejores resultados han dado hasta el momento.

5. 5. 1. Ensayos realizados en gatos

En la especie felina, uno de los grupos de investigación más potentes en este tema es el de la Doctora Jessica M. Quimby, de la Universidad de Ohio. Su grupo ha publicado artículos sobre tres estudios llevados a cabo en gatos con ERC.

En el primero de ellos (Quimby *et al.*, 2011), realizado con dos gatos sanos, siete gatos con ERC y tres gatos control, emplearon la vía intrarrenal y CMMs autólogas de médula ósea. No observaron efectos adversos, ni inmediatos ni a largo plazo; y, al evaluar la función renal, vieron que tan sólo dos de los gatos IRIS II implicados en el estudio habían experimentado una modesta mejora de la TFG y una leve disminución de la concentración de creatinina sérica. Aunque determinaron que dichas mejoras observadas no eran estadísticamente significativas, comentan que esto podría atribuirse al pequeño número de animales implicados en este estudio. Sin embargo, pese a ser factible y aparentemente seguro, el número de sedaciones, de intervenciones y viajes al hospital, hizo que los autores decidieran que esta técnica resulta poco atractiva para su aplicación clínica.

En el segundo de ellos (Quimby *et al.*, 2013), realizado también en 16 gatos con ERC, decidieron apostar por otras vías de administración, decantándose por la vía intravenosa, y emplearon CMMs alogénicas de gatos SPF (*Specific Pathogen Free*) obtenidas de tejido adiposo. Hicieron tres grupos de animales: al primero ($n = 6$) le administraron 2×10^6 CMMs crioconservadas, al segundo ($n = 5$) 4×10^6 CMMs crioconservadas, y al tercero ($n = 5$) 4×10^6 CMMs cultivadas de tejido adiposo crioconservado. En el primer grupo, observaron pocos efectos adversos y una reducción de la creatinina sérica estadísticamente significativa, pero no hubo mejoría clínica. En el segundo grupo, la mayoría de los animales sufrieron efectos adversos notables (vómitos en 2/5 durante la infusión de las células, y aumento de la frecuencia respiratoria y esfuerzo en 4/5), y no hubo ningún cambio significativo en los parámetros de evaluación de la función renal. En el tercer grupo no observaron efectos adversos, pero al igual que en el segundo, tampoco se observó ninguna mejoría de los parámetros renales. Los autores concluyeron que el uso de una mayor dosis de CMMs tomadas directamente de crioconservación, fue la causa de los efectos adversos del tratamiento, siendo la explicación más probable una reacción inflamatoria instantánea mediada por la sangre, que daría lugar a una agregación celular al contacto con la sangre, con los subsecuentes tromboembolismos pulmonares.

En el tercero de ellos (Quimby *et al.*, 2016), en el que emplearon siete gatos con ERC, siguieron empleando la vía intravenosa (vena cefálica) y CMMs alogénicas de tejido adiposo. De los siete gatos implicados en este estudio, seis fueron tratados con CMMs y a uno se le administró un placebo (DPBS y heparina). A lo largo de seis semanas tras el tratamiento, no se observó ningún efecto adverso aparente, pero tampoco ningún efecto terapéutico, pues no se produjeron modificaciones de los valores de creatinina sérica ni de la TFG.

En otro estudio realizado en gatos con ERC por Vidane *et al.* en 2017, observaron resultados más positivos. Para su realización emplearon diez gatos, uno de ellos sano y los otros nueve con ERC en estadios II y III. A todos ellos les administraron CMMs alogénicas de membrana amniótica felina; pero, mientras que al gato sano se le administraron por vía intrarrenal, al resto se las administraron por vía intravenosa (vena cefálica), a todos ellos en dos administraciones separadas de 21 días. En el gato sano, no se observaron cambios ni en la exploración física, ni en la ecografía (salvo por unas partículas hiperecoicas que se observaron en la vejiga urinaria); pero el gato se estresó y se observó hematuria transitoria unas horas después de la inyección de las células. De este modo, los autores concluyeron que la vía intrarrenal no es apropiada para la administración de CMMs de membrana amniótica, debido a los diversos efectos adversos observados. En los gatos con ERC, se observó una mejora de la función renal (disminución de la creatinina sérica y de las concentraciones de proteína en orina, así como un aumento de la gravedad específica de la orina), y la condición clínica general de los gatos también mejoró (también según los propietarios). Por ello, los autores señalan que la administración intravenosa de CMMs derivadas de membrana amniótica tiene un efecto renoprotector y mejora la función renal en gatos con una ERC natural, estabilizando la condición clínica y la retrasando la progresión de la enfermedad.

Por tanto, parece que tanto los estudios realizados por el grupo de la Doctora Quimby como el realizado por Vidane *et al.*, coinciden en que la vía intrarrenal no es una vía adecuada para la administración de estas células, ya sea porque requiere más manejo (sedaciones, ...) y supone un mayor estrés para los animales, o por los efectos adversos observados. La vía intravenosa parece que ha tenido mayor éxito; ya que, además de que la administración de las CMMs por esta vía resulta más sencilla y puede realizarse sin necesidad de sedaciones y con menor estrés para los pacientes, ha tenido efectos positivos sobre la función renal en estudios como el de Vidane *et al.*

Son varios los investigadores que apuestan por la vía intravenosa, pues no sólo es más factible su aplicación en la clínica; sino que, tal y como indican Vidane *et al.*, los mecanismos implicados en las terapias basadas en células (paracrinosis, renoprotectoras, inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antifibróticas) son activados tras la infusión intravascular de CMMs.

Pero, obviamente, la vía intravenosa tampoco está exenta de desventajas. Por un lado, las infusiones de CMMs por esta vía pueden inducir tromboembolismos pulmonares, hallazgo observado en ratones (Tatsumi *et al.*, 2013; Furlani *et al.*, 2009) y probablemente también en gatos (Quimby *et al.*, 2013); aunque, tal y como se ha indicado previamente, la susceptibilidad

a la coagulación parece estar relacionada no sólo con la dosis de las CMMs sino que también con la fuente de las mismas. Por otro lado, esta vía de administración limita el número de células que llegan al órgano diana en el que se requieren, pues algunas de ellas pueden ser retenidas en la vascularización pulmonar (Eggenhofer *et al.*, 2012).

Otra de las vías que se ha testado en esta especie es la vía intraperitoneal, cuya seguridad fue evaluada en un estudio llevado a cabo por Parys *et al.* en 2016. En este estudio se emplearon diez gatos sanos; a cinco de ellos les administraron 1×10^6 CMMs de tejido adiposo subcutáneo por kg de peso vía intraperitoneal, y a los otros cinco se les administró PBS por la misma vía y en las mismas condiciones. Se concluyó que la vía intraperitoneal en gatos es, en general, segura y se asocia tan sólo con efectos adversos leves, autolimitantes y de corta duración. Tal y como se indica en este artículo, la principal ventaja que ofrecería esta vía en comparación con la vía intravenosa es que puesto que las células se dejan próximas a sus dianas, podrían llegar en mayor número a las mismas y ejercer un mayor efecto. Además, en teoría, esta vía no debería implicar riesgo de tromboembolismo, puesto que las células no se ponen en contacto con la sangre. Otra cuestión es que sea eficaz o no, algo que aún está por determinar en pequeños animales.

Hay también un estudio realizado por Roselli *et al.* en 2016, para evaluar los efectos de las CMMs en un modelo de IRA isquémica. Se realizó con 15 gatos adultos a los que se les provocó una isquemia unilateral durante 60 minutos. Una hora después de la reperusión, se les administraron 4×10^6 células de uno de estos tipos: CMMs de tejido adiposo a cinco de los gatos, CMMs de médula ósea a otros cinco, y fibroblastos a los cinco restantes. Además, se emplearon tres gatos que habían sufrido isquemia renal previamente como control. Desafortunadamente no se observaron diferencias en el porcentaje de gatos que desarrollaron IRA, ni en la gravedad específica de la orina, ni en la proteinuria, ni en la TFG, ni en la histología.

Muy recientemente, a principios de este año 2019, Thomson *et al.* han publicado un artículo acerca del uso de la vía intraarterial para la administración de CMMs en gatos, tratándose de la primera publicación que emplea esta vía de administración en la especie felina. En este estudio participaron cinco gatos con ERC en estadio III, a los que se les administraron CMMs autólogas de tejido adiposo a través de la arteria renal, vía arteria femoral o carótida y bajo guía fluoroscópica. El procedimiento se llevó a cabo con éxito en todos los pacientes y durante el estudio no se observaron efectos adversos severos en ninguno de ellos. Los autores concluyeron que la infusión intraarterial de CMMs en la arteria renal en gatos con ERC es

factible y segura en el periodo de tres meses tras la intervención; sin embargo, la eficacia y la seguridad a largo plazo están aún por determinar.

La principal ventaja que ofrece la vía intraarterial con respecto a la vía intravenosa es que permite que las células lleguen directamente al riñón, de modo que permite la llegada de una mayor cantidad de las mismas, cabiendo esperar una mayor eficacia del tratamiento. Un meta-análisis de 21 estudios (Wang *et al.*, 2012) realizados en roedores sobre el tratamiento de daños renales con CMMs administradas por diferentes vías, mostró disminuciones significativas de la concentración sérica de creatinina tras el tratamiento, y la vía intraarterial se asoció con una mayor disminución de dicha concentración que la vía intravenosa o la intrarrenal.

No obstante, tal y como redactan Thomson *et al.*, esta vía también tiene algunos inconvenientes o limitaciones. Una de las principales es que requiere anestesia general, lo cual puede aumentar el daño renal debido a la hipotensión producida por la misma. Cabe destacar también que pueden producirse múltiples complicaciones, tales como hemorragias, daños en la circulación, embolización, etc. Además, se requiere una incisión en piel de 1-1,5 cm, y el hecho de que la arteria deba ser ligada tras el tratamiento hace más difícil el futuro uso de la misma. A todo ello hay que sumarle que se trata de una técnica que requiere de personal altamente especializado y entrenado, así como de equipo específico, todo lo cual hace que su coste sea mayor que el de las otras vías de administración descritas previamente.

5. 5. 2. Ensayos realizados en perros

En esta especie, al ser las enfermedades renales menos prevalentes, se ha investigado menos sobre el uso de las CMMs para el tratamiento de las mismas. A día de hoy, tan sólo hay dos ensayos realizados en modelos de IRA inducida, y otro realizado en perros sanos.

En 2011, Yoo *et al.* realizaron un ensayo con dos perros sanos, con el objetivo de averiguar cómo se comportaban estas células. Emplearon CMMs alogénicas de médula ósea marcadas con partículas de hierro supermagnéticas (SPIO), y las inyectaron en la arteria femoral por cirugía mínimamente invasiva. Las principales conclusiones de este trabajo fueron: 1) que mediante la cateterización de la arteria femoral las CMMs pueden localizarse en la arteria renal con éxito; y 2) que las células marcadas con SPIO pueden verse en la corteza renal por resonancia magnética, aunque desaparecían a los 8 días tras ser administradas. A nivel renal, observaron trazas de proteína y glucosa al principio y al tercer día, así como algunas lesiones difusas importantes; a pesar de todo ello la función renal se mantuvo normal, lo que se asocia

a que las CMMs sólo se administraron en uno de los lados en cada perro. También se produjo un aumento significativo de las enzimas ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) durante la primera semana, así como lesiones histopatológicas en el hígado.

En 2016, Lim *et al.* llevaron a cabo un ensayo con seis perros a los que previamente les indujeron una IRA con cisplatino. A tres de ellos, les administraron CMMs autólogas de médula ósea suspendidas en una solución salina a través de la vena cefálica, y a los otros tres les proporcionaron sólo solución salina. En este caso, aunque las células también estaban marcadas con SPIO, no pudieron detectarse mediante resonancia magnética; sin embargo, sí que pudieron detectarlas durante el análisis histopatológico (realizado en el día cuatro) en los glomérulos, con la tinción azul de prusia. Los hallazgos más relevantes fueron un menor grado de infiltración de células inflamatorias y de fibrosis en el grupo que recibió las CMMs (aunque la puntuación no fue muy diferente entre un grupo y otro), y una mayor proliferación de RTECs (células epiteliales tubulares renales) también en este grupo. Pese a todo ello, no se consiguió una mejora de la función renal.

En 2017, Lee *et al.* realizaron un nuevo estudio en perros a los que se les provocó una IRA experimentalmente con gentamicina y cisplatino, y ésta fue al parecer la primera vez en la que se obtuvieron efectos terapéuticos en un modelo de IRA canino. Emplearon un total de 11 perros; a tres de ellos les administraron CMMs de cordón umbilical canino por vía intrarrenal, y a los ocho restantes PBS por la misma vía. Los niveles séricos de BUN y creatinina mejoraron tras la administración de CMMs, y la histología mostró que los animales tratados con CMMs mostraban menos lesiones. Así, todos los animales tratados con CMMs sobrevivieron hasta el momento de la eutanasia, mientras que seis de los ocho perros que recibieron PBS murieron.

Por tanto, en el caso de los perros, hasta el momento, la única vía que parece haber contribuido a la mejora de la función renal ha sido la vía intrarrenal. Quizás en esta especie sí que podría ser una vía adecuada para la administración de las CMMs; pues, en general, son animales que, en comparación con los gatos, toleran mejor la manipulación y el estrés.

5. 5. 3. Diferencias con respecto a los resultados obtenidos en roedores

En roedores, se han llevado a cabo diversos estudios en los que se ha podido observar un efecto terapéutico sobre el riñón, y eso fue seguramente lo que impulsó las investigaciones en la medicina veterinaria e incluso en la humana. Sin embargo, en la gran mayoría de ensayos llevados a cabo en pequeños animales, no se ha conseguido reproducir estos resultados. La

mayoría de investigadores de pequeños animales señalan que estas diferencias se deben a que en el caso de los roedores la administración de las CMMs se lleva a cabo a los pocos días de inducirles una insuficiencia renal experimentalmente, mientras que en el caso de los gatos se realiza en animales en los que la enfermedad es crónica y lleva un tiempo de desarrollo (Quimby *et al.*, 2016). Hay quienes opinan que podría haber diferencias entre especies (Lim *et al.*, 2016).

5. 6. Situación actual de la terapia y perspectivas de futuro

Aunque es cierto que basándose en los modelos de enfermedad renal de roedores la terapia con CMMs tiene un gran potencial en la medicina veterinaria, aún debería considerarse experimental para el tratamiento de la ERC e IRA canina y felina (Quimby, 2019).

Actualmente, esta terapia aún debe demostrar una evidencia definitiva de su eficacia. Además, aún quedan muchas cuestiones por determinar, tales como la fuente óptima de obtención de CMMs, la dosis CMMs y el número de administraciones, la vía óptima de administración etc. Por tanto, se requieren más estudios para averiguar todas estas cuestiones que aún tienen grandes interrogantes.

5. 7. Protocolo de administración de CMMs por vía intraarterial

Una vez realizada la revisión bibliográfica, teniendo en cuenta toda la información recopilada y asumiendo que es necesario llevar a cabo más estudios, el protocolo de tratamiento con CMMs que se podría proponer en un animal con ERC sería la administración de CMMs alogénicas por vía intraarterial y bajo guía fluoroscópica.

A continuación, se describe un protocolo de administración de CMMs alogénicas por vía intraarterial y bajo guía fluoroscópica.

En primer lugar, se debe proceder a la obtención de dichas CMMs alogénicas, que procederán de donantes sanos. Para ello, estos animales se someten a una sedación y a una laparotomía. En la intervención, se realiza una incisión en el abdomen ventral craneal al ombligo, y se retira grasa falciforme. El tejido adiposo obtenido se introduce en unos tubos cónicos de 50 ml con 15 ml de PBS (tampón fosfato salino), que posteriormente son introducidos en un contenedor

validado y con control de la temperatura (2-8°C) que se envía a un laboratorio de procesamiento de células madre para el aislamiento de las CMMs, testar la viabilidad, la evaluación visual, la cuantificación y el control de calidad.

Una vez en el laboratorio, dicho tejido se procesa, siempre dentro de las primeras 36 horas tras su recolección, y se preparan dosis de 3×10^6 células, aunque dosis de entre $1,5$ y 6×10^6 células se consideran aceptables. Las células se ponen finalmente en un volumen final de 3 ml con PBS y se cargan en una jeringuilla estéril para su posterior inyección.

Los pacientes que van a recibir las CMMs deberán ingresar un día antes de la intervención quirúrgica, para proporcionarles fluidoterapia intravenosa y asegurar así una correcta hidratación previa a la anestesia. En el segundo día tras el ingreso, se someten a anestesia general y las CMMs se inyectan en la arteria renal izquierda o derecha, eligiéndose el lado de inyección en función del tamaño renal, y realizándose en el del más grande, o en caso de igualdad de tamaños, al azar. El acceso intraarterial se lleva a cabo desde una arteria periférica (carótida o femoral), de manera que en cada intervención se cambia de arteria de entrada.

Para el abordaje femoral, en primer lugar, se prepara asépticamente la región inguinal. Seguidamente, empleando una técnica estéril, se realiza una incisión de 2 cm sobre la arteria femoral, y ésta se diseca y se aísla mediante suturas. El introductor que se emplea como vía de acceso se coloca en la arteria empleando la técnica Seldinger (Anexo 2, Imagen 1), la cual requiere del siguiente material (Anexo 2, Imagen 2): catéter intravascular, guía hidrofílica e introductor con dilatador (Anexo 2, Imagen 3). Primeramente, se punciona la arteria femoral mediante un catéter intravascular de 22 gauges (Anexo 2, Imagen 4), a través del cual se avanza una guía hidrofílica de 0,018" (Anexo 2, Imagen 5) hasta la arteria ilíaca externa y la aorta descendente. Después, tras retirar el catéter, se avanza sobre la guía un introductor de 4 Fr con dilatador (Anexo 2, Imagen 6), hasta colocar el introductor dentro de la luz arterial. Una vez colocado, se retira el dilatador (Anexo 2, Imagen 7) y el introductor se conecta a un lavador de suero para evitar la formación de trombos en su interior. De esta manera, el punto de acceso en la arteria femoral está listo para emplearse. Entonces, se introduce un microcatéter de 2,4 Fr sobre la guía de 0,018", avanzándose dicho microcatéter a través de la aorta (Anexo 2, Imagen 8) hasta alcanzar la arteria renal elegida. Alcanzada la arteria renal seleccionada, se inyecta en ella un volumen de 0,25-0,50 ml de contraste diluido al 50% (1:1 iohexol:solución salina estéril), para una angiografía digital, con el fin de asegurar la correcta localización del catéter y un adecuado flujo sanguíneo renal. Una vez comprobados, cualquier contraste que permanezca en el catéter se retira y se desecha, y el catéter se purga con 1 ml de solución

salina. Tras esto, se inyecta una alícuota de 3 ml de células madre en el catéter y así en la arteria renal durante 3 minutos empleando un filtro Hemonate, y se infunden otros 1,5 ml de solución salina para empujar dichas células fuera del catéter. Finalmente, se infunden 0,5 ml de una mezcla de contraste al 50% para confirmar la permeabilidad de la arteria. Una vez confirmada la permeabilidad, el catéter y el introductor se retiran, y se procede a suturar el orificio de entrada en la arteria para evitar sangrado. La incisión realizada en la piel se cierra con una sutura de poliglecaprona 25.

Para el abordaje carotídeo, el paciente se coloca en decúbito dorsal, y el cuello se estira y se prepara asépticamente. A continuación, se realiza una incisión de 3 cm en el surco yugular derecho, entre la vena yugular y la tráquea, y se procede a la identificación de la vaina carotídea para aislar la arteria carótida. Al igual que en el caso anterior, se aísla la arteria y se coloca introductor de 4 Fr mediante la técnica Seldinger. El acceso a la arteria renal desde carótida se realiza con el mismo material que en el caso de la arteria femoral, y lo que varía es únicamente la dirección de navegación endovascular, ya que en este caso debe ser hacia aorta abdominal hasta alcanzar las arterias renales. El cierre del acceso también se realiza de la misma manera que en el caso anterior.

A los 14 días, se realiza una nueva infusión de CMMs autólogas mantenidas en crioconservación.

Durante todos los procedimientos, se realiza una monitorización anestésica estándar, y las presiones arteriales medias se mantienen por encima de 60 mmHg. Tras la recuperación anestésica, los animales se hospitalizan durante 24 horas y se mantienen con fluidoterapia intravenosa. Asimismo, se les administra buprenorfina cada 6-8 horas como analgésico hasta su salida del hospital.

Para el seguimiento del paciente, se realiza una exploración del mismo en cada una de sus visitas al veterinario (días 0, 2, 14, 30, 60 y 90), se mide la creatinina sérica pre y postoperatoria en cada administración de CMMs, se realiza un hemograma completo, una bioquímica, un urianálisis, un cultivo urinario, el ratio proteína/creatinina en orina (UPC) y una medición de la presión sanguínea en los días 30, 60 y 90, y en el día 90 se realiza también un test de aclaramiento de iohexol. Además, se les pide a los propietarios que monitoricen a sus animales en casa, prestando especial atención al posible dolor abdominal, al apetito, a la pérdida de peso, al estado de ánimo, al nivel de energía, al consumo de agua, a la micción, a los vómitos y a la calidad de vida global.

6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

6. 1. Conclusiones

- La terapia con CMMs podría tener un gran potencial en el tratamiento de la IRA y ERC canina y felina, pero por ahora debe considerarse experimental, pues aún debe demostrar una evidencia definitiva de su eficacia.
- Todas las fuentes y vías de administración de CMMs ofrecen ventajas e inconvenientes, sin existir aún un consenso de cuáles son las más recomendables.
- El tejido adiposo, debido a su abundancia, su facilidad de obtención y su elevado potencial de proliferación de CMMs parece ser uno de los orígenes preferidos, si bien es cierto que hay estudios que señalan que las CMMs derivadas de médula ósea tienen una menor expresión de factor tisular, factor implicado en la coagulación.
- Una de las vías de administración más empleadas ha sido la intravenosa, que pese a ser más factible su aplicación clínica y permitir la activación de ciertos mecanismos, puede provocar tromboembolismos pulmonares y limitar el número de células que llegan a su diana.
- La vía intraarterial permite la llegada de un mayor número de CMMs a su diana, cabiendo esperar de ella una mayor eficacia; pero requiere anestesia general, y se precisa de un equipo específico y personal altamente especializado.
- En gatos, la vía intrarrenal ha tenido poco éxito, y la mayoría de estudios han optado por la vía intravenosa; muy recientemente se ha puesto a prueba la vía intraarterial. En perros, sin embargo, la única vía que parece haber demostrado eficacia hasta ahora es la intrarrenal.
- Teniendo en cuenta la información disponible hasta el momento, el protocolo propuesto consistiría en administrar CMMs alogénicas, obtenidas de tejido adiposo y administradas de manera intraarterial.

6. 2. Conclusions

- MSC-based therapy could have a great potential for the treatment of canine and feline AKI (acute kidney injury) and CKD (chronic kidney disease), but should be considered experimental yet, as definitive evidence of efficacy is still needed.
- All the sources and administration routes offer advantages and disadvantages, and there is still no consensus on which are the best.

- Adipose tissue, due to its abundance, the easy harvesting and its great potential of MSC proliferation, seems to be one of the favourite sources; nevertheless, some studies show that bone marrow MSCs show a lower expression of tisular factor, which is involved in coagulation.
- Intravenous administration has been one of the most used ones. Despite it is more feasible and it induces certain mechanisms, it can lead to pulmonary thromboembolisms and it reduces the amount of cells that reach the kidney.
- Intraarterial administration allows the arrival of a greater number of MSCs to its target, which should lead to a higher therapeutic effect; however, it requires general anesthesia, specific equipment and highly specialised staff.
- In cats, the intrarrenal administration has not been really successful, and most of the studies have chosen the intravenous route; recently, the intraarterial route has been tested. In dogs, however, intrarrenal route seems to be the only one which has been effective so far.
- Considering the information available so far, the proposed protocol would consist of administering allogeneic MSCs, obtained from adipose tissue and administered intraarterially.

7. VALORACIÓN PERSONAL

El tema del trabajo era un campo completamente desconocido para mí, y cuando Carolina me lo propuso me encantó, porque siempre he sentido un gran interés por los avances terapéuticos, que brindan nuevas oportunidades a nuestros animales. Durante la búsqueda bibliográfica, he descubierto que aún queda mucho por investigar en este tema, pero confío en que algún día esta terapia se lleve a cabo con éxito, sea accesible para los diferentes propietarios, y permita aumentar la supervivencia de los animales afectados por insuficiencia renal.

La realización de este trabajo no sólo me ha permitido ampliar mis conocimientos sobre este tema, sino que también me ha ayudado a aprender cómo realizar una correcta búsqueda bibliográfica, a gestionar toda la información obtenida de las diferentes fuentes, a acostumbrarme a leer artículos científicos, a conocer más terminología científica en inglés, ...

En definitiva, creo que me ha aportado muchas cosas buenas, y que pese a haber supuesto una obligación más en este último año de carrera, ha merecido la pena su realización.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Barberini DJ, Freitas NPP, Magnoni MS, Maia L, Listoni AJ, Heckler MC, *et al.* Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(1):25.
2. Brown SA. Management of chronic kidney disease. En: Elliot J, Grauer F, editores. *BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology.* 2ª ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2007. p. 223-230.
3. Chakrabarti S, Syme HM, Brown CA, Elliott J. Histomorphometry of feline chronic kidney disease and correlation with markers of renal dysfunction. *Vet Pathol.* 2012;50(1):147-155.
4. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25(11):2739-2749.
5. Christy BA, Herzig MC, Montgomery RK, Delavan C, Bynum JA, Reddoch KM, *et al.* Procoagulant activity of human mesenchymal stem cells. *J Trauma Acute Care Surg.* 2017;83(1):164-169.
6. Cortadellas O, Fernández-del Palacio MJ. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal crónica (ERC) en el perro y el gato. Parte 1: evaluación del paciente con ERC. *Clin Vet Peq Anim.* 2012;32(4):215-223.
7. Cortadellas O. Manual de nefrología y urología clínica canina y felina. 1ª ed. Zaragoza: Servet editorial; 2010.
8. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, *et al.* Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol.* 2012;3(297):1-8.
9. Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, *et al.* Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe?: Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res.* 2009;77(3):370-376.
10. Idziak M, Pędzisz P, Burdzińska A, Gala K, Pączek L. Uremic toxins impair human bone marrow-derived mesenchymal stem cells functionality *in vitro*. *Exp Toxicol Pathol.* 2014;66(4):187-194.

11. Jung DI, Ha J, Kang BT, Kim JW, Quan FS, Lee JH, *et al.* A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J Neurol Sci.* 2009;285(1-2):67-77.
12. Klinkhammer BM, Kramann R, Mallau M, Makowska A, Van Roeyen CR, Rong S, *et al.* Mesenchymal stem cells from rats with chronic kidney disease exhibit premature senescence and loss of regenerative potential. *PLoS One.* 2014;9(3):1-12.
13. Lee SJ, Ryu MO, Seo MS, Park SB, Ahn JO, Han SM, *et al.* Mesenchymal stem cells contribute to improvement of renal function in a canine kidney injury model. *In Vivo.* 2017;31(6):1115-1124.
14. Lim CY, Han JI, Kim SG, Lee CM, Park HM. Evaluation of autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells on renal regeneration after experimentally induced acute kidney injury in dogs. *Am J Vet Res.* 2016;77(2):208-217.
15. Meyer-Lindenberg A, Kilchling T. Use of mesenchymal stemcells in dogs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2018;46(6):416-425.
16. Moll G, Ankrum JA, Kamhieh-Milz J, Bieback K, Ringdén O, Volk HD, *et al.* Intravascular mesenchymal stromal/stem cell therapy product diversification: time for new clinical guidelines. *Trends Mol Med.* 2019;25(2):149-163.
17. Noh H, Yu MR, Kim HJ, Jeon JS, Kwon SH, Jin SY, *et al.* Uremia induces functional incompetence of bone marrow-derived stromal cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(1):218-225.
18. Parys M, Nelson N, Koehl K, Miller R, Kaneene JB, Kruger JM, *et al.* Safety of intraperitoneal injection of adipose tissue-derived autologous mesenchymal stem cells in cats. *J Vet Intern Med.* 2016;30(1):157-163.
19. Quimby JM, Dow SW. Novel treatment strategies for feline chronic kidney disease: a critical look at the potential of mesenchymal stem cell therapy. *Vet J.* 2015;204(3):241-246.
20. Quimby JM, Webb TL, Gibbons DS, Dow SW. Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. *J Feline Med Surg.* 2011;13(6):418-426.
21. Quimby JM, Webb TL, Habenicht LM, Dow SW. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(2):48.

22. Quimby JM, Webb TL, Randall E, Marolf A, Valdes-Martinez A, Dow SW. Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. *J Feline Med Surg*. 2016;18(2):165-171.
23. Quimby JM. Stem Cell Therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2019;49(2):223-231.
24. Relford R, Robertson J, Clements C. Symmetric dimethylarginine improving the diagnosis and staging of chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2016;46(6):941-960.
25. Reynolds BS, Lefebvre HP. Feline CKD: Pathophysiology and risk factors — what do we know? *J Feline Med Surg*. 2013;15(S1):3-14.
26. Ribitsch I, Burk J, Dellling U, Geißler C, Gittel C, Jülke H, *et al*. Basic science and clinical application of stem cells in veterinary medicine. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2010;123:219-263.
27. Rosselli DD, Mumaw JL, Dickerson V, Brown CA, Brown SA, Schmiedt CW. Efficacy of allogeneic mesenchymal stem cell administration in a model of acute ischemic kidney injury in cats. *Res Vet Sci*. 2016;108:18-24.
28. Shiratsuki S, Terai S, Murata Y, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, *et al*. Enhanced survival of mice infused with bone marrow-derived as compared with adipose-derived mesenchymal stem cells. *Hepatol Res*. 2015;45(13):1353-1359.
29. Suárez M, Forcada Y, Cortadellas O, Aybar V. ¿Qué sabemos realmente de la enfermedad renal en los gatos?. AVEPA 2015 Formación Continuada [Internet]. 2015 [citado abr 2019]. Disponible en: https://avepa.org/pdf/proceedings/MEDICINA%20FELINA_PROCEEDINGS2015.pdf
30. Talavera J, Gil-Chinchilla JI, García D, Castellanos G, López-Lucas MD, Atucha NM, *et al*. Terapia con células madre en medicina veterinaria: conceptos generales y evidencias clínicas. *Clin Vet Peq Anim*. 2017;37(2):87-101.
31. Tatsumi K, Ohashi K, Matsubara Y, Kohori A, Ohno T, Kakidachi H, *et al*. Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;431(2):203-209.

32. Thomson AL, Berent AC, Weisse C, Langston CE. Intra-arterial renal infusion of autologous mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: phase I clinical trial. *J Vet Intern Med.* 2019;33(3):1353-1361.
33. Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(5):1626-1635.
34. Vidane AS, Pinheiro AO, Casals JB, Passarelli D, Hage MCFNS, Bueno RS, *et al.* Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent cells ameliorates and delays the progression of chronic kidney disease in cats. *Reprod Domest Anim.* 2017;52(2):316-326.
35. Wang Y, He J, Pei X, Zhao W. Systematic review and meta-analysis of mesenchymal stem/stromal cells therapy for impaired renal function in small animal models. *Nephrology.* 2012;18(3):201-208.
36. Webb TL, Quimby JM, Dow SW. *In vitro* comparison of feline bone marrow-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Feline Med Surg.* 2012;14(2):165-168.
37. Westenfelder C, Togel FE. Protective actions of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury: relevance to clinical trials. *Kidney Int Suppl.* 2011;1(3):103-106.
38. Yoo JH, Park C, Jung DI, Lim CY, Kang BT, Kim JH, *et al.* *In vivo* cell tracking of canine allogenic mesenchymal stem cells administration via renal arterial catheterization and physiopathological effects on the kidney in two healthy dogs. *J Vet Med Sci.* 2011;73(2):269-274.

9. ANEXOS

Anexo 1. Tablas de clasificación IRIS para la ERC

Estadio	Concentración de creatinina sérica	Características
I	< 1,4 mg/dl (p) < 1,6 mg/dl (g)	No azotémico
II	1,4-2 mg/dl (p) 1,6-2,8 mg/dl (g)	Azotemia leve
III	2,1-5 mg/dl (p) 2,9-5 mg/dl (g)	Azotemia moderada
IV	> 5 mg/dl (p y g)	Azotemia severa

Tabla 1. Clasificación de la ERC en base a la concentración de creatinina sérica en perros (p) y gatos (g).

Valor del ratio UPC		Subclase
Perros	Gatos	
< 0,2	< 0,2	No proteinúrico
0,2 - 0,5	0,2 - 0,4	Al límite
> 0,5	> 0,4	Proteinúrico

Tabla 2. Subclasificación de la ERC en base a la proteinuria.

Presión arterial sistólica (mmHg)	Subclase	Riesgo de futuro daño en órganos diana
< 140	Normotenso	Mínimo
140 - 159	Prehipertenso	Bajo
160 - 179	Hipertenso	Moderado
≥ 180	Severamente hipertenso	Elevado

Tabla 3. Subclasificación de la ERC en base a la presión arterial sistólica.

Anexo 2. Imágenes del material y del procedimiento descrito en el protocolo



Imagen 1. Acceso intraarterial mediante la técnica de Seldinger.

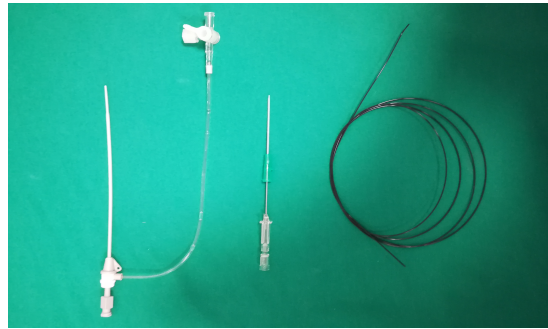


Imagen 2. Material de acceso intravascular. De izquierda a derecha: introductor con dilatador, catéter, guía hidrofílica.



Imagen 3. Introductor con dilatador empaquetado.

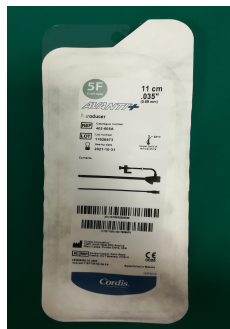


Imagen 4. Catéter intravascular para la entrada en la arteria de acceso.

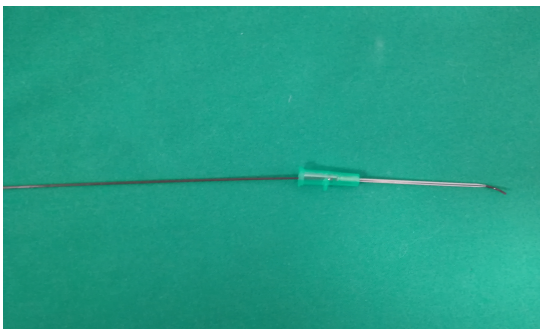


Imagen 5. Introducción de la guía a través del catéter.

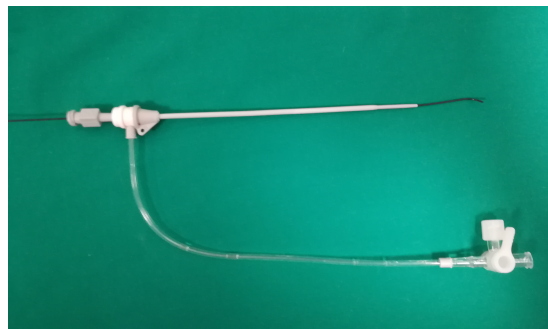


Imagen 6. Introducción del introductor con dilatador a través de la guía.

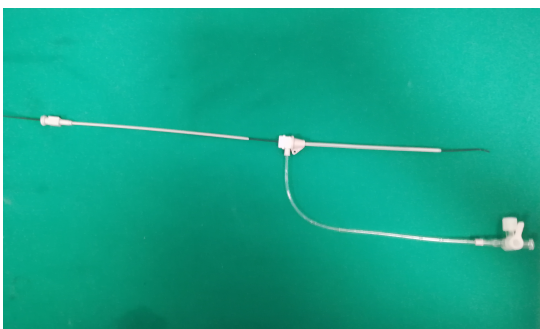


Imagen 7. Retirada del dilatador.

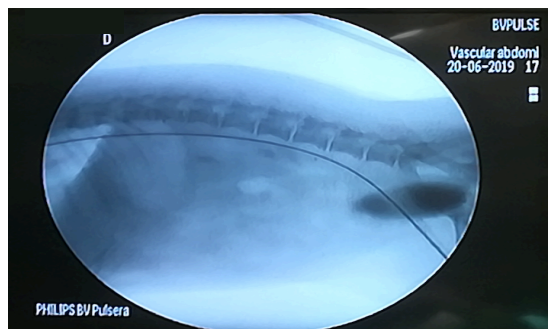


Imagen 8. Imagen fluoroscópica del avance del microcatéter por la arteria aorta en el abordaje femoral.