

Estudio clínico para el uso alogénico de células mesenquimales estromales expandidas de tejido adiposo en perros con artrosis

Paula Catarina Sánchez Pedreira

Tesis doctoral UDC 2021

Directores: Dr. Francisco Javier Blanco García

Dra. Ángela Andrea Vela Anero

Tutor: Dr. Francisco Javier Blanco García

Programa de doctorado en Biología Celular y Molecular



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



El Dr. Francisco Javier Blanco García y la Dra. Ángela Andrea Vela Anero

CERTIFICAN:

Que Dña. Paula Catarina Sánchez Pedreira, Graduada en Biología con máster en Biotecnología Avanzada, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo “Estudio clínico para el uso alogénico de células mesenquimales estromales expandidas de tejido adiposo en perros con artrosis”.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de doctor en Biología Celular y Molecular.

Dr. Francisco Javier Blanco García

Dra. Ángela Andrea Vela Anero

En A Coruña, 05 de Abril de 2021



Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a todos los dueños que voluntariamente han participado en el estudio, realizando las 7 visitas a lo largo de los 12 meses que duró la evaluación de sus mascotas, por su paciencia y por su colaboración en todas y cada una de las visitas. También mencionar aquellos dueños que donaron el tejido adiposo de sus mascotas para la obtención de las células que utilizaríamos después dentro de nuestro proyecto. Sin todo este apoyo desinteresado, este trabajo no habría podido salir adelante.

No puede faltar mi agradecimiento a las clínicas veterinarias Lejarza Centro Veterinario, Vets en Casa, Veterinaria Vilaboa y al Hospital Veterinario 4 de Octubre, que recogieron y facilitaron las muestras de tejido adiposo.

Asimismo, agradecer al Hospital Veterinario 4 de Octubre el que nos cedieran tanto parte de sus instalaciones para la realización de las visitas, así como aparatos como ecógrafo para la llevar a cabo las infiltraciones de células mesenquimales estromales (CMEs), o la realización de radiografías y obtención de sangre de los pacientes para analíticas. En especial, agradecer al responsable del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica Andrés Somaza Serantes y a María Lorenzo Toja, del Servicio de Diagnóstico por Imagen.

Por supuesto, una mención muy especial a Nuria Otero Queijas, responsable del Servicio de Rehabilitación en el Hospital Veterinario 4 de Octubre, por realizar el seguimiento de todos los perros del estudio. Muchas gracias por aportar parte de tu tiempo a este estudio y enseñarme cómo se realizan las exploraciones y cómo comunicarme con sus dueños.

En segundo lugar, pero no menos importante, me gustaría dar las gracias a mis dos directores de tesis: el Dr. Francisco Blanco García y la Dra. Ángela Vela Anero, por confiar en mí para desarrollar este proyecto tan distinto a los que se han llevado a cabo en las instalaciones del INIBIC. Gracias a vosotros he podido crecer dentro del mundo de la investigación. ¡Gracias!

Agradecer también al Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) por acogerme, y a su personal, por ayudarme durante estos últimos años de mi tesis.

En cuanto al personal de INIBIC, hay muchas personas que en los 5 años que pasé en el centro me han echado una mano con cualquier problema que me surgiera.

En el Área de Histomorfología: a Purl por enseñarme cómo realizar protocolos de tinciones de la forma más correcta; a Noa, por ayudarme en los primeros años de tesis a enfrentarme al mundo de las tinciones histológicas y, finalmente a Anna, por su simpatía y por su gran ayuda en mis últimos pasos dentro del área.

En el Área de Genómica: a Sara, por darme consejos a lo largo de mis peleas con las PCRs. A Nacho, por aconsejarme sin dudarle cuando estaba perdida en el loco mundo de la selección de primers para perro. A María Eugenia, por su gran paciencia y por inculcarme su sabiduría sobre todo lo relacionado con la qPCR. A Merce, porque siempre estuvo ahí cuando necesité ayuda con cualquier duda sobre genética. A Morena, ya que siempre que tenía cualquier problema me ayudaba y me apoyaba. A Andrea y Paula Ramos, porque cuando estaba perdida en la poyata de genómica ellas me echaban una mano sin pensarlo. A Durán, porque sin su ayuda en analizar mis datos me habría sido muchísimo más difícil continuar con mi tesis.

En cuanto al Área de Medicina Regenerativa, a Joana, por inculcarme que las mujeres tenemos el mismo valor que los hombres dentro de la ciencia, aunque no se nos reconozca de la misma forma, además de la gran importancia de la divulgación científica. A Elena, por su ayuda con todo lo relacionado con la gestión y por su apoyo en momentos de debilidad. A Cristina y Paula Casal, que durante años en el CICA fueron mis compañeras y compartíamos nuestros conocimientos en cultivos celulares y con las que, además, entablé una buena amistad. A Charlie, que siempre que lo necesitaba me echó un cable con cualquier duda que me surgiera. Y a la increíble Tamara, mi guía incondicional, no solo en cultivo celular, con la que aprendí todo lo que sé ahora, si no también en todas las áreas de mi tesis. Fue mi gran apoyo dentro del INIBIC, mi modelo a seguir en muchas situaciones, es la persona dentro del laboratorio sin la cual estaría muy perdida y desorientada, y la que me hizo continuar con fuerzas durante toda mi tesis. ¡Gracias Tamara!

Del grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa, también tengo que agradecer a Clara por inculcarme sus conocimientos al inicio de mi tesis doctoral y por ayudarme en todo lo que podía a lo largo de estos años. A María Piñeiro, que además de discutir conmigo todos los resultados que iba obteniendo, se convirtió en una muy buena amiga de la que admiro su forma a la hora de lidiar con los problemas y me ayudó a recomponerme millones de veces, ¡gracias!

A María Moreno que me ayudó con el material de laboratorio infinitas veces sin pensárselo y siempre acompañada de su buen humor. A Fani que cada vez que necesitaba realizar cualquier trámite ella estaba ahí presente.

Fuera del laboratorio he tenido la gran fortuna de tener el apoyo de personas excepcionales...

Mis amigas Elba, Lucía y Noemí, siempre estuvieron ahí para escuchar mis quejas y mis alegrías, y darme sus consejos a lo largo de mi tesis. Muchas gracias chicas.

Mi amigo y compañero de cultivo de células de perro, Iván, que no sólo escuchaba mis largas charlas sobre qué es lo que estaba haciendo durante gran parte de lo que duró mi tesis, si no que también me apoyó y me ayudó en muchas situaciones en las que estaba perdida.

A Adrián, que cada vez que tengo la oportunidad de verlo me hace reír y que me acogió, junto con Zeltia, en Suiza en un momento que me hacía falta tomar un respiro. A Jorge, que me cedió la imagen de Drako para mi tesis jejeje, y que me acepta tal y como soy, dándome consejos cuando los necesito.

A Ana y Joaquín que me acogieron en su familia, y que me brindaron su gran apoyo desde el principio.

A toda mi familia. A mi abuela Maruja y mi madrina María, con las que pasé muchas tardes contándoles cosas que me ocurrían en el laboratorio y que escuchaban sin rechistar dándome su apoyo. A mis abuelos José y Pilar, que siempre están ahí para contarme todo lo que han tenido que hacer a lo largo de su vida para cuidar de su familia. A mi tía María, gracias por tu comprensión y empatía siempre presente en ti. A mis primas Zeltia y Suevia, que desde pequeñas siempre hemos estado muy unidas, y las que me han mostrado muchas cosas sobre lo que es la vida real. A mi bisabuela Manuela y mi tío Antonio, que a pesar de que ya nos han dejado hace mucho tiempo, han contribuido a ser la persona que soy, y en los que cuando me encontré con dificultades me han venido a mi recuerdo.

A Durán. Sin el que habría tirado la toalla millones de veces. Es la persona que ha soportado en primera persona mis bajones y mis agobios de una manera muy estoica. Él no se rindió y gracias a eso he salido adelante de muchas situaciones en las que pensaba que seguir ya no valía la pena. Tengo tanto que agradecerle que podría escribir páginas y páginas sobre ello. Te quiero mucho.

A mis padres Pili y Luis, porque sin ellos no habría llegado a donde estoy. Porque me educaron de tal manera que he podido llegar a depositar una tesis doctoral. Me han apoyado desde el principio, a pesar de ser una carrera en la que ellos no veían mucho futuro. Gracias por haberme educado como lo habéis hecho, de una forma excepcional, y gracias a eso soy una persona crítica y con valores, que no habría sido capaz de superar muchas situaciones de no haber sido por eso. Gracias, gracias y gracias.

Y finalmente a Inés. Mi pequeña hermanita. ¿Qué haría yo sin ti? Te agradeceré infinitamente tu gran apoyo, el ayudarme a desestresarme en muchísimas situaciones, el estar ahí siempre que lo necesité, el no dudar en hablar conmigo en cualquier momento si lo necesitaba, en

ayudarme a distraerme cuando ya no podía más. Sin tu apoyo no habría sido capaz de terminar mi tesis. ¡¡Muchas muchas muchas muchas gracias Inés!!



Índice

<u>Abreviaturas</u>	I – III
<u>Índice de figuras</u>	V – VII
<u>Índice de tablas</u>	VIII – IX
<u>Resumen</u>	X – XII
<u>Introducción</u>	1 – 35
1. Tipos de articulaciones	1
2. La articulación sinovial	1 – 5
2.1. Cartílago articular hialino	2 – 4
2.2. Articulaciones sinoviales en perro	4 – 5
3. Artrosis	5 – 18
3.1. Clasificación de los tipos de OA en perros	8
3.2. Epidemiología y factores de riesgo de la OA en perros	8 – 10
3.3. Sintomatología y valoración de la OA en perros	10 – 16
3.3.1. Evaluación funcional	11
3.3.2. Examen físico	11 – 12
3.3.3. Ratio de sedimentación de los eritrocitos	12
3.3.4. Valoración radiográfica	12 – 15
3.3.5. Medida de la concentración de la proteína C reactiva	15 – 16
3.4. Tratamientos existentes para la OA en perro	16 – 18
3.4.1. Tratamientos no farmacológicos	16
3.4.2. Tratamientos farmacológicos	17
3.4.3. Tratamiento quirúrgico	17
3.4.4. Terapias regenerativas	17 - 18
4. Células madre	18 – 29
4.1. Células mesenquimales estromales (CMEs)	20 – 29
4.1.1. Tejidos fuente de CMEs	21 – 22
4.1.2. Tejido adiposo	22 – 24
4.1.3. Efecto paracrino de las CMEs	24 – 28
4.1.4. Efecto regenerativo de las CMEs	28 – 29
4.1.5. Regulación del uso de las CMEs como terapia celular	29
5. Modelo de perro en artrosis	30 – 35
5.1. Similitudes de la OA entre perros y humanos	30 – 31
5.2. Limitaciones del uso del modelo canino para la OA	31 – 32
5.3. Estudios de la OA en perro	32 – 34
5.4. Consideraciones éticas	34 – 35
<u>Material y métodos: Obtención y caracterización de las células</u>	41 – 55
1. Obtención y cultivo de las células procedentes de tejido adiposo	41 – 44
1.1. Obtención de muestras de tejido adiposo	41
1.2. Aislamiento y cultivo celular	41 – 42

1.3. Test de micoplasma	42 – 43
1.4. <i>Preplating</i>	43
1.5. Criopreservación	43 – 44
2. Caracterización de las células aisladas de tejido adiposo	44 – 55
2.1. Citometría de flujo	44 – 45
2.1.1. Comparación marcadores	45
2.2. Diferenciación	45 – 55
Osteogénesis	46
Adipogénesis	46
Condrogénesis	46 – 47
2.2.1. Técnicas de tinción citoquímica e histoquímica	47 – 51
2.2.1.1. Tinciones citoquímicas	47 – 48
Rojo Alizarina	47
<i>Oil Red O</i>	48
2.2.1.2. Tinciones histoquímicas	48 – 51
Hematoxilina-Eosina	48 – 49
Azul de Toluidina	49
Safranina O	49 – 50
Tricrómico de Masson	50 – 51
2.2.2. Técnicas de cuantificación de la expresión génica mediante <i>qPCR</i>	51 – 55
2.2.2.1. Extracción de ARN	51 – 52
Micromasas	51 – 52
Células en cultivo	52
2.2.2.2. Cuantificación y medidas de calidad del ARN	52
2.2.2.3. Síntesis ADN complementario	52
2.2.2.4. <i>PCR</i> a tiempo real (<i>qPCR</i>)	53 - 55
<u>Material y métodos: Evaluación clínica del tratamiento</u>	57 - 70
1. Pacientes incluidos dentro del estudio	57
2. Grupo inyección intraarticular (GI)	57 – 63
2.1. Criterios de inclusión/exclusión	57 – 58
2.2. Procedimiento seguido con los perros GI	59 – 63
2.2.1. Visita basal GI (VB _{GI})	59 – 60
2.2.2. Visita 0 GI (V0 _{GI})	60 – 62
2.2.3. Visita 1 GI (V1 _{GI})	62 – 63
2.2.4. Visitas 2, 3, 4, 5 y 6 GI (V2 _{GI} , V3 _{GI} , V4 _{GI} , V5 _{GI} y V6 _{GI})	63
2.2.5. Visita 7 GI (V7 _{GI})	63
3. Grupo control (GC)	64 – 65
3.1. Población perros GC	64
3.2. Procedimiento seguido con los perros GC	64 – 65
3.2.1. Visita basal GC (VB _{GC})	65

3.2.2. Visitas 2, 4 y 5 GC (V2 _{GC} , V4 _{GC} y V5 _{GC})	65
4. Grupo analítica (GA)	65 – 67
4.1. Población perros GA	66
4.2. Procedimiento seguido con los perros GA	66 – 67
5. Análisis estadístico	67 – 70
5.1. Evaluación de la evolución de los parámetros veterinarios del GI	67 – 69
5.1.1. Funcionalidad articular	67 – 68
5.1.2. Movilidad articular	68 – 69
5.1.3. Atrofia muscular	69
5.2. Evaluación de la evolución de las variables observadas por los dueños del GI	69 – 70
5.3. Evaluación del dolor de los perros del GC siguiendo los datos obtenidos de los dueños	70
5.4. Comparación GI vs. GC parámetros veterinarios	70
5.5. Comparación GI vs. GC EVA	70
<u>Resultados: Obtención y caracterización de las células</u>	72 – 81
1. Obtención y cultivo de las células procedentes de tejido adiposo	72 – 73
2. Caracterización celular	74 – 81
2.1. Citometría	74 – 76
2.2. Capacidad de diferenciación	74
2.2.1. Adipogénesis	74 – 76
Tinción citológica	74
Expresión génica	75 – 76
2.2.2. Condrogénesis	76 – 80
Tinciones histológicas	76 – 79
Expresión génica	79 – 80
2.2.3. Osteogénesis	80 – 81
<u>Resultados: Evaluación clínica del tratamiento</u>	83 – 99
1. Población de perros GI	83 – 85
2. Seguridad del tratamiento con CMEs alogénicas	85 – 87
2.1. Seguridad local	85 – 86
2.2. Seguridad sistémica	86 – 87
2.3. Seguridad general	87
3. Evaluación de las articulaciones tratadas con CMEs	88 – 95
3.1. Evaluación radiológica	88
3.2. Evaluación de la evolución de los parámetros veterinarios	88 – 93
3.3. Evaluación de las variables observadas por los dueños	93 – 95
4. Comparativa de GI vs. GC	95 – 99
4.1. Articulaciones tratadas	95
4.2. Valoración veterinaria	95 – 98
4.3. Valoración EVA por parte de los dueños	98 – 99

<u>Discusión: Obtención y caracterización de las células</u>	101 – 105
1. Obtención y caracterización de las células extraídas de tejido adiposo ...	101 – 105
1.1. Obtención de células	101 – 102
1.2. Marcadores de superficie	102 – 105
2. Diferenciación a tres linajes distintos	105
<u>Discusión: Evaluación clínica del tratamiento</u>	107 – 112
1. Seguridad inyección intraarticular con CMEs	107 – 109
1.1. Seguridad local	107
1.2. Seguridad sistémica	107 – 109
1.3. Seguridad general	109
2. Evaluación clínica tras la aplicación de las CMEs	109 – 111
2.1. Análisis radiológico del GI	109
2.2. Evaluación de la evolución del GI	110 – 111
3. Comparativa GC vs. GI	111 – 112
<u>Conclusiones</u>	114
<u>Bibliografía</u>	116 – 129
<u>Anexos</u>	131 – 161
Anexo cuestionarios	131 – 139
Veterinarios (cadera, codo y rodilla)	131 – 136
Dueños	137 – 138
Consentimiento informado	139
Anexo análisis de sangre	141 – 147
Tabla 26. Resultados analítica de sangre perro P03 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después	141
Tabla 27. Resultados analítica de sangre perro P04 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después	142
Tabla 28. Resultados analítica de sangre perro P05 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después	143
Tabla 29. Resultados analítica de sangre perro P06 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después	144
Tabla 30. Resultados analítica de sangre perro P07 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después	145
Tabla 31. Resultados analítica de sangre perro P08 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después	146
Tabla 32. Resultados analítica de sangre perro P09 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después	147
Anexo radiografías	149 – 155
Tabla 33. Radiografías del perro P03 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después	149
Tabla 34. Radiografías del perro P04 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después	150
Tabla 35. Radiografías del perro P05 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después	151

Tabla 36. Radiografías del perro P06 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después	152
Tabla 37. Radiografías del perro P07 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después	153
Tabla 38. Radiografías del perro P08 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después	154
Tabla 39. Radiografías del perro P09 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después	155
Anexo tablas	157 – 161
Tabla 40. Resultados del porcentaje de articulaciones que mejoran con respecto a la VB _{GI} (visita basal del grupo de animales con tratamiento de CMEs) frente a la V2 _{GI} , V4 _{GI} , V5 _{GI} y V7 _{GI} (visita 1 mes después del tratamiento, visita 3 meses después del tratamiento, visita 6 meses después del tratamiento y visita 1 año después del tratamiento, respectivamente)	157
Tabla 41. Resultados del porcentaje de articulaciones que se mantienen con respecto a la VB _{GI} (visita basal del grupo de animales con tratamiento de CMEs) frente a la V2 _{GI} , V4 _{GI} , V5 _{GI} y V7 _{GI} (visita 1 mes después del tratamiento, visita 3 meses después del tratamiento, visita 6 meses después del tratamiento y visita 1 año después del tratamiento, respectivamente)	157
Tabla 42. Resultados del porcentaje de articulaciones que empeoran con respecto a la VB _{GI} (visita basal del grupo de animales con tratamiento de CMEs) frente a la V2 _{GI} , V4 _{GI} , V5 _{GI} y V7 _{GI} (visita 1 mes después del tratamiento, visita 3 meses después del tratamiento, visita 6 meses después del tratamiento y visita 1 año después del tratamiento, respectivamente)	158
Tabla 43. Resultados del porcentaje de perros que mejoran en diferentes variables observadas por los dueños de los perros comparando la VB _{GI} (visita antes del tratamiento de CMEs) con respecto a V2 _{GI} , V5 _{GI} y V7 _{GI} (visita 1 mes después, visita 6 meses después y 1 año después del tratamiento respectivamente)	158
Tabla 44. Resultados del porcentaje de perros que se mantienen en diferentes variables observadas por los dueños de los perros comparando la VB _{GI} (visita antes del tratamiento de CMEs) con respecto a V2 _{GI} , V5 _{GI} y V7 _{GI} (visita 1 mes después, visita 6 meses después y 1 año después del tratamiento respectivamente)	159
Tabla 45. Resultados del porcentaje de perros que empeoran en diferentes variables observadas por los dueños de los perros comparando la VB _{GI} (visita antes del tratamiento de CMEs) con respecto a V2 _{GI} , V5 _{GI} y V7 _{GI} (visita 1 mes después, visita 6 meses después y 1 año después del tratamiento respectivamente)	159
Tabla 46. Comparativa del porcentaje de articulaciones que mejoran del GI (grupo tratamiento con CMEs) y del GC (grupo control tratados con Meloxicam)	160
Tabla 46. Comparativa del porcentaje de articulaciones que se mantienen del GI (grupo tratamiento con CMEs) y del GC (grupo control tratados con Meloxicam)	160
Tabla 46. Comparativa del porcentaje de articulaciones que empeoran del GI (grupo tratamiento con CMEs) y del GC (grupo control tratados con Meloxicam)	161



Abreviaturas

- *AAV: Adeno-associated virus*, virus adeno-asociados
- *ADNc: ADN complementario*
- *ACAN: Agrecano*
- *ACI: Autologous chondrocyte implantation*, implantación de condrocitos autólogos
- *ACI-C: ACI de segunda generación*
- *ACI-P: ACI de primera generación*
- *AH: Ácido hialurónico*
- *AINE: antiinflamatorio no esteroideo*
- *B2M: Beta-2-microglobulin*
- *BMP: Bone Marrow Protein*, proteína morfogenética de hueso
- *CD: Complejo de diferenciación*
- *CD29: Subunidad β 1-integrina*
- *CD34: HPCA1, hematopoietic progenitor cell antigen 1*, antígeno 1 de la célula progenitora hematopoyética
- *CD44: H-CAM, homing cell adhesion molecule*, molécula de adhesión asociada a la migración celular
- *CD45: LCA, leukocyte common antigen*, antígeno leucocitario común
- *CD73: Ecto-5-nucleotidasa, SH3 o SH4*
- *CD90: Thy-1, thymocyte differentiation antigen-1*, antígeno de diferenciación de los timocitos-1
- *CD105: Endoglin o SH2*
- *CFDA-SE: Éster de succinimidílico diacetato de carboxifluoresceína*
- *COL2A: Collagen type II alpha 1 chain*, colágeno 2A1
- *COX-2: Ciclooxygenasa 2*
- *Ct: Cycle threshold*, ciclo umbral
- *CMEs: Células mesenquimales estromales*
- *DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium*, medio basal de crecimiento celular
- *DMOAD: Disease-modifying osteoarthritis drugs*, fármacos modificadores de la enfermedad
- *DMSO: dimetilsulfóxido*
- *EDA: Experimental Design Assistant*
- *EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético*
- *ESR: Erythrocyte sedimentation rate*, ratio de sedimentación de los eritrocitos
- *FABP4: Fatty acid binding protein 4*
- *FC: Frecuencia cardíaca*
- *FGF: Fibroblast growth factor*, factor de crecimiento fibroblástico
- *FICT: Fluorescein Isotiocyanate*, Isocitocinato de fluoresceína
- *FR: Frecuencia respiratoria*
- *G: Gauge*, diámetro interior de las agujas
- *GAG: Glucosaminoglicanos*
- *GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
- *GC: Grupo control*
- *GFP: Green fluorescent protein*, proteína verde fluorescente
- *GI: Grupo con inyección intraarticular de CMEs*
- *Glu/CS: Glucosamina hidrociorada y sodio condroitin sulfato*
- *HGF: Hepatocyte growth factor*, factor de crecimiento hepatocitario

- *HPRT: Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*
- *IBSP: Integrin binding sialoprotein*
- ICAM-1: Proteína de adhesión intercelular 1
- IDO: Indoleamina 2,3-diosigenasa
- IL-1 β : Interleuquina 1 β
- IL-2: Interleuquina 2
- IL-4: Interleuquina 4
- IL-6: Interleuquina 6
- IL-8: Interleuquina 8
- IL-10: Interleuquina 10
- *IL-1Ra: Interleukin 1-receptor antagonist*, receptor antagonista de la interleuquina 1
- IMC: Índice de masa corpora
- INF- γ : Interferón
- *iNOS: Nitric oxide synthase*, óxido nítrico sintasa
- IRC: Insuficiencia renal crónica
- *ISCT: International Society for Cellular Therapy*, Sociedad Internacional para la Terapia Celular
- LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas/masas
- *LPL: Lipoprotein lipase*
- *MACI: Matrix autologous chondrocyte implantation*, implantación de condrocitos sobre membrana
- *MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1*, proteína quimioatrayente de monocitos-1
- MEC: Matriz extracelular
- *MHC Class II: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II*
- *MMP: Matrix metalloproteinase*, metaloproteinasas
- MPC: Matriz pericelular
- *NK: Natural killer cells*
- P/E: Penicilina/Estreptomina
- *PCR: Polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa
- *PE: Phycoerythrin*, ficoeritrina
- PEG₂: Prostaglandina E₂
- OA: Artrosis
- *OARSI: Osteoarthritis Research Society International*
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- *qPCR: Quantitative polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
- *ROM: Range of motion*, rango de movilidad
- *RPL13A: Ribosomal protein L13a*
- *RPS19: Ribosomal protein S19*
- *RPS5: Ribosomal protein S5*
- *RUNX2: RUNX family transcription factor 2*
- S₀: Pase 0
- S₁: Pase 1
- S₂: Pase 2
- SBF: Suero Bovino Fetal

- *SOX9: SRY-box transcription factor 9*
- *SPP1: Secreted phosphoprotein 1*
- *SYSADOA: Symptomatic slow acting drugs for osteoarthritis*, fármacos de acción sintomática lenta
- T^a: Temperatura
- *TGF-β: Transforming growth factor β*, factor de crecimiento transformante β
- *TGF-β3: Transforming growth factor β3*, factor de crecimiento transformante β3
- *TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases*, inhibidores de metaloproteinasas de tejido
- *TNF-α: Tumoral necrosis factor α*, factor de necrosis tumoral α
- TRC: Tiempo de relleno capilar
- Treg: células reguladoras
- VB: Visita basal
- V1: Visita 1 semana
- V2: Visita 1 mes
- V3: Visita 2 meses
- V4: Visita 3 meses
- V5: Visita 6 meses
- V6: Visita 9 meses
- V7: Visita 1 año



Índice de figuras

Figura 1 Representación gráfica de una sección de cartílago con las distintas zonas en las que se puede dividir histológicamente un cartílago sano. Imagen realizada con la ayuda del software <i>BioRender</i>	3
Figura 2. Imagen obtenida y modificada de Gupta <i>et al.</i> , 2012.....	7
Figura 3. Valoración del ROM (rango de movilidad articular).....	12
Figura 4. Ejemplo de algunas características radiográficas en una radiografía de cadera de perro con OA. 1) Estrechamiento del espacio articular; 2) Esclerosis subcondral; 3) Quiste subcondral; 4) Formación osteofitaria.....	13
Figura 5. Representación de las 7 zonas anatómicas analizadas en las radiografías de cadera siguiendo la <i>Escala Bioarth</i> . 1) Margen acetabular craneolateral; 2) margen acetabular craneal; 3) fosa y escotadura acetabular; 4) margen acetabular caudal; 5) margen acetabular dorsal; 6) cabeza del fémur y 7) cuello del fémur. Fuente: https://be-vet.com/servicios/escalabioarth...	14
Figura 6. Representación de las 10 zonas anatómicas analizadas en las radiografías de codos siguiendo la <i>Escala Bioarth</i> . 1) Superficie dorsal apófisis ancónea; 2) escotadura troclear del cúbito; 3) cara craneal de la cabeza del radio; 4) superficie articular del cóndilo del húmero; 5) articulación radio-cubital proximal; 6) borde caudal del cóndilo humeral; 7) apófisis coronoidea medial del cúbito; 8) margen medial del cóndilo humeral; 9) cara lateral de la cabeza del radio y 10) margen lateral del cóndilo humeral. Fuente: https://be-vet.com/servicios/escalabioarth .	14
Figura 7. Representación de las 12 zonas anatómicas analizadas en las radiografías de rodillas siguiendo la <i>Escala Bioarth</i> . 1) Labios de la tróclea; 2) polos proximal y distal de la rótula; 3) cóndilos femorales; 4) tuberosidad tibial; 5) huesos sesamoideos del músculo gastrocnemio; 6) meseta tibial o cara articular proximal de la tibia; 7) meseta tibial o cara articular proximal de la tibia; 8) borde condilar lateral; 9) borde condilar medial; 10) fosa intercondilar del fémur; 11) cabeza del peroné y 12) borde del cóndilo medial de la tibia. Fuente: https://be-vet.com/servicios/escalabioarth	14
Figura 8. Imagen de la estructura nativa y la subunidad de la proteína C reactiva. Imagen obtenida de Yao <i>et al.</i> , 2019.....	15
Figura 9. Ejemplos de tejidos fuente de CMEs. Imagen realizada con la ayuda del software <i>BioRender</i>	22
Figura 10. Localización de los depósitos de tejido adiposo marrón y tejido adiposo blanco en el cuerpo del ser humano. Imagen realizada con la ayuda del software <i>BioRender</i>	23
Figura 11. Principales factores inmunomoduladores secretados por las CMEs (IDO, <i>PGE2</i> , <i>TGF-β</i> y <i>HGF</i>) provocado por un ambiente pro-inflamatorio en el que se encuentran presentes citocinas como <i>TNF-α</i> , <i>IL-1β</i> y <i>TNF-γ</i> . Imagen realizada con la ayuda del software <i>BioRender</i>	26
Figura 12. Ejemplo de funciones que tienen algunos de los factores inmunomoduladores secretados por las CMEs. Imagen realizada con la ayuda del software <i>BioRender</i>	27
Figura 13. Representación de la comparación de las etapas de vida de un ser humano y un perro. Con un círculo rojo aparecen marcadas las articulaciones más propensas a presentar OA tanto en humanos como en perros. Imagen obtenida y modificada de Meeson <i>et al.</i> , 2019.....	31

Figura 14. Representación esquemática del papel de las células madre mesenquimales inyectadas en las articulaciones de perros con OA. Las CMEs pueden: A) secretar factores tróficos con efecto de condroprotección e inmunosupresión; B) pueden reclutar células endógenas y situarlas en la lesión; C) pueden tener la capacidad de diferenciarse hacia condrocitos, disminuyendo así el daño del cartílago. Imagen obtenida y modificada de Sasaki <i>et al.</i> , 2019.....	34
Figura 15. Pasos para el aislamiento de las células con las que trabajamos.....	42
Figura 16. Diferentes visitas a lo largo de un año de evaluación de las articulaciones de los perros seleccionados.....	59
Figura 17. Articulaciones tratadas en este estudio.....	60
Figura 18. Zona de infiltración de las CMEs en codos.....	61
Figura 19. Zona de administración de CMEs en rodilla.....	62
Figura 20. Imagen de ecografía para la inyección intraarticular de las CMEs en cadera. La flecha verde indica el lugar donde se infiltraron las CMEs.....	62
Figura 17. Diferentes visitas a lo largo de seis meses de evaluación de las articulaciones de los perros seleccionados.....	65
Figura 22. Células en cultivo en pase 1 (S1) seleccionadas para la infiltración.....	72
Figura 23. A) Representación del porcentaje de expresión de los distintos marcadores de superficie de las células seleccionados en todas las muestras seleccionadas para el estudio. B) Representación del porcentaje de expresión de los distintos marcadores de superficie seleccionados de las células en las 5 muestras seleccionadas para ser infiltradas.....	73
Figura 24. Tinción <i>Oil Red O</i> de dos de las muestras celulares seleccionadas para la infiltración. A) Se observa el cambio de morfología de las células y un pequeño aumento de la cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma entre el control y la diferenciación; B) Se observa el aumento significativo de cantidad de gotas lipídicas entre el control y las células en diferenciación. Todas las imágenes están a 20X aumentos.....	74
Figura 25. A) Representación de la media de expresión génica de las células diferenciadas del gen <i>FABP4</i> con respecto a la expresión génica obtenida con las células cultivadas en medio <i>DMEM</i> 20% SBF (células control); B) Representación de la media de expresión génica de las células diferenciadas del gen <i>LPL</i> con respecto a la expresión génica obtenida con las células cultivadas en medio <i>DMEM</i> 20% SBF. En las tablas se muestran los valores numéricos de la media de expresión génica obtenidos, tanto para los controles como para las diferenciaciones. * p-valor = 0,008.....	75
Figura 26. A) Representación de la expresión génica relativa del gen <i>FABP4</i> de cada una de las muestras con respecto al control; B) Representación de la expresión génica relativa de <i>LPL</i> de cada una de las muestras con respecto al control. En las tablas se muestran los valores numéricos de expresión relativa obtenidos para cada una de las muestras.....	76
Figura 27. Tinción Hematoxilina-Eosina de la micromasa control y diferenciada. Las flechas indican la capa exterior de la micromasa con células con una morfología más aplanada que las	

células que se encuentran en el interior de la micromasa. Aumentos: imágenes superiores 10X, imágenes inferiores 20X..... 77

Figura 28. Tinción Azul de Toluidina de la micromasa control y diferenciada. * zonas donde se acumulan los proteoglicanos que los podemos observar de un color rojizo. Aumentos: imágenes superiores 10X, imágenes inferiores 20X..... 77

Figura 29. Tinción Safranina O de la micromasa control y diferenciada. * muestran las zonas donde se concentran los proteoglicanos teñidos de un color rojizo-anaranjado. Aumentos: imágenes superiores 10X, imágenes inferiores 20X..... 78

Figura 30. Tinción Tricrómico de Masson de la micromasas control y diferenciada. Las flechas indican la capa externa de la micromasa con una tinción azul muy intensa que nos indica la presencia de colágenos. Aumentos: imágenes superiores 10X, imágenes inferiores 20X..... 78

Figura 31. A) Representación gráfica de la media de expresión génica del gen *ACAN* de las células diferenciadas con respecto a la expresión génica obtenida con las células cultivadas en medio *DMEM* 20% SBF (células control); B) Representación gráfica de la expresión génica relativa de *ACAN* de cada una de las muestras con respecto al control. C) Datos numéricos de la media de la expresión génica de *ACAN* obtenida en los controles y diferenciaciones con sus desviaciones estándar; D) Datos numéricos de la expresión de *ACAN* para cada una de las muestras con respecto al control..... 80

Figura 32. Imágenes de diferenciación osteogénica. A) Muestra que llegó a diferenciarse, a la izquierda el control sin estimular y a la derecha las células estimuladas para la diferenciación osteogénica; B) Células en cultivo muertas al utilizar el medio de diferenciación osteogénico (Aumentos: 20X)..... 81

Figura 33. Flujo del número de perros a lo largo del estudio..... 83

Figura 34. Datos de los análisis de las radiografías antes de la infiltración intraarticular con CMEs (VB_{GI}) y un año después ($V7_{GI}$). Se muestran los datos para cada una de las articulaciones tratadas. P: perro; Col: codo izquierdo; CoD: codo derecho; Cal: cadera izquierda; CaD: cadera derecha; RI: rodilla izquierda..... 88

Figura 35. Gráficos en los que se puede apreciar la comparación del porcentaje de articulaciones que mejoran, se mantienen o empeoran entre la visita basal (VB_{GI}) y el resto de visitas (visita 1 mes después de la inyección de CMEs ($V2_{GI}$); visita 3 meses después de la inyección de CMEs ($V4_{GI}$); visita 6 meses después de la inyección de CMEs ($V5_{GI}$); visita 12 meses después de la inyección de CMEs ($V7_{GI}$)) para cada una de los parámetros estudiados (funcionalidad articular, movilidad articular y atrofia muscular)..... 90 - 92

Figura 36. Gráficos en los que se muestran los porcentajes de perros que mejoraron, se mantuvieron o empeoraron en algunas de las variables de las que obtuvimos información por parte de los dueños, evaluando así los cambios de comportamiento de los perros tratados en sus hogares. A) Gráfica en la que se muestra el porcentaje de perros que mejoran, se mantienen o empeoran en la visita de 1 mes después de la inyección intraarticular ($V2_{GI}$) frente a la visita basal (VB_{GI}); B) Gráfica en la que se muestra el porcentaje de perros que mejoran, se mantienen o empeoran en la visita de 6 meses después de la inyección intraarticular ($V2_{GI}$) frente a la visita basal (VB_{GI}); C) Gráfica en la que se muestra el porcentaje de perros que mejoran, se mantienen o empeoran en la visita de 12 meses después de la inyección intraarticular ($V7_{GI}$) frente a la visita basal (VB_{GI})..... 94

Figura 37. Gráficos que muestran la comparación entre el grupo de perros que hemos tratado con CMEs (GI) y el grupo de perros tratados con Meloxicam (GC) para cada una de las variables evaluadas por el veterinario. Se muestra por separado el porcentaje de articulaciones que mejoran, que se mantienen y que empeoran..... **96 - 98**

Figura 38. Fenotipos de las CMEs dependiendo del medio en el que se encuentren, con el fin de mantener un equilibrio inmune. IFN- γ (interferón- γ); IFN γ R (receptor de IFN- γ); IL-R1 (receptor de interleuquina 1); *TLR* (receptor toll-like); *TNF- α* (factor de necrosis tumoral α); *TNF α R* (receptor del *TNF- α*). Imagen modificada de Jiang y Xu, 2020..... **108**



Índice de tablas

Tabla 1. Rangos de los ángulos de extensión y flexión normales en las articulaciones propensas a sufrir OA en perros.....	11
Tabla 2. Valores asignados a cada uno de los estados de la OA de codo, rodilla o cadera por la Escala Bioarth (Carmona et al., 2006; https://be-vet.com/servicios/escalabioarth).....	15
Tabla 3. Comparativa de tratamientos existentes para la OA para perro vs. para humano. AINEs (antiinflamatorios no esteroideos); <i>DMOADs</i> (<i>disease-modifying osteoarthritis drugs</i>); <i>SYSADOA</i> (<i>symptomatic slow acting drugs for osteoarthritis</i>); <i>ACI-P</i> y <i>ACI-C</i> (<i>autologous chondrocyte implantation</i> , primera y segunda generación); <i>MACI</i> (<i>matrix autologous chondrocyte implantation</i>); <i>3D-ACI</i> y <i>HD-ACI</i> (<i>ACI</i> sobre matriz de colágeno tridimensional y <i>ACI</i> de alta densidad).....	18
Tabla 4. Información sobre los anticuerpos utilizados para la realización de la citometría de flujo en busca de los marcadores de superficie establecidos de CMEs. <i>PE</i> (<i>phycoerythrin</i> , ficoeritrina), <i>FITC</i> (<i>fluorescein isotiocynate</i> , isocitocinato de fluoresceína).....	44
Tabla 5. Tipos de cultivos realizados para el estudio de la capacidad de las células para diferenciarse a tres linajes distintos.....	47
Tabla 6. Información de los <i>primers</i> y sondas utilizados para amplificar los genes objeto de estudio.....	53
Tabla 7. Información de los <i>primers</i> y sondas utilizados para realizar los análisis de los genes de referencia.....	54
Tabla 8. Relación de criterios de inclusión y exclusión seguidos durante la selección de pacientes para entrar a formar parte del estudio.....	58
Tabla 9. Parámetros de las analíticas recogidos de cada uno de los perros dentro del grupo GI. V.C.M. (volumen corpuscular medio); H.C.M. (hemoglobina corpuscular media); C.H.C.M. (concentración de hemoglobina); R.D.W. (índice de distribución de los hematíes); V.P.M. (volumen plaquetario medio); ALT (alanina aminotransferasa); AST (aspartato aminotransferasa).....	58
Tabla 10. Resumen de las técnicas realizadas en cada una de las visitas a lo largo de los 12 meses de estudio.....	63
Tabla 11. Información demográfica de los animales que entraron a formar parte del GC. M: Mestizo; GR: Golden Retriever; BF: Bulldog Francés; CC: Chow-Chow; L: Labrador.....	64
Tabla 12. Información demográfica de los animales que entraron a formar parte del GA. M: Mestizo; P: Podenco; CC: Chow-Chow; BC: Borcer Collie; GR: Golden Retriever; BB: Bollero de Berna; R: Rotweiller.....	66

Tabla 13. Datos sobre el tipo de CMEs que se infiltraron en los perros dentro del grupo GA (PA, perro analítica).....	66
Tabla 14. Valores medios del porcentaje de positividad de los marcadores de superficie de las muestras no seleccionadas (8 muestras) y las seleccionadas (5 muestras). p-valor obtenido de la prueba Mann-Whitney.....	73
Tabla 1. Datos obtenidos en la visita basal (VB) tanto para el grupo de inyección intraarticular (GI), como para el grupo control tratado con Meloxicam (GC).....	84
Tabla 2. Datos veterinarios de la visita basal (VB) para el grupo de inyección intraarticular tratado por nosotros (GI) y para el grupo control tratado con Meloxicam (GC).....	84
Tabla 3. Datos del grupo inyección intraarticular (GI) obtenidos a partir de la información cedida por los dueños.....	85
Tabla 18. Datos de seguridad de la administración de CMEs. A) Signos de inflamación para cada uno de los siete perros dentro del estudio; B) Signos vitales (temperatura, frecuencia cardíaca) de cada uno de los siete perros dentro del estudio en la VBGI (visita basal) y V1GI (visita 1 semana después de la infiltración).....	86
Tabla 49. Datos de la proteína C reactiva antes y 1 semana después de la inyección intraarticular de CMEs en perros que padecían OA. AUT: CMEs autólogas; ALO: CMEs alogénicas.....	87
Tabla 20. Número y porcentaje de articulaciones distribuidas según el nivel de OA que presentaban, según la <i>Escala Bioarth</i> , antes del tratamiento con CMEs (VB) y un año después del tratamiento (V7).....	88
Tabla 21. Puntuación media de la EVA en la VB _{GI} (antes de recibir el tratamiento con CMEs), la V2 _{GI} (1 mes después de recibir el tratamiento con CMEs), V5 _{GI} (6 meses después de recibir el tratamiento con CMEs) y V7 _{GI} (1 año después de recibir el tratamiento con CMEs). * Prueba de rangos con signo de Wilcoxon.....	93
Tabla 22. Porcentaje de articulaciones, clasificadas por articulación, en cada uno de los dos grupos, grupo de inyección intraarticular de CMEs (GI) y grupo control (GC).....	95
Tabla 23. Puntuación media de la EVA en la VB _{GC} (antes de recibir el tratamiento con Meloxicam), la V2 _{GC} (1 mes después de recibir el tratamiento), V4 _{GC} (3 meses después de recibir el tratamiento) y V5 _{GC} (6 meses después de recibir el tratamiento). * Prueba de rangos con signo de Wilcoxon.....	98
Tabla 24. Valores de disminución en cada una de las visitas con respecto a la VB de cada uno de los dos grupos y las diferencias entre los dos grupos. *Prueba de Mann-Whitney.....	99
Tabla 25. Resultados obtenidos de los marcadores de superficie celular por citometría de flujo en este trabajo y resultados del mismo análisis en varios estudios con células derivadas de tejido adiposo de perro encontrados en bibliografía.....	103 - 104



Resumen

Resumen en castellano

La artrosis (OA) es una enfermedad que afecta a las articulaciones sinoviales y que se caracteriza porque afecta al cartílago articular y provoca diversas alteraciones en todos los tejidos que conforman este tipo de articulaciones. Es una enfermedad que conduce a la pérdida de calidad de vida, puesto que sus síntomas más característicos son el dolor y rigidez articular, lo que conlleva a una pérdida de movilidad.

Los tratamientos que se encuentran disponibles a día de hoy son multidireccionales y principalmente se focalizan en la reducción del dolor, no existe un tratamiento definitivo que cure o detenga la progresión de la enfermedad. Por ello, en los últimos años, se están realizando muchos estudios centrados en la búsqueda de un tratamiento que pueda solventar estos problemas. Uno de los tratamientos que se encuentra bajo investigación es el uso de células mesenquimales estromales (CMEs), las cuales parecen ser unas posibles candidatas como tratamiento contra la enfermedad de la OA.

El objetivo general del presente proyecto de investigación es estudiar la seguridad y el efecto terapéutico del uso alogénico de las CMEs expandidas de tejido adiposo en perros con OA.

Para llegar a resolver ese objetivo, se realizó una caracterización de las células obtenidas de grasa de perros sanos menores de 2 años. A continuación, estas células se inyectaron intraarticularmente en las articulaciones de perros que padecían la OA. Se evaluó la seguridad de la administración de estas células y también se llevó a cabo una evaluación de las articulaciones tratadas en diferentes visitas realizadas a lo largo de un año de estudio.

Los resultados obtenidos nos indican que la aplicación heteróloga de las CMEs derivadas de tejido adiposo no producen rechazo por parte de los receptores y por lo tanto su administración es segura. Además, se ha visto que, a pesar de ser necesario un estudio con una n mucho mayor para poder concluir de manera más rotunda, los perros tratados con CMEs mantienen e incluso mejoran la funcionalidad de las articulaciones, y parecen tener un efecto similar a la administración oral de un AINE (antiinflamatorio no esteroideo) como el Meloxicam.

Es necesario realizar un estudio más exhaustivo para poder obtener unos resultados en cuanto a efectividad del tratamiento más fidedignos.

Resumen en gallego

A artrose (OA) é unha enfermidade que afecta ás articulacións sinoviais e que se caracteriza porque afecta á cartilaxe articular e provoca diversas alteracións en tódolos tecidos que conforman este tipo de articulacións. É unha enfermidade que conduce á perda de calidade de vida, posto que os seus síntomas máis característicos son a dor e a rixidez articular, o que leva á perda de mobilidade.

Os tratamentos que se atopan dispoñibles a día de hoxe son multidireccionais e principalmente focalízanse na redución da dor, non existe un tratamento definitivo que cure ou deteña a progresión da enfermidade. Por isto, nos últimos anos, estanse a realizar moitos estudos

centrados na busca dun tratamento que poda resolver estes problemas. Un dos tratamentos que se atopa baixo investigación é o uso de células mesenquimais estromais (CMEs), as cales parecen ser unhas posibles candidatas como tratamento contra a enfermidade da OA.

O obxectivo xeral do presente proxecto de investigación é estudar a seguridade e o efecto terapéutico do uso aloxénico das CMEs expandidas de tecido adiposo en cans con OA.

Para chegar a resolver este obxectivo, realizouse unha caracterización de células obtidas de graxa de cans sans menores de dous anos. A continuación, estas células inxectáronse intraarticulamente nas articulacións de cans que padecían a OA. Avaliouse a seguridade da administración destas células e tamén se levou a cabo unha avaliación das articulacións tratadas en diferentes visitas realizadas ao longo dun ano de estudo.

Os resultados obtidos indícanos que a aplicación heteróloga das CMEs derivadas de tecido adiposo non producen rexeitamento por parte dos receptores e polo tanto a súa administración é segura. Ademais, púidose ver que, a pesar de que é necesario un estudo cunha n moito maior para poder concluír duna forma máis rotunda, os cans tratados con CMEs manteñen e incluso melloran a funcionalidade das articulacións, e a aplicación de estas células parecen ter un efecto similar á administración oral dun AINE (antiinflamatorio non esteroideo) como o Meloxicam.

É preciso realizar un estudo máis exhaustivo para poder obter uns resultados en canto a efectividade do tratamento máis fidedignos.

Resumen en inglés

Osteoarthritis (OA) is a disease that affects the synovial joints and it is mainly characterized by the accumulation of damage in the articular cartilage. Also, other alterations in tissues surrounding this type of joint can co-occur.

Nowadays, the treatments for OA are multidirectional and they are focalized in the pain reduction but, there is no current treatment able to heal or stop the progression. Due to this, in the last years, several studies have focused on the search for this treatment. In this paradigm, the use of mesenchymal stromal cells (MSCs) arise as a great candidate to treat the OA disease.

The main objective of this research project is to evaluate the security and the therapeutic effect of the use of expanded adipose tissue allogenic MSCs in dogs with OA.

To achieve this, we performed a characterization of fat cells belonging to healthy dogs with less than 2 years old. The next step was the intraarticular injection of these cells in the affected joints of the dogs suffering from OA. Then we evaluated the security of this administration, also we evaluated the evolution of the treated joints during a one year follow-up period.

The results indicated that the application of heterologous MSCs derived from adipose tissue did not produce rejection in the treated dogs, so, we can conclude that the administration of this type of cells is totally safe. Although it is necessary to increase the sample size of the study to empower our data, the dogs treated with a MSCs maintained or improved the functionality of

the joints which suggests we are going in the proper direction. Furthermore, the application of this cells seems to have a similar effect that de administration of an oral NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) like the Meloxicam.

That being said, we emphasize that this one is a preliminary study, so, a second and more robust study is needed in order to strengthen the conclusions of this study and the treatment effectiveness.



Introducción

1. Tipos de articulaciones

Una articulación se puede definir como la unión entre huesos, y dependiendo del modo de unión que exista se pueden clasificar en los siguientes tipos (Dyce et al., 2007; de Toro, 2010):

- Articulaciones fibrosas

También conocidas con el nombre sinartrosis. Un ejemplo son las articulaciones que se encuentran en el cráneo, y normalmente se denominan suturas. Los huesos se mantienen unidos directamente por tejido conjuntivo fibroso y carece de cavidad articular. Carecen de movilidad.

- Articulaciones cartilagosas

Denominadas también anfiartrosis. Se corresponden con epífisis y diáfisis de los huesos largos de los juveniles, y también con las articulaciones de la base del cráneo. La mayoría de las articulaciones cartilagosas son temporales y desaparecen cuando el animal ha alcanzado su crecimiento. No presentan cavidad articular, y los huesos se encuentran unidos por cartílago fibroso (sínfisis) o hialino (sincondrosis). Tienen cierta movilidad.

- Articulaciones sinoviales

Reciben también el nombre de diartrosis. Son las más numerosas dentro del cuerpo de los animales. En éstas los huesos se encuentran recubiertos de cartílago hialino y separados por un espacio (cavidad articular) en el que se encuentra el líquido sinovial. Permiten gran movilidad y diversos tipos de movimientos.

2. La articulación sinovial

Las articulaciones sinoviales son las más abundantes dentro de nuestro cuerpo. Se caracterizan por presentar varias estructuras, pudiendo ser tratadas como cualquier otro órgano. Las estructuras que nos encontramos dentro de la articulación sinovial son las siguientes (de Toro, 2010):

- Estructuras de protección: está formada por la cápsula articular, que envuelve la cavidad articular. Su capa interna está constituida por la membrana sinovial, mientras que su capa externa es de tejido fibroso.
- Estructuras de amortiguación: reducen, amortiguan y reparten las fuerzas que ejercen presión sobre las articulaciones. Estas estructuras son el cartílago articular y el líquido sinovial

- Estructuras de adaptación: están formadas por fibrocartílago. Tienen la función de facilitar la conexión de las superficies articulares. Un ejemplo es el rodete articular de las articulaciones coxofemoral y escapulohumeral, o los discos articulares o meniscos.
- Estructuras de mantenimiento: sirven para estabilizar la articulación. Son las membranas fibrosas de la cápsula articular, ligamentos y tendones de los músculos periarticulares.
- Estructuras de contacto y deslizamiento: tienen la función de favorecer el deslizamiento de las superficies articulares. Aquí entran, por ejemplo, el cartílago articular, el líquido sinovial o los meniscos.
- Cavidad articular: es el espacio que se encuentra entre los cartílagos articulares y el manguito sinovial. Se encuentra rodeada por un tejido conectivo denominado membrana sinovial, que se refuerza exteriormente por ligamentos para unir huesos y restringir el movimiento de extensión y dirección.

2.1 Cartílago articular hialino

El cartílago articular es un tejido conectivo aneural, avascular y alinfático (Poole, 1997; Benito-Ruiz, 2010). Éste está caracterizado morfológicamente por un número pequeño de células (un 2-3% del volumen total del cartílago) que se denominan condrocitos. Estas células, rodeadas inmediatamente por una matriz pericelular (MPC) compuesta principalmente por colágeno tipo IV y proteoglicanos, son las encargadas de la producción, organización y mantenimiento de la matriz extracelular (MEC) que conforma el 97-98% del cartílago (Benito-Ruiz, 2010; Chen *et al.*, 2013). Esta matriz está compuesta por un 70-80% de agua. El 20-30% restante está formado por un 50% de colágeno, del cual la mayoría (90-95%) pertenece al colágeno tipo II (siendo el resto tipo III, VI, IX, X, XI, XII y XIV), un 30-35% está constituido por proteoglicanos y un 15-20% pertenece a otras proteínas de matriz (Benito-Ruiz, 2010; Umlauf *et al.*, 2010).

El cartílago articular se puede dividir histológicamente en cuatro zonas que se diferencian por las características de los condrocitos presentes en cada una de las zonas, así como de la concentración de proteoglicanos y la forma en la que se dispone el colágeno. A continuación se especifican las características de cada una de las zonas en las que se puede organizar un cartílago articular sano (figura 1) (Benito-Ruiz, 2010):

- Zona I (capa superficial del cartílago articular): supone el 10-20% del cartílago articular. En esta capa los condrocitos se encuentran de forma aplanada y de un tamaño pequeño, situándose paralelamente a la superficie del cartílago. La cantidad de proteoglicanos es

baja. El colágeno se dispone de forma paralela a la superficie (Eyre, 2001), aunque algunos estudios indican que presentan una orientación oblicua (Wu *et al.*, 2008). En la zona más superficial se encuentra la *lamina splendens*, que es una pequeña capa que carece de células y que se compone únicamente de fibras de colágeno, cuya función es la de proteger al cartílago de la abrasión (Clark, 1990).

- 1) Zona II (capa media del cartílago articular): esta capa abarca un 40-60% del cartílago. Los condrocitos, que aparecen en menor número, tienen una morfología esférica, son más grandes y se distribuyen de forma aleatoria, solos o en grupos, a lo largo de toda esta capa. Es la zona del cartílago que mayor concentración de proteoglicanos contiene. Las fibras de colágeno se sitúan de forma oblicua.
- 2) Zona III (capa profunda del cartílago articular): en esta zona los condrocitos tienen una morfología elíptica y forman columnas de 2 a 6 células situadas perpendicularmente a la superficie del cartílago articular. Las fibras de colágeno se disponen, al igual que las columnas de condrocitos, de forma perpendicular a la superficie. Entre la zona III y la zona IV se encuentra un frente de transición que se denomina *tidemark*.
- 3) Zona IV (capa calcificada del cartílago articular): en esta capa los condrocitos están hipertróficos y en menor número que en el resto de zonas del cartílago. La cantidad de proteoglicanos se reduce y las fibras de colágeno se disponen de forma perpendicular a la superficie del cartílago articular, al igual que en la zona III.

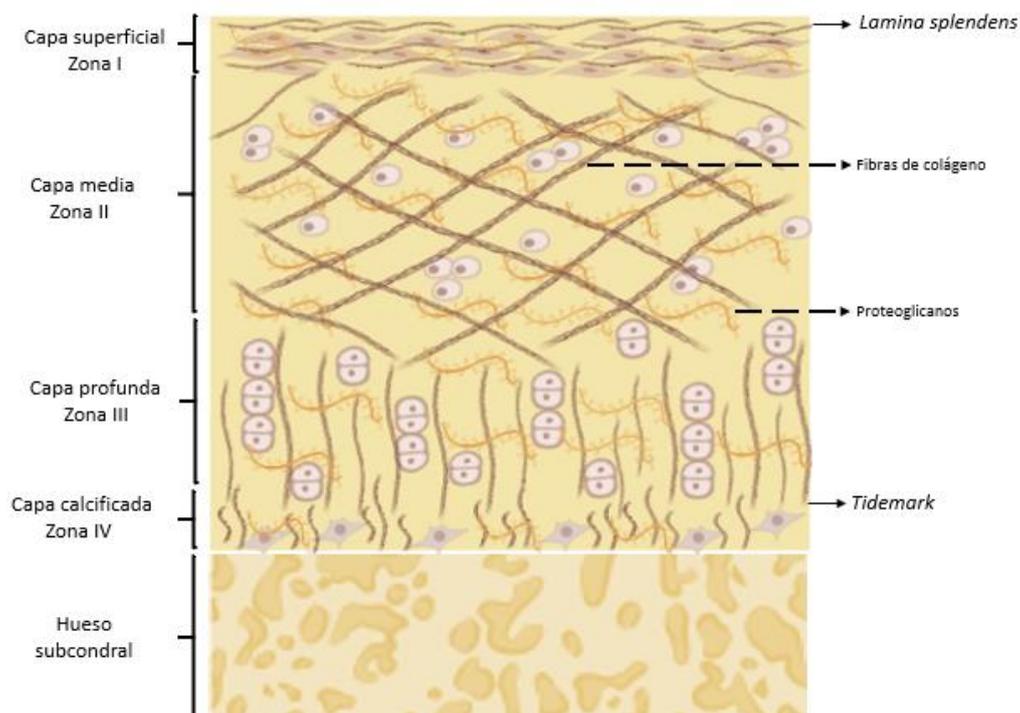


Figura 18 Representación gráfica de una sección de cartílago con las distintas zonas en las que se puede dividir histológicamente un cartílago sano. Imagen realizada con la ayuda del software *BioRender*.

El agregano es uno de los proteoglicanos más importantes presente en la MEC del cartílago articular. Presenta un núcleo de proteína cubierto por glucosaminoglicanos (GAG), que le proporcionan una carga negativa que provoca la atracción de moléculas de agua. De este modo, el cartílago se encuentra hidratado y, por lo tanto, posee propiedades hidrodinámicas, provocando una resistencia a la compresión y capacidad de absorción de golpes (Poole, 1997; Umlauf *et al.*, 2010; Oldershaw, 2012; Maldonado y Nam, 2013).

En un cartílago sano y bajo cargas fisiológicas, los condrocitos mantienen la homeostasis de la matriz del cartílago, lo que ayuda a mantener el equilibrio entre los eventos catabólicos y anabólicos (Chen *et al.*, 2013; Benito-Ruiz, 2010). Los factores anabólicos como el factor de crecimiento transformante β (*Transforming Growth Factor β , TGF- β*), los factores de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor, FGFs*), y proteínas morfogénicas de hueso (*Bone Marrow Protein, BMPs*) también participan en el mantenimiento de la homeostasis en el cartílago (Umlauf *et al.*, 2010).

El cartílago adquiere el oxígeno y los nutrientes que necesita a través de la difusión a partir de varias fuentes, como son el líquido sinovial, de los vasos sanguíneos que se pueden encontrar en los tejidos de la periferia del cartílago articular o los vasos que se encuentran en los espacios medulares subyacentes (Dyce *et al.*, 2007). El líquido sinovial se caracteriza por tener funciones tanto lubricantes como nutritivas, y es absorbido y liberado por el cartílago cuando se mueve la articulación (Dyce *et al.*, 2007).

2.2 Articulaciones sinoviales en perro

El cartílago articular de perro tiene un grosor más pequeño en comparación con el de humano (Constance *et al.*, 2010) presentando un espesor de entre 0,95 y 1,3 mm en perros de tamaño medio o grande (Dyce *et al.*, 2007; Aigner *et al.*, 2010; Constance *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2019), mientras que en humanos, la rodilla y cadera tienen un grosor entre 1,69-2,55 mm y 1,35-2 mm respectivamente (Shepherd *et al.*, 1999). El volumen de densidad de condrocitos en el cartílago varía de entre un 2%, como en humano, hasta un 12% (Aigner *et al.*, 2010).

La zona de transición en el cartílago articular de perros puede ser dividida, a su vez, en una zona superficial (delgada) y una zona profunda, con un tamaño de células mayor y con una gran concentración de células en la zona superficial (McCoy, 2015).

La maduración esquelética del perro varía dependiendo de la raza y el sexo, y va de los 9 a los 18 meses de edad (Aigner *et al.*, 2010; Cook *et al.*, 2010; McCoy, 2015), momento en el cual las articulaciones quedan totalmente definidas.

Hay muchas variables que pueden influenciar significativamente en la fisiología de la articulación como la edad, el género, el estatus reproductivo y la raza (Cook *et al.*, 2010).

3. Artrosis

La definición de artrosis (OA) en humanos que da la *Osteoarthritis Research Society International (OARSI)* es la siguiente: “un desorden que involucra las articulaciones móviles caracterizado por estrés celular y degradación de MEC iniciada por micro- y macro- daños que activan respuestas de reparación maladaptativas incluyendo rutas pro-inflamatorias de la inmunidad innata. La enfermedad se manifiesta primero como un desequilibrio molecular (metabolismo del tejido articular anormal) seguido por desequilibrios anatómicos y/o fisiológicos (caracterizados por la degradación del cartílago, remodelación del hueso, formación de osteofitos, inflamación de las articulaciones y pérdida de la función normal de la articulación), que culmina en la enfermedad” (Kraus *et al.*, 2015). En perros, esta enfermedad, tiene unas características prácticamente idénticas a las del ser humano (Meeson *et al.*, 2019).

La OA es una enfermedad difícil de detectar puesto que el cartílago articular es aneural, por ello, hasta que el daño no alcanza al hueso los pacientes con esta patología no suelen presentar síntomas de dolor y, cuando acuden en busca de ayuda las lesiones del cartílago ya han alcanzado el hueso subcondral (Poole, 1997; Benito *et al.*, 2002; Bland, 2015). Cuando el dolor articular aparece, siendo éste uno de los síntomas más comunes de la OA, tiende a empeorar cuando el paciente realiza actividad física, especialmente tras periodos de descanso. Se sabe que la OA puede causar cojera tras periodos prolongados de inactividad durante el día (por ejemplo, por la mañana tras el descanso nocturno), pero esta cojera suele ser autolimitante y tener una duración media de 20 a 40 minutos, al contrario de lo que ocurre con la artritis reumatoide en la que la cojera se extiende más en el tiempo (Sinusas, 2012).

Al comienzo de la enfermedad de la OA los condrocitos se vuelven hiperproliferativos e hipertróficos (Ulmauf *et al.*, 2010), llevando a una remodelación de la MEC en la que los condrocitos producen una gran cantidad de agregano, provocando que el cartílago se vuelva más blando. Además, se produce una fibrilación de las capas de la zona superficial del cartílago, por lo que éste se va haciendo más fino (Maldonado y Nam, 2013; Man *et al.*, 2014). A medida que la enfermedad avanza, una de las características principales es que el contenido de agregano, al contrario que en etapas iniciales, disminuye, lo que provoca que la habilidad para interaccionar con moléculas de agua disminuya, dando como resultado a una disfunción y desestructuración de la integridad de la MEC (Ulmauf *et al.*, 2010; Maldonado y Nam, 2013; Bland, 2015). En el caso del colágeno, su contenido se incrementa, pasa de ser del tipo II

(colágeno predominante en el cartílago sano) a ser colágeno de tipo I y de tipo X, siendo este último un marcador típico de condrocitos hipertróficos. Es conocido que el colágeno tipo II tiene una mayor capacidad para interactuar con los proteoglicanos de la MEC. Como el ratio de síntesis del colágeno tipo II se reduce, la MEC se vuelve más rígida y se comienzan a formar fisuras (Madonado y Nam, 2013).

Otra de las características de la enfermedad de la OA, es la presencia de citocinas pro-inflamatorias en la articulación. Las que parecen jugar un papel predominante en la progresión de la OA son la interleucina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (*Tumoral Necrosis Factor α , TNF- α*), secretadas por los fibroblastos y macrófagos, aunque también aparecen otras como la IL-12 o IL-15 (Faure y Martín, 2010; Umlauf *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2012; Maldonado y Nam, 2013) (figura 2). Las citocinas pro-inflamatorias son capaces de estimular la producción de metaloproteínas (*Matrix metalloproteinase, MMP*), agreganasas, óxido nítrico sintasa (*nitric oxide synthase, iNOS*), ciclooxigenasa 2 (*COX-2*), y reducción de la síntesis de inhibidores de metaloproteinasas del tejido (*tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP*), por parte de los condrocitos (Ulmauf *et al.*, 2010; Maldonado y Nam, 2013; Mazor *et al.*, 2014). Las MMP (sobre todo la MMP-1, MMP-3 y MMP-13) y las agreganasas son las proteinasas que tienen el papel más predominante en la degradación de la MEC durante la OA. En cuanto a las MMPs, en el cartílago sano, están reguladas para mantener el balance entre el catabolismo y anabolismo de la MEC, pero durante la OA la regulación de las MMPs se desequilibra, y aumentan su actividad. Esto lleva a que la actividad de las MMPs sea mayor que la de las TIMPs y por lo tanto se produce la degradación de un amplio espectro de sustratos como colágenos, fibronectina, elactina y proteoglicanos, que son los principales componentes que mantienen la integridad del cartílago articular (Ulmauf *et al.*, 2010; Maldonado y Nam, 2013; Mazor *et al.*, 2014) (figura 2).

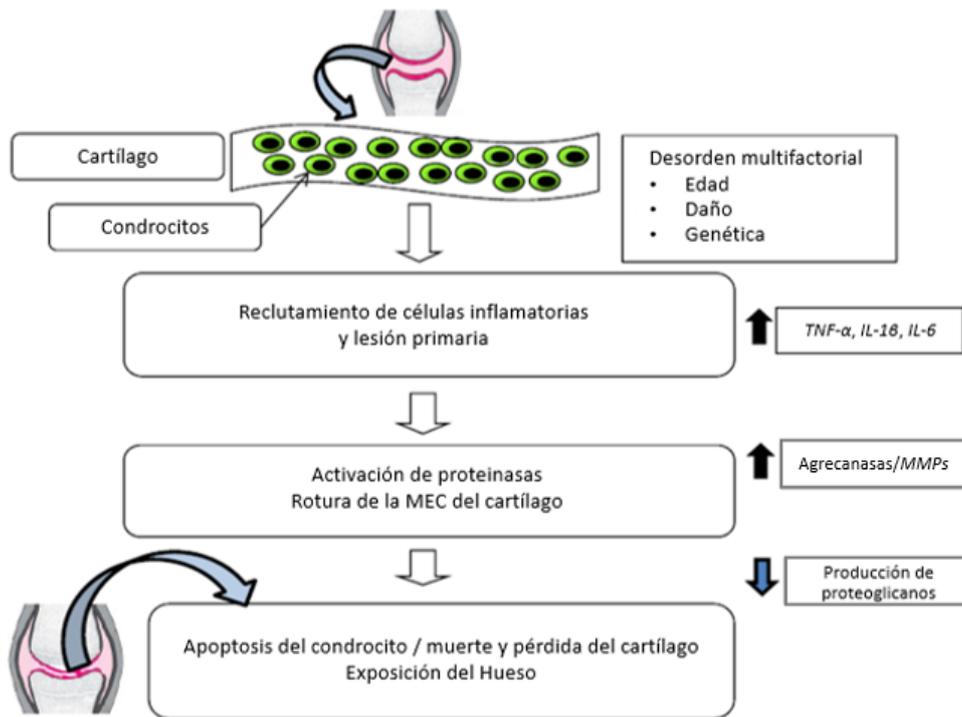


Figura 19. Imagen obtenida y modificada de Gupta *et al.*, 2012.

Se ha observado que en el 75% de los casos de OA avanzada humana existen depósitos de cristales de calcio en el cartílago (los más frecuentes en esta enfermedad son el pirofosfato cálcico y los cristales de hidroxapatita). También se ha observado la aparición de estos cristales en el líquido sinovial de las articulaciones OA. Parece que la presencia de estos cristales está favorecida por las alteraciones metabólicas y estructurales que ocurren a lo largo de la progresión de la OA. Algunos estudios han visto que la progresión de la degradación del cartílago articular parece estar más acelerada cuando se encuentran presentes estos cristales de calcio (Faure y Martín, 2010).

En cuanto a la membrana sinovial, cuando se encuentra bajo la influencia de la enfermedad de la OA, histológicamente se puede observar una proliferación de las células sinoviales residentes de la capa de revestimiento. También se observa una variada población de células inflamatorias, como las células B y T activadas, tanto en la membrana sinovial como en el líquido sinovial. Se cree que los productos de degradación del cartílago liberados al líquido sinovial son fagocitados por los macrófagos presentes en este líquido, lo que provoca que se perpetúe la inflamación de la membrana sinovial a través de la síntesis de mediadores pro-inflamatorios que difunden hacia el cartílago, provocando un círculo vicioso, incremento de degradación del cartílago y más inflamación. La inflamación de la membrana sinovial se refleja en signos y síntomas de la OA

como son el calor, enrojecimiento y edema e hinchazón de la articulación afectada (Ruiz, 2010; Man *et al.*, 2014; Bland, 2015).

Por último, otro de los tejidos afectados por la enfermedad de la OA es el hueso subcondral. Este hueso se vuelve más rígido, lo que puede contribuir a la progresión más rápida de la OA, debido a la esclerosis que se produce (mineralización del hueso que se encuentra justo debajo del cartílago articular). Cuando esto ocurre, la capacidad de absorción de las cargas disminuye hasta un 50%, lo que supone que la energía se disipe al resto de la articulación. En el hueso subcondral que se encuentra bajo la influencia de la OA suele aparecer la formación de nuevo hueso en los márgenes de la articulación, denominados osteofitos. En aquellas zonas en las que la destrucción del cartílago es total, el líquido sinovial consigue acceso a la médula ósea y parece ser el responsable de la formación de quistes en el hueso (Denny *et al.*, 2006; Faure y Martín, 2010; Man *et al.*, 2014).

3.1. Clasificación de los tipos de OA en perros

En perros, la OA se puede clasificar en tres tipos:

- OA primaria o idiopática: no es la forma más común en perros. Se caracteriza porque es una forma de OA espontánea, de la que no se saben cuáles son las causas por las que ha aparecido la enfermedad. Suele ocurrir en algunas razas como Chow-Chow, Dálmata o Labrador Retriever (Denny *et al.*, 2006).
- OA secundaria: este es el tipo de OA más común en los perros. En este caso la OA se produce por diversas causas como la displasia de cadera, un daño en la articulación (ruptura de ligamento cruzado, fractura articular) entre otras (Denny *et al.*, 2006; Pettitt y German, 2015).
- OA erosiva (atrófica): es una forma de OA que aparece ocasionalmente. Está caracterizada por la presencia de zonas erosionadas en las articulaciones, visibles en las radiografías. En humanos esto ocurre cuando aparecen depósitos de cristales de calcio, pero en perros esto aún se encuentra bajo estudio (Denny *et al.*, 2006).

3.2. Epidemiología y factores de riesgo de la OA en perros

Se estima que aproximadamente un 20% de los perros adultos se encuentran afectados por esta enfermedad, desarrollándola más comúnmente aquellas razas de perro de tamaño mediano a grande (más de 15 kg) en comparación con los de tamaño pequeño (menos de 14kg) (Bland, 2015; McCoy, 2015; Pettitt y German, 2015). Este dato es similar a la prevalencia de la OA

sintomática en humanos en España, que se sitúa en un 29,35%, aunque en este caso aumenta a un 52,6% en adultos mayores de 80 años (Blanco et al., 2020).

Uno de los factores de riesgo que parece estar más relacionado con la OA en humanos es la **edad** (Zhang y Jordan, 2010; Lotz y Loeser 2012; Neogi y Zhang, 2013; Palazzo *et al.*, 2016; Vina y Kwoh, 2018). En perros ocurre exactamente lo mismo, la edad es uno de los factores relacionados con la susceptibilidad a padecer OA, puesto que los animales de compañía suelen vivir hasta una edad muy avanzada (Bland, 2015; Pettitt y German, 2015; Meeson *et al.*, 2019). No se conoce el mecanismo exacto que provoca el daño articular con la edad, pero se cree que es multifactorial y que con la edad se acumulan una serie de factores de riesgo, incluyendo daño oxidativo, la pérdida de espesor del cartílago articular, la debilitación muscular y la reducción de la propiocepción (Neogi y Zhang, 2013; Palazzo *et al.*, 2016). Se sabe que con la edad la MEC del cartílago articular se encuentra bajo cambios de composición, encontrándose bajo la influencia de la proteólisis entre otras modificaciones (Lotz y Loeser, 2013). Otra de las características que parece estar relacionada con la edad, es que los condrocitos envejecidos tienen una menor capacidad de respuesta a los efectos de proliferación y anabólicos de los factores de crecimiento, lo que lleva a un desequilibrio en las actividades tanto anabólicas como catabólicas. Además, con la edad, se produce una acumulación de ADN mutado. Esto hace que se reduzca la producción de ATP y se incremente la producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species, ROS*). Se ha visto que los condrocitos expuestos a las ROS son más propensos a la muerte por apoptosis (Lotz y Loeser, 2013).

La **obesidad** es otro de los factores de riesgo, que parece tener mayor influencia en la articulación de la rodilla en humanos (Dieppe y Lohmander, 2005; Palazo *et al.*, 2016; Vina y Kwoh, 2018), aunque hay estudios que han visto que un alto índice de masa corporal (IMC) contribuye a una mayor susceptibilidad para la OA de manos (Vina y Kwoh, 2018), por lo que la obesidad puede no ser solo un factor biomecánico, sino que también puede tener un efecto metabólico o inflamatorio sistémico sobre las articulaciones (Palazzo *et al.*, 2016). En perros se ha visto que todas las articulaciones en general se ven afectadas por este tipo de comorbilidad, dado que en este animal de compañía la obesidad es un problema muy común (Bland, 2015; Pettitt y German, 2015; Meeson *et al.*, 2019).

En cuanto al **género**, se ha visto que, en humanos, la prevalencia e incidencia de la enfermedad de la OA cuando las mujeres entran en la menopausia aumenta, lo que ha llevado a algunos autores a pensar en un posible efecto de los estrógenos sobre la OA, pero por el momento no hay datos concluyentes (Zhang y Jordan, 2010; Neogi y Zhang, 2013). En cuanto a los perros,

también se ha observado una tendencia a que sean las hembras las más propensas a padecer este tipo de enfermedad (Bland, 2015).

Otro de los factores que influyen en la aparición de la OA es el **genético**. En humano se ha visto que la heredabilidad de la OA tiene un rango estimado de entre el 40 y el 65%, siempre dependiendo del género del paciente, de la articulación afectada y de la severidad de la enfermedad (Neogi y Zhang, 2013; Panoutsopoulou y Zeggini, 2013; González y Valdés, 2018). En cuanto al perro, lo que se conoce, es que la displasia de cadera (uno de los factores que los hace muy susceptibles a padecer la OA) tiene un gran factor genético (Bland, 2015). Se ha visto que la heredabilidad de la displasia de cadera en perros está entre el 20 y el 60% (Meeson *et al.*, 2019).

La enfermedad de la OA está caracterizada por cambios estructurales progresivos que tienen lugar en los tejidos que forman parte de la articulación a la que afecta, como son el cartílago articular, la membrana sinovial y el hueso subcondral (Denny *et al.*, 2006; Umlauf *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2012; Man *et al.*, 2014; Bland, 2015). Estos cambios estructurales suelen darse cuando se produce un **estímulo mecánico anormal**, como puede ser una carga excesiva, un traumatismo, o un mal alineamiento de la articulación, llevando finalmente a que se desarrolle esta enfermedad (Denny *et al.*, 2006; Ruiz, 2010; Zhang y Jordan, 2010; Chen *et al.*, 2013; Mazor *et al.*, 2014; Pettitt y German, 2015; Palazzo *et al.*, 2016; Vina y Kwoh, 2018).

Además de todo esto, se ha observado que la realización de **movimientos repetitivos** con las articulaciones llevados a cabo en su trabajo o el deporte que realizan las personas (boxeo, lucha, trabajos en la construcción, agacharse y arrodillarse o mantenerse de pie tiempos prolongados) están asociados al desarrollo de la OA, sobre todo en las articulaciones de la rodilla y cadera (Neogi y Zhang, 2013; Palazzo *et al.*, 2016; Vina y Kwoh, 2018). En perros ocurre lo mismo como por ejemplo aquellos que realizan actividades como *agility* (Pettitt y German, 2015). Aun así, se ha visto, que la actividad deportiva sin llegar a realizar una carga excesiva sobre las articulaciones, puede tener beneficios para la articulación gracias a que esta actividad proporciona un refuerzo de los músculos periarticulares (Neogi y Zhang, 2013; Bland, 2015; Pettitt y German, 2015).

3.3. Sintomatología y valoración de la OA en perros

La sintomatología común de la OA es dolor articular al realizar movimientos, rigidez articular que limita el recorrido articular, reducción en la movilidad, crepitación articular, deformidad articular e hinchazón o derrame articular. En perros esto da lugar a la cojera, inapetencia por la

realización de ejercicio, rechazo o incapacidad para trepar o saltar, letargo, fatiga y dificultades para levantarse desde la posición de sentado o tumbado (Bland, 2015; Pettitt y German, 2015).

Una vez que llega un perro a una clínica veterinaria con sintomatología relacionada con la OA, los veterinarios pueden realizar diferentes pruebas para determinar si se trata de esa enfermedad como una evaluación funcional, examinación física, el análisis de la ratio de sedimentación de los eritrocitos, valoración radiográfica o análisis de la concentración de la proteína C reactiva.

3.3.1. Evaluación funcional

Una de las técnicas utilizadas en clínica veterinaria para la detección de la OA es la evaluación funcional de las articulaciones del perro. Para realizar este análisis, observan la cojera de los animales en frío y en caliente, los cambios en los apoyos de las extremidades cuando se encuentran de pie o la dificultad al levantarse desde la posición sentado o tumbado (Pettitt y German, 2015).

3.3.2. Examen físico

Para la examinación física se realizan varias técnicas que están basadas en manipular las articulaciones del animal (figura 3).

Una de ellas es la valoración del rango de movilidad articular (*range of motion, ROM*) (tabla 1), para lo cual el veterinario realiza el movimiento de la articulación a examinar y observa si el ángulo que se forma cuando la mueve es el adecuado (tabla 1) (Sánchez-Carmona *et al.*, 2006; Bland, 2015; <https://be-vet.com/servicios/escalabioarth>).

Tabla 5. Rangos de los ángulos de extensión y flexión normales en las articulaciones propensas a sufrir OA en perros.

Articulación	Grado de extensión	Grado de flexión
Hombro	142°	125°
Codo	160°-170°	20°-40°
Rodilla	160°-170°	45°
Cadera	160°-165°	55°
Carpo	124°	97°

Además, al manipular la articulación también se aprecia si existe crepitación de la articulación, hinchazón en la zona de alrededor de la articulación o atrofia muscular (Pettitt y German, 2015).



Figura 20. Valoración del ROM (rango de movilidad articular).

3.3.3. Ratio de sedimentación de los eritrocitos

La ratio de sedimentación de los eritrocitos (*erythrocyte sedimentation rate, ESR*) se puede realizar porque en la OA también existe inflamación, por lo que muchas veces evalúan este parámetro, estableciéndose en perro unas ratios normales de entre 0 y 5 milímetros de plasma por hora (Bland, 2015).

3.3.4. Valoración radiográfica

Una de las escalas radiográficas que se utiliza en veterinaria (y que utilizamos en este estudio) para la valoración de las radiografías es la Escala Bioarth (Sánchez-Carmona et al., 2006; <https://be-vet.com/servicios/escalabioarth>). Esta escala se basa en la utilización de características de la articulación artrósica como son la presencia de osteofitos (formaciones óseas en los márgenes articulares que tienen el objetivo de incrementar la superficie de carga para así redistribuir las fuerzas aplicadas), la esclerosis subcondral (aumento de densidad ósea por superposición de hueso sobre las trabéculas ya existentes en el hueso subyacente al cartílago articular), la pérdida del espacio intraarticular (disminución asimétrica del espacio articular, sobre todo en las zonas donde existe un máximo estrés de carga) y la presencia de quistes subcondrales (localizados en las zonas de máximo estrés de carga, pueden ser únicos o múltiples, de tamaño variable y con morfología piriforme) (figura 4).

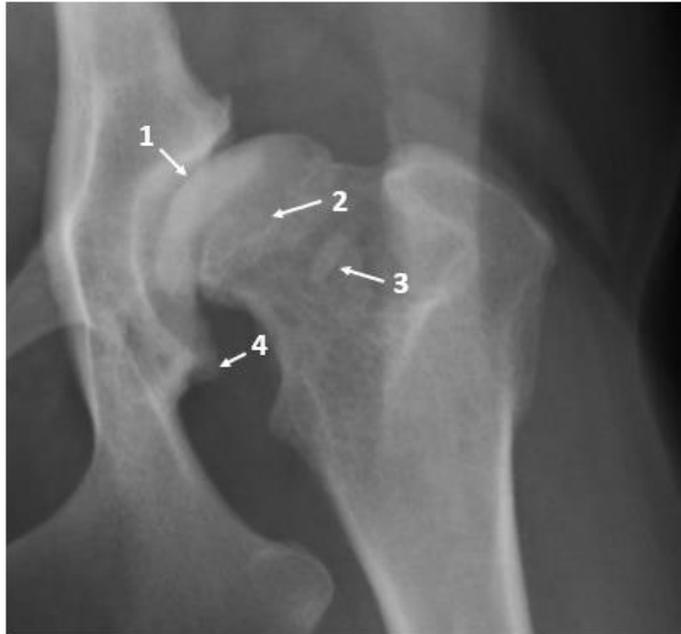


Figura 21. Ejemplo de algunas características radiográficas en una radiografía de cadera de perro con OA. 1) Estrechamiento del espacio articular; 2) Esclerosis subcondral; 3) Quiste subcondral; 4) Formación osteofitaria.

Para valorar las radiografías mediante el uso de la Escala Bioarth, cada articulación a analizar (cadera, codo o rodilla) se divide en diferentes áreas anatómicas. La cadera se divide en 7 (figura 5), el codo se divide en 10 (figura 6) y la rodilla en 12 (figura 7). A cada una de esas áreas se les va a asignar un valor siguiendo la siguiente escala:

- (0) Sin evidencias radiológicas de OA.
- (1) Ligera esclerosis subcondral. Presencia de leves irregularidades en la superficie articular.
- (2) Esclerosis subcondral más intensa y generalizada, presencia moderada de osteofitos (de entre 1 y 3 mm).
- (3) Esclerosis muy severa. Osteofitos abundantes (o mayores de 3 mm) y posibilidad de quistes subcondrales.

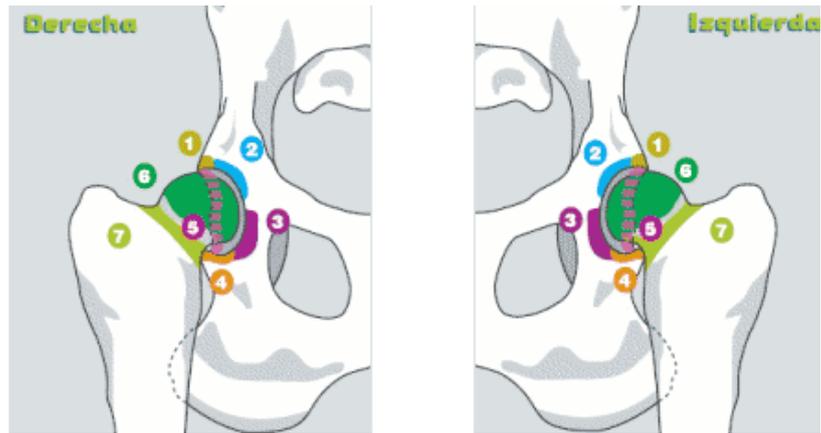


Figura 22. Representación de las 7 zonas anatómicas analizadas en las radiografías de cadera siguiendo la *Escala Bioarth*. 1) Margen acetabular craneolateral; 2) margen acetabular craneal; 3) fosa y escotadura acetabular; 4) margen acetabular caudal; 5) margen acetabular dorsal; 6) cabeza del fémur y 7) cuello del fémur. Fuente: <https://be-vet.com/servicios/escalabioarth>

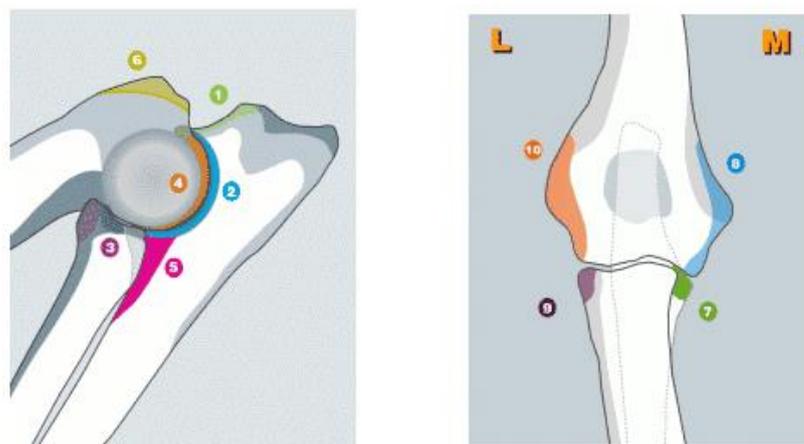


Figura 23. Representación de las 10 zonas anatómicas analizadas en las radiografías de codos siguiendo la *Escala Bioarth*. 1) Superficie dorsal apófisis ancónea; 2) escotadura troclear del cúbito; 3) cara craneal de la cabeza del radio; 4) superficie articular del cóndilo del húmero; 5) articulación radio-cubital proximal; 6) borde caudal del cóndilo humeral; 7) apófisis coronoidea medial del cúbito; 8) margen medial del cóndilo humeral; 9) cara lateral de la cabeza del radio y 10) margen lateral del cóndilo humeral. Fuente: <https://be-vet.com/servicios/escalabioarth>

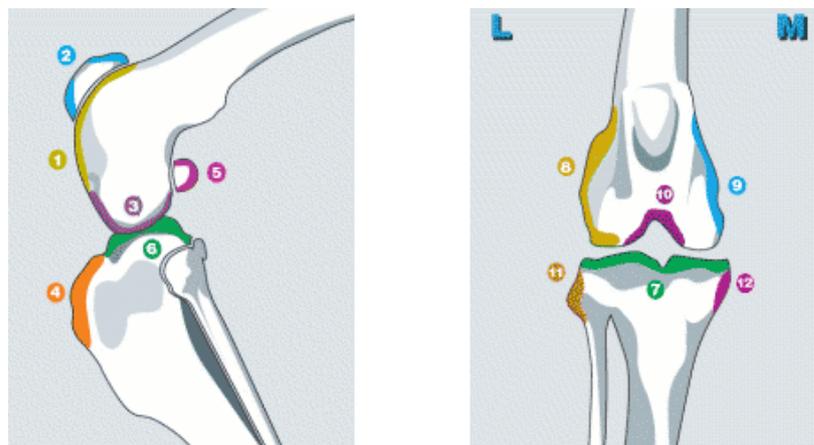


Figura 24. Representación de las 12 zonas anatómicas analizadas en las radiografías de rodillas siguiendo la *Escala Bioarth*. 1) Labios de la tróclea; 2) polos proximal y distal de la rótula; 3) cóndilos femorales; 4) tuberosidad tibial; 5) huesos sesamoideos del músculo gastrocnemio; 6) meseta tibial o cara articular proximal de la tibia; 7) meseta tibial o cara articular proximal de la tibia; 8) borde condilar lateral; 9) borde condilar medial; 10) fosa intercondilar del fémur; 11) cabeza del peroné y 12) borde del cóndilo medial de la tibia. Fuente: <https://be-vet.com/servicios/escalabioarth>

Una vez valorada cada una de las áreas anatómicas, se realiza el sumatorio de los datos obtenidos. El número resultante de ese sumatorio permite clasificar la severidad de la OA sufrida en cada una de las articulaciones según la siguiente clasificación (tabla 2):

Tabla 6. Valores asignados a cada uno de los estados de la OA de codo, rodilla o cadera por la Escala Bioarth (Carmona *et al.*, 2006; <https://be-vet.com/servicios/escalabioarth>)

Codo	Rodilla	Cadera	Estado articulación
0 – 2	0 – 2	0 – 2	Sin artrosis
3 – 9	3 – 8	3 – 9	Artrosis leve
10 – 18	9 – 18	10 – 18	Artrosis moderada
> 18	> 18	> 18	Artrosis severa

3.3.5. Medida de la concentración de la proteína C reactiva

Ésta es una forma de determinar si existe inflamación no visible en las articulaciones artrósicas de aquellos perros que sienten dolor. Esta proteína, en su forma nativa, consiste en 5 subunidades idénticas y que, cada subunidad, consta de una longitud de 206 aminoácidos (figura 8). Es expresada y secretada principalmente por el hígado en respuesta al daño de tejidos o a infecciones. Las concentraciones de esta proteína en suero pueden aumentar en 48 horas como respuesta a una inflamación (Black *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2019).

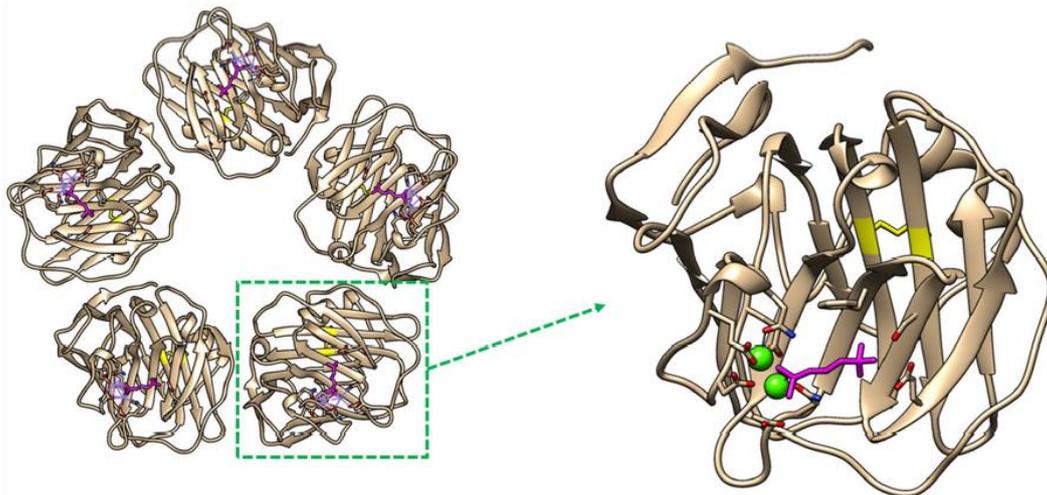


Figura 25. Imagen de la estructura nativa y la subunidad de la proteína C reactiva. Imagen obtenida de Yao *et al.*, 2019.

En una revisión realizada por Zhang, se observa que la proteína C reactiva aparecía en niveles elevados en aquellos pacientes humanos con OA de rodilla incidente con respecto a los controles. Además, observaron que aumentaba en aquellos pacientes con OA de rodilla en los que presentaban un mayor grado de dolor (Zhang, 2018). Pero en un estudio llevado a cabo por Hillström y

colaboradores, solo observaron este aumento de la concentración de la proteína C reactiva en el suero de perros que presentaban una artritis séptica, es decir, inflamación de la articulación derivada por la acción de algún agente externo, pero no en 34 perros con OA (Hillström *et al.*, 2016). Por otro lado, Qiong y colaboradores, sí encontraron en un modelo de rata al que le inducía OA extrayendo el menisco, que los niveles de proteína C reactiva aumentaban (Qiong *et al.*, 2020). Por ello, esta proteína parece ser un buen indicador para detectar inflamación no visible en aquellos animales con OA y dolor.

3.4. Tratamientos existentes para la OA en perro

A día de hoy no existe cura para la OA. El objetivo principal de los tratamientos frente a la OA canina es exactamente el mismo que para los seres humanos: minimizar el dolor que sienten los animales en las articulaciones afectadas. Para ello, existen una serie de tratamientos no farmacológicos y farmacológicos, una vez más, igual que en el caso de los humanos, siendo los tratamientos utilizados en humanos mucho más abundantes (comparativa tratamientos en perros vs. humanos en la tabla 3) (Denny *et al.*, 2006; Bland, 2015; Sasaki *et al.*, 2019).

Debido a que no existe un único tratamiento para la OA, en la actualidad, al igual que ocurre en el caso de la especie humana, se realiza una combinación de tratamientos farmacológicos junto con no farmacológicos, lo que se denomina terapia multimodal (Altman, 2010).

Además de estos tratamientos dirigidos a paliar el dolor, a día de hoy nos encontramos con tratamientos experimentales dentro de la veterinaria, que tienen por objetivo el reestablecer la estructura del cartílago ya dañado (Sasaki *et al.*, 2019).

3.4.1. Tratamientos no farmacológicos

Dentro de los tratamientos no farmacológicos, nos encontramos con los dirigidos a reducir la obesidad, uno de los factores de riesgo importantes, al igual que en humanos. Para ello se establecen dietas específicas para ayudar a reducir el peso de los animales afectados. Además, también se suele recomendar la realización de ejercicios modificados, de bajo impacto, como caminar o nadar. Estos ejercicios permiten que la masa muscular y periarticular se mantenga y refuerce (Denny *et al.*, 2006; Johnston *et al.*, 2008; Bland, 2015).

La rehabilitación física es otro de los tratamientos que se llevan a cabo en perros como terapia contra la OA. La aplicación de calor/frío, el uso de agua, ultrasonidos, electricidad y masajes, son algunas de las terapias físicas utilizadas con el fin de aumentar el incremento de flujo en sangre en el área afectada (Johnston *et al.*, 2008).

3.4.2. Tratamientos farmacológicos

Los tratamientos farmacológicos que se aplican en la actualidad frente a la OA en perros se pueden administrar de forma oral e inyectable.

Los principales tratamientos dentro de este grupo son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de administración oral, como por ejemplo el Carprofeno, Meloxicam o Firocoxib (Johnston *et al.*, 2008). El problema de estos fármacos, al igual que ocurre en seres humanos, son los efectos secundarios, como la irritación gastrointestinal o la toxicidad hepatocelular idiopática en el caso del Carprofeno (Denny *et al.*, 2006; Johnston *et al.*, 2008; Sinusas, 2012; Bland, 2015; Martel-Pelletier *et al.*, 2016; McAlindon *et al.*, 2016; Kolasinski *et al.*, 2020).

Otro de los tratamientos farmacológicos son los corticosteroides, en este caso inyectados intraarticularmente, muy efectivos en cuanto a la mejora frente el dolor e inflamación de la articulación, aunque pueden favorecer la progresión de la OA (Denny *et al.*, 2006; Bland, 2015). También analgésicos opioides, como es el caso del Tramadol, usados en combinación con AINEs en la clínica veterinaria para el tratamiento de la OA en perros (Johnston *et al.*, 2008).

Otra opción, cada vez más en desuso, son los suplementos dietéticos en la dieta, como por ejemplo el glucosaminoglicano condroitin sulfato (Denny *et al.*, 2006; Bland, 2015).

3.4.3. Tratamiento quirúrgico

Una de las técnicas que se suele utilizar en clínica veterinaria para el alivio sintomático de la OA son los lavados del cartílago articular mediante artroscopia, una técnica invasiva y que sólo produce alivio durante un corto periodo de tiempo.

En la actualidad, cada vez más, se están realizando cirugías de reemplazo articular por prótesis también en perros. Esto suele darse en aquellos casos de perros que presentan OA y tienen una edad muy corta, por lo que los dueños están dispuestos a pagar por una cirugía de esa magnitud. Un ejemplo es la cirugía realiza en enero del año 2019 en Galicia en el Hospital Veterinario 4 de Octubre, en la que se realizó un implante de prótesis de cadera a un Pastor Alemán que sufría de OA (<https://www.lavozdegalicia.es/noticia/coruna/coruna/2019/01/22/pata-bionica-zeta/000315481054725477107694.htm>). Pero, cuando los animales ya son mayores y son incapaces de moverse a causa de una OA muy avanzada, se suele llegar a la eutanasia.

3.4.4. Terapias regenerativas

En cuanto a terapias que buscan la regeneración del cartílago en perros que sufren OA, a día de hoy, existen numerosos estudios que utilizan células mesenquimales de diferentes orígenes con

el objetivo de determinar si la inyección intraarticular de éstas provoca un efecto beneficioso sobre la enfermedad de la OA, tema que se tratará con más profundidad más adelante.

Tabla 7. Comparativa de tratamientos existentes para la OA para perro vs. para humano. AINEs (antiinflamatorios no esteroideos); DMOADs (*disease-modifying osteoarthritis drugs*); SYSADOA (*symptomatic slow acting drugs for osteoarthritis*); ACI-P y ACI-C (autologous chondrocyte implantation, primera y segunda generación); MACI (matrix autologous chondrocyte implantation); 3D-ACI y HD-ACI (ACI sobre matriz de colágeno tridimensional y ACI de alta densidad).

Tratamientos	Perro	Humano
No farmacológico	<ul style="list-style-type: none"> - Dieta - Ejercicio - Rehabilitación física 	<ul style="list-style-type: none"> - Dieta - Ejercicio - Acupuntura - Aplicaciones calor/frío
Farmacológico	<ul style="list-style-type: none"> - AINEs (aplicación oral) - Inyección intraarticular de corticosteroides - Opioides + AINEs 	<ul style="list-style-type: none"> - AINEs (aplicación tópica u oral) - Opioides - DMOADs, fármacos modificadores de la enfermedad - SYSADOA, fármacos de acción sintomática lenta - Inyección intraarticular de glucocorticoides u ácido hialurónico
Quirúrgico	<ul style="list-style-type: none"> - Artroscopia - Reemplazo de la articulación 	<ul style="list-style-type: none"> - Artroscopia - Reemplazo de la articulación
Otros	<ul style="list-style-type: none"> - CMEs (células mesenquimales estromales) 	<ul style="list-style-type: none"> - Mosaicoplastia - Implantación condrocitos autólogos (ACI-P, ACI-C, MACI, 3D-ACI, HD-ACI) - Terapia génica
	Denny <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2008; Bland, 2015	Brittberg <i>et al.</i> , 1994; Mongil <i>et al.</i> , 2006; Kuroda <i>et al.</i> , 2011; Sinusas, 2012; McAlindon <i>et al.</i> , 2014; Martel-Pelletier <i>et al.</i> , 2016; Espregueira-Mendes <i>et al.</i> , 2017; Nistry <i>et al.</i> , 2017; Evans <i>et al.</i> , 2018; Lopez-Alcorocho <i>et al.</i> , 2018; Rodríguez-Mechan y Valentino, 2019; Kolasinski <i>et al.</i> , 2020

4. Células madre

Las células madre son células indiferenciadas con capacidad de autorrenovación, es decir, que tienen un gran potencial de expansión, y capacidad de diferenciación a diferentes tipos celulares. Éstas se pueden encontrar en todos los estadios de la vida, desde el embrionario, pasando por el fetal y hasta el adulto (Fortier, 2005; Kolios y Moodley, 2013).

Las células madre se pueden dividir según su potencial de diferenciación o según su origen, obteniendo así varios tipos que se especifican a continuación.

Basándonos en el **potencial de diferenciación**, podemos dividir las en 5 tipos (Fortier, 2005; Krampera *et al.*, 2007; Kolios y Moodley, 2013; Talavera *et al.*, 2017; Zakzewski *et al.*, 2019):

- 1) Células madre totipotentes: son las células que presentan un potencial de diferenciación más alto, son capaces de crear un organismo vivo entero, pueden dar lugar a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios.
- 2) Células madre pluripotentes: son células capaces de dar lugar a tejidos de cualquiera de las tres líneas germinales, endodermo (tracto digestivo y respiratorio), mesodermo (músculo, hueso, aparato reproductor y excretor, sistema cardiovascular y tejido conjuntivo) y ectodermo (epidermis, sistema nervioso central y periférico, ojos y oídos internos) (Moore y Persaud, 2008).
- 3) Células madre multipotentes: se encuentran en la mayoría de los tejidos del cuerpo humano y tienen un espectro de diferenciación más estrecho que el de las pluripotentes, pudiendo diferenciarse a tejidos de una sola línea germinal.
- 4) Células madre oligopotentes: capaces de formar dos o más linajes dentro de un tejido específico.
- 5) Células madre unipotentes: presentan la menor capacidad de diferenciación dentro de todos los tipos de células madre, solo pueden diferenciarse a un único tipo celular y formar un único linaje.

La clasificación según el **origen** de las células madre puede dividir a éstas en 3 grupos (Kolios y Moodley, 2013; Talavera *et al.*, 2017; Zakzewski *et al.*, 2019):

- 1) Células madre embrionarias: son pluripotentes, es decir, pueden diferenciarse a cualquier tipo celular del organismo. Estas células derivan de la masa interna de células que aparecen en el blastocisto de 4 a 6 días tras la fecundación.
- 2) Células madre adultas: estas células se encuentran entre las células diferenciadas de todo el cuerpo humano, con las funciones de curar los daños que ocurran en el organismo, de participar en el crecimiento y reemplazar las células que se van perdiendo cada día. Tienen un rango de diferenciación más restringido que en el caso de las células madre embrionarias. Dentro de este grupo nos encontramos con las células mesenquimales estromales (CMEs), que son una excepción dentro de este grupo, puesto que diversos estudios mantienen que no solo se pueden diferenciar hacia células de tejidos correspondientes a la línea germinal del mesodermo (cartílago, hueso, grasa) sino que también son capaces de diferenciarse a células del sistema nervioso perteneciente a la línea germinal del ectodermo (Safford *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2017).

- 3) Células madre pluripotentes inducidas: son células somáticas adultas que en laboratorio son reprogramadas genéticamente para que presenten un estado similar a las células madre embrionarias.

4.1. Células mesenquimales estromales (CMEs)

En el año 1974 Friedenstein y colaboradores publicaron un artículo en el que explicaban el aislamiento de unas células a partir de médula ósea de ratón y cobayas, observando que mostraban una morfología fibroblástica y con capacidad de diferenciación (Friedenstein *et al.*, 1974). No fue hasta el año 1991 cuando Caplan denominó a esas células como células madre mesenquimales, definiéndolas como células clonales, adherentes al plástico y no hematopoyéticas, las cuales presentaban capacidad de diferenciación a linajes de células del mesoderma como los osteoblastos y condrocitos (Caplan, 1991).

En cuanto a la nomenclatura de este tipo de células, hoy en día sigue bajo discusión. Desde que Caplan las nombró en 1991 como células madre mesenquimales se ha ido modificando su nombre según los resultados que se fueron obteniendo de las distintas investigaciones, que dilucidaron las características y formas de actuar que tienen estas células cuando son usadas como terapia celular.

Fue en el año 2005 cuando la *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* propuso el nombre de células mesenquimales estromales (CME), el que hoy en día se usa más comúnmente y el que hemos seleccionado nosotros para referirnos a ellas a lo largo de este proyecto.

Recientemente, en el año 2017, Caplan propuso nombrar a estas células *Medicinal Signaling Cells* (Células Señalizadoras Medicinales), para reflejar más adecuadamente el hecho de que estas células se dirigen a los lugares donde está ocurriendo el daño o la enfermedad y enfatizar el poder que tienen de secretar factores con propiedades tanto inmunomoduladoras como tróficas. Es decir, tal y como Caplan propone, estas células secretan “medicinas terapéuticas” *in situ* (Caplan, 2017). Pero este tema sigue en debate, buscando el nombre más adecuado para referirnos a este tipo celular que es fuente de una gran cantidad de estudios en el presente.

En el año 1999, Pittenger y colaboradores, desarrollaron un estudio para determinar el potencial multilínea que presentaban las CMEs adultas obtenidas de médula ósea. Observaron que las células que habían obtenido tenían la capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, comparándolas con células fibroblásticas de piel, con las que no obtuvieron ningún resultado de diferenciación. Además, realizaron un estudio de marcadores de superficie, en el que observaron que estas células eran positivas para el SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90,

CD106, CD120, CD124 entre otros, pero negativas para marcadores de superficie de linajes hematopoyéticos como el CD14, CD34 y el antígeno común de leucocitos CD45 (Pittenger *et al.*, 1999).

El *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* de la *ISCT* propuso en el año 2006 tres criterios para definir las CMEs en humanos: (1) adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar; (2) expresión de antígenos específicos de superficie (un porcentaje de la población de las CMEs debe ser mayor o igual al 95% en los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, y un porcentaje menor o igual al 2% del CD11b o CD14, CD34, CD45, CD79 α o CD19 y HLA clase II, mediante citometría de flujo); (3) potencial de diferenciación multipotente (osteoblastos, adipocitos y condrocitos) (Dominici *et al.*, 2006). Por el momento no existen unos criterios concretos para la caracterización de las CMEs en otras especies diferentes a la humana, por lo que se usan los establecidos en el artículo de Dominici y colaboradores del año 2006.

Muchos autores siguieron estudiando estas células, observaron su capacidad de adherencia al plástico y de proliferación, así como su potencial de autorrenovación, que en un organismo adulto ayudan al mantenimiento de los tejidos (Baksh *et al.*, 2004; Fortier, 2005; Krampera *et al.*, 2007), junto con su potencial para diferenciarse a varios tipos celulares, tanto del linaje del mesodermo (como son los osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células del tendón), así como en células del endodermo (como es el caso de las células neuronales) (Baksh *et al.*, 2004; Krampera *et al.*, 2007). Este potencial las hizo unas buenas candidatas para continuar su estudio dirigido a estrategias de regeneración de hueso, cartílago, enfermedades que afectan al músculo cardíaco, defectos en la médula espinal, entre otros (Baksh *et al.*, 2004; Bajada *et al.*, 2008).

También se observó que estas células en cultivo presentan una población heterogénea y que sus propiedades funcionales y fenotipo pueden depender del tejido del que se han obtenido, del donante, de la especie de la que se trate, de la técnica utilizada a la hora de aislar las células, los protocolos de cultivo o el número de pase en el que se encuentren (Ankrum *et al.*, 2014).

4.1.1. Tejidos fuente de CMEs

Las CMEs pueden ser obtenidas de diversos tejidos, como médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, placenta, entre otros (figura 9) (Ding *et al.*, 2011; Oryan *et al.*, 2017).

Numerosos estudios han investigado las diferencias que pueden existir entre las CMEs derivadas de diferentes tejidos, pero las dos fuentes más utilizadas hasta el momento en diversos estudios son la médula ósea y el tejido adiposo. Se ha visto que las CMEs derivadas de médula ósea tienen una correlación negativa en cuanto al número, frecuencia y capacidad de diferenciación con

respecto a la edad del paciente. En el caso de las CMEs derivadas de tejido adiposo esto no ocurre, siendo siempre más abundantes que las de médula ósea. Además, el tejido adiposo puede recogerse de los donantes siguiendo una técnica menos invasiva que en el caso de la médula ósea. Las CMEs se encuentran en una buena frecuencia dentro del tejido adiposo (el número de células encontradas por volumen de tejido adiposo supera a las encontradas en el aspirado de médula ósea) y el ratio de expansión *in vitro* es alto y mayor que el de las CMEs derivadas de médula ósea, creciendo de manera estable (Zuk *et al.*, 2001; Kern *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Zorzi *et al.*, 2015; Russell *et al.*, 2016; Wankhade *et al.*, 2019).

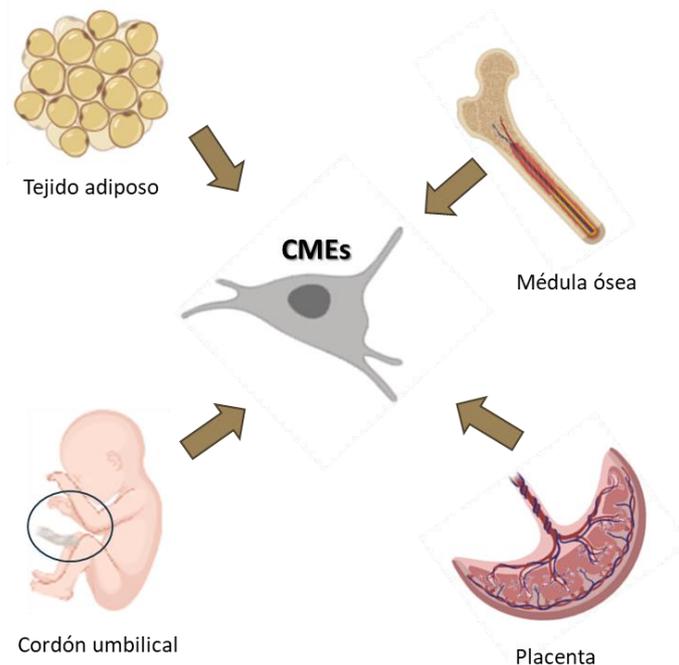


Figura 26. Ejemplos de tejidos fuente de CMEs. Imagen realizada con la ayuda del software *BioRender*.

4.1.2. Tejido adiposo

Por lo antes comentado, el tejido adiposo ha sido considerado una buena fuente de obtención de CMEs para estudios de terapia celular y medicina regenerativa. Este tejido se puede dividir en dos tipos de depósitos principales: tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón. En ambos casos la célula principal es el adipocito, que en el caso del tejido adiposo blanco se caracteriza por la presencia de una gran vacuola lipídica, mientras que, en el caso del tejido adiposo marrón, estas células presentan las acumulaciones en pequeñas gotas lipídicas (figura 10) (Ráfols, 2014; Wankhade *et al.*, 2019).

El tejido adiposo marrón es conocido por sus propiedades termogénicas, metabolizando los ácidos grasos para producir calor, y está presente sobre todo en los recién nacidos (a nivel axilar,

cervical, perirrenal y periadrenal), decreciendo su presencia tras el nacimiento, hasta estar casi ausente en adultos, aunque se ha observado que puede aparecer en regiones paracervical, supraclavicular y paravertebral (figura...). El tejido blanco es el más abundante, se encuentra en pequeños depósitos por todo el cuerpo (figura...) y sus funciones son la de aislamiento y protección mecánica para algunos órganos vitales y la de almacenar energía (Ráfols, 2014; Wankhade *et al.*, 2019).

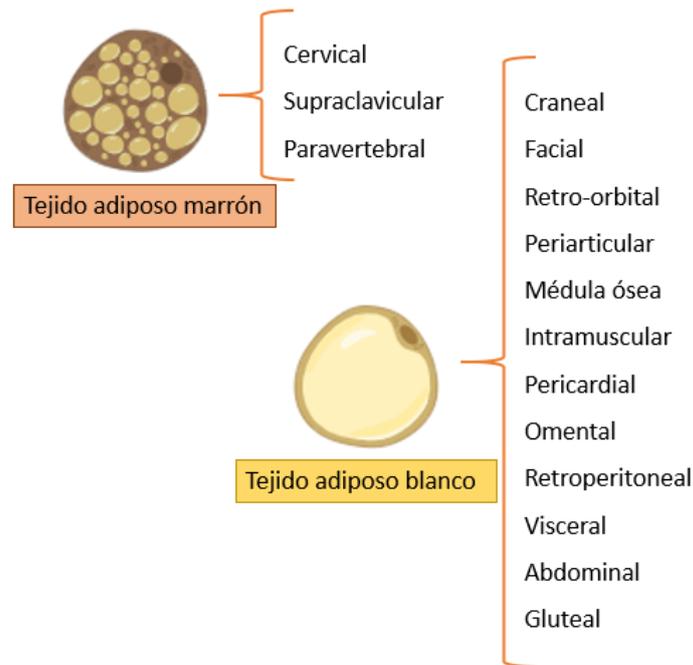


Figura 27. Localización de los depósitos de tejido adiposo marrón y tejido adiposo blanco en el cuerpo del ser humano. Imagen realizada con la ayuda del software *BioRender*.

El tejido adiposo es un tejido complejo y heterogéneo, en el que se encuentran muchos tipos celulares, adipocitos maduros, preadipocitos, macrófagos/monocitos, linfocitos, células endoteliales, fibroblastos y CMEs (Zuk *et al.*, 2001; Schäffler y Büchler, 2007; Ráfols, 2014; Wankhade *et al.*, 2019).

Se ha visto que las células del tejido adiposo blanco sintetizan y secretan unas proteínas denominadas adipocinas, relacionadas con el sistema inmunitario, como factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor*, *TNF- α*), la interleuquina 1β (IL- 1β), interleuquina 8 (IL-8), interleuquina 10 (IL-10) entre otras, incluso también factores que intervienen en la angiogénesis o factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor*, *TGF- β*) (Ráfols, 2014).

Algunos factores como el tipo de tejido adiposo del que se obtienen las CMEs y su procedencia (subcutáneo, visceral) pueden influir tanto en el ratio de proliferación como en la capacidad de diferenciación de las CMEs (Schäffler y Büchler, 2007). Algunos estudios han realizado la

comparación de las CMEs derivadas de tejido adiposo de diferentes fuentes, como es el caso del estudio de Yaneselli y colaboradores, en el que estudiaron las diferencias existentes entre las CMEs derivadas de grasa abdominal obtenida de dos fuentes, grasa del flanco (a la que denominaron derivadas de tejido adiposo subcutáneo) y grasa periovárica (denominada grasa visceral) de perro. Observaron que las CMEs derivadas de grasa subcutánea tenían una mayor capacidad de diferenciación a tres linajes distintos (adipocitos, osteocitos y condrocitos) con respecto a la grasa visceral en pases altos. Esto podría suponer una ventaja más, además de que el método de obtención del tejido adiposo subcutáneo es menos invasivo que el tejido adiposo visceral (Yaneselli *et al.*, 2018).

4.1.3. Efecto paracrino de las CMEs

En 2011, Caplan y Correa apuntaron que las CMEs son clínicamente activas en varios tejidos y que por sus actividades tróficas e inmunomoduladoras, son capaces de secretar grandes cantidades de una variedad de moléculas bioactivas, estableciendo un microambiente regenerativo en aquel lugar en el que las secretan, dando soporte a los tejidos dañados (Caplan y Correa, 2011).

A lo largo de los años se han estudiado los posibles efectos paracrinos que pueden tener las CMEs, promoviendo la angiogénesis, previniendo la apoptosis, un efecto inmunosupresor, además de antimicrobiano. Uno de los efectos más estudiados, y que se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo*, es el efecto inmunosupresor (Gao *et al.*, 2016; Richardson *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2018; Jian y Xu, 2020).

La inflamación puede estar promovida por citocinas pro-inflamatorias como son la IL-1 β , TNF- α o interferón γ (INF- γ), producidas por las células del sistema inmune. Pero existen citocinas con efectos anti-inflamatorios, como son por ejemplo la interleucina 4 (IL-4) o la IL-10. Otro tipo de moléculas que están involucradas en los tejidos donde existe inflamación son las quimiocinas del grupo CXC como la IL-8 o del grupo CC como la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1*), que sirven como quimioatrayentes de células del sistema inmune, como en el caso de la IL-8 que atrae a neutrófilos (Graves y Jian, 1995; Dinarello, 2000).

En 2010, Lee y colaboradores realizaron por primera vez el estudio del secretoma producido por las CMEs derivadas de tejido adiposo humanas en presencia de la citocina TNF- α , a través del análisis del secretoma por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas-masas (LC-MS/MS). Identificaron 187 proteínas, de las cuales clasificaron 118 que fueron inducidas por el TNF- α , entre las que incluyeron un gran número de factores inflamatorios como la citocina IL-6

(interleucina 6, con papel en la inflamación y maduración de las células B), o las quimiocinas *IL-8* o *CXCL8* (que sirve como factor quimiotáctico para guiar a los neutrófilos al lugar de la infección), *MIP-2 α* o *CXCL2* (que se expresa en los sitios donde hay inflamación y que puede suprimir la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas), *CXCL5* (función de reclutar neutrófilos para promover la angiogénesis y remodelar los tejidos conectivos), *CXCL10* (estimulación de monocitos, células *natural killer (NK)* y migración de las células T) y *MCP-1* o *CCL2* (que juega un papel en la actividad quimiotáctica para los monocitos y los basófilos), así como proteasas, inhibidores de proteasas, proteínas de la MEC, y proteínas involucradas en la regulación inmune (Lee *et al.*, 2010). Estas quimiocinas tienen propiedades quimioatrayentes para las células inmunes, y se ha visto que las CMEs suelen secretar estas moléculas cuando en el ambiente en el que se encuentran hay bajos niveles de citocinas pro-inflamatorias, en este caso las CMEs presentan un fenotipo pro-inflamatorio en el que recluta más linfocitos (Jian y Xu, 2020).

Las CMEs, además de secretar quimiocinas con propiedades quimioatrayentes para las células inmunes, así como citocinas (Lee *et al.*, 2010; Jian y Xu, 2020), son capaces de secretar diferentes factores solubles que median un efecto inmunosupresivo, denominados factores inmunomoduladores. Algunos de estos factores inmunomoduladores son la indoleamina 2,3-dioxigenasa (*IDO*), la prostaglandina E_2 (*PGE_2*), *TGF- β* o el factor de crecimiento hepatocitario (Hepatocyte growth factor, *HGF*). Estos factores son liberados por las CMEs cuando éstas se encuentran en un microambiente inflamatorio (figura 11), es decir, por sí solas no presentan propiedades inmunosupresivas, si no que necesitan de una activación por la presencia de altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias como son, por ejemplo, *TNF- α* , *IL-1 β* o el *IFN- γ* (Gao *et al.*, 2016; Zachar *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2018; Jian y Xu, 2020). El *TNF- α* es secretado por los macrófagos, al igual que en el caso de la *IL-1 β* . En cuanto al *IFN- γ* , es secretado por las células T activadas (Zachar *et al.*, 2016).

MICROAMBIENTE PRO-INFLAMATORIO

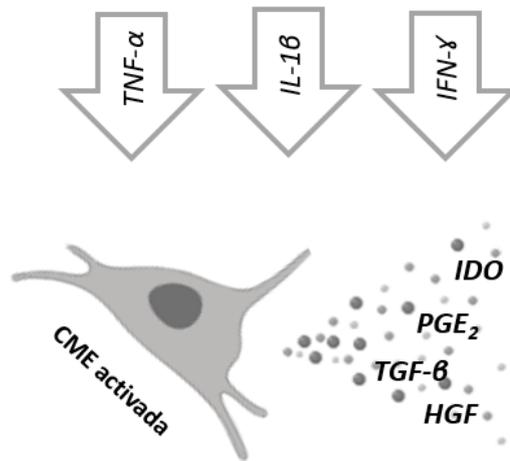


Figura 28. Principales factores inmunomoduladores secretados por las CMEs (*IDO*, *PGE₂*, *TGF-β* y *HGF*) provocado por un ambiente pro-inflamatorio en el que se encuentran presentes citocinas como *TNF-α*, *IL-1β* y *TNF-γ*. Imagen realizada con la ayuda del software *BioRender*.

Uno de los papeles que parece tener el factor inmunomodulador *IDO*, que es una enzima que cataliza el aminoácido triptófano, es la inhibición de la proliferación de las células T, pues al degradar el triptófano se producen metabolitos con efectos inmunomoduladores, provocando así la inhibición de la proliferación de las células T (Ren *et al.*, 2011; Kyurkchirev *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2018) (figura 12). En cuanto a la *PGE₂*, tiene un efecto indirecto en el que, al aumentar su presencia en la zona de inflamación, provoca un aumento de la secreción de *IL-10* por parte de los macrófagos. Esta citoquina es capaz de suprimir las funciones de los macrófagos y neutrófilos, además de intervenir en aumentar la expresión de moléculas anti-inflamatorias como inhibidores de proteasas y los antagonistas de *IL-1* y *TNF-α*. La *IL-10* también es capaz de suprimir la secreción de citocinas pro-inflamatorias por las células dendríticas y también suprimir la expresión de las moléculas MHC-II (complejo mayor de histocompatibilidad tipo II) (Kyurkchirev *et al.*, 2014). La *PGE₂* además es capaz de suprimir la función citotóxica de las células *NK*, inhibir la proliferación de las células T, e inducir las células reguladoras T (Treg) (figura 12). El *TGF-β* es capaz de inducir las células Treg e inhibir la proliferación de las células T mediante el bloqueo de la producción de la citocina mitogénica de las células T, la *IL-2* (interleuquina 2). Además, el *TGF-β* regula múltiples funciones celulares fundamentales, induciendo la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis, afectando a procesos biológicos como el desarrollo, la curación de heridas, carcinogénesis, angiogénesis y respuesta inmune (Kyurkchirev *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2018) (figura 12). El *HGF* parece tener propiedades como promover la angiogénesis o activar el potencial regenerativo de las células madre residentes (Shi *et al.*, 2018) (figura 12).

Además de la acción sobre las células T, se ha visto que las CMEs también tienen un efecto de inhibición sobre las células B. Corcione y colaboradores observaron que cuando co-cultivaban CMEs con células B mediante un sistema *transwell* (cultivando ambos tipos celulares en una misma placa de cultivo pero separadas por una barrera que deja pasar el medio de cultivo entre unas y otras), la proliferación de las células B se veía afectada negativamente. Descubrieron que este efecto sólo era efectivo a unas ratios de concentración 1:1, y que además las CMEs tenían que estar en contacto con las células B para producir su efecto, ya que al utilizar el sobrenadante de CMEs cultivadas por separado, el efecto de inhibición de la proliferación sobre las células B desaparecía (Corcione *et al.*, 2006). Más adelante se ha visto que esta inhibición está mediada por los factores inmunomoduladores IDO y *TGF-β* que secretan las CMEs bajo efectos de inflamación (Kyurkchirev *et al.*, 2014).

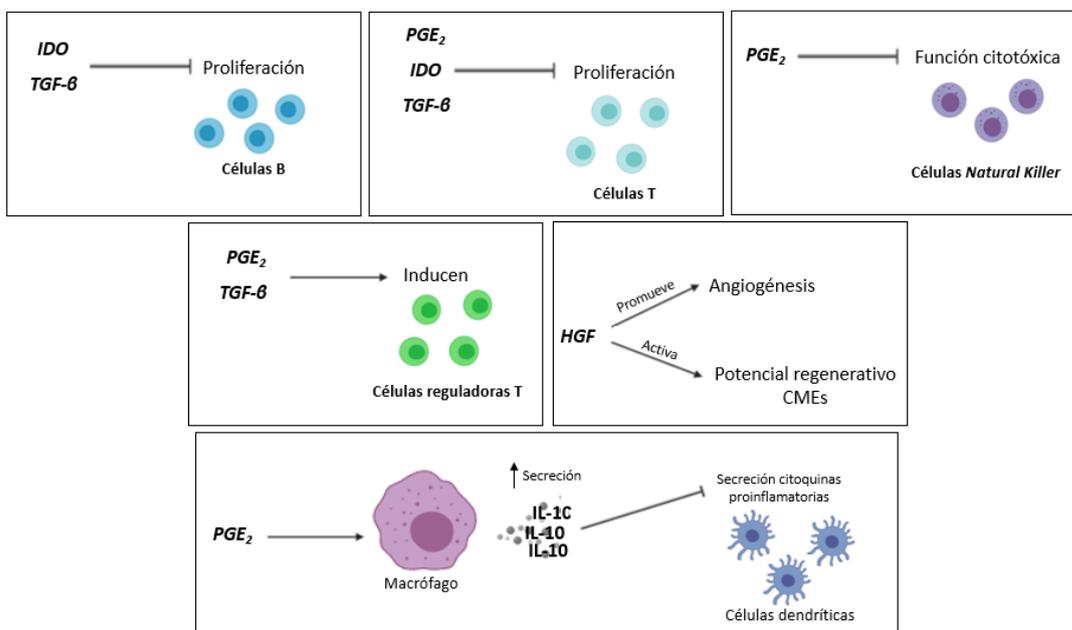


Figura 29. Ejemplo de funciones que tienen algunos de los factores inmunomoduladores secretados por las CMEs. Imagen realizada con la ayuda del software *BioRender*.

Las CMEs también pueden modular respuestas inmunes a través del contacto célula-célula, en la que se encuentran involucradas las moléculas *PDL1* (proteína transmembrana que si interacciona con su receptor inhibe la activación de las células T y la producción de citocinas) y *FASL* (proteína transmembrana que es esencial para la regulación del sistema inmune). Las CMEs utilizan éste último, el *FASL*, para atraer las células T hacia si, asegurando el contacto célula-célula y poder ejercer así un efecto apoptótico sobre las células T atraídas (Wang *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2018). También se ha visto que las CMEs expresan altos niveles de la molécula de adhesión intercelular 1 (*ICAM-1*) en presencia de citocinas pro-inflamatorias. Esta molécula de adhesión parece tener el papel de atraer a las células T hacia las CMEs y anclarlas a ellas,

realizando así su efecto supresor sobre las células T (Ren *et al.*, 2011; Kyurkchierv *et al.*, 2014). Se ha visto que la expresión en la membrana de las CMEs de la molécula ICAM-1 parece tener importancia también en la migración, proliferación y capacidad de diferenciación de las CMEs (Kyurkchierv *et al.*, 2014).

Además del efecto inmunomodulador que parecen presentar las CMEs a través de la vía de secreción de diferentes factores, algunos autores han indicado que las CMEs pueden tener un **efecto antimicrobiano** también derivado de la acción de secreción de determinadas moléculas. Un ejemplo es el caso del estudio realizado por Krasnodembskaya y colaboradores en el año 2010, en el que estudiaron el efecto de CMEs humanas derivadas de médula ósea sobre la bacteria *Escherichia coli* tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo de ratón con neumonía (C57BL/6 infectado con *E. coli*), centrándose en el péptido *Hcap-18/LL-37*. Este péptido tiene efecto antimicrobiano, actuando de manera que se fija en la membrana de las bacterias y la destruye por la formación de poros (Diago *et al.*, 2015). Krasnodembskaya y colaboradores observaron que la expresión de la catelicidina *LL-37* aumentaba cuando las CMEs se exponían a la bacteria *in vitro*. Además, en el modelo de ratón tratado intratraquealmente con las CMEs, vieron que el crecimiento bacteriano en los homogenados de pulmón y en fluido broncoalveolar descendía comparado a cuando las inyectaban junto con un anticuerpo que inhibía el *LL-37*. Con este estudio pudieron comprobar que estas CMEs tenían un efecto antimicrobiano, y que en parte, estaba debido al factor *LL-37* (Krasnodembskaya *et al.*, 2010). En un estudio posterior, en el año 2013, Bonfield y colaboradores, realizaron un estudio en el que trataron con CMEs humanas derivadas de médula ósea a modelos de ratón con fibrosis quística (B6.12956-Cftr^{tm20th}) e infectados con *Pseudomonas aeruginosa*. Observaron que el peso de los ratones mejoraba y decrecían tanto la cantidad de citocinas pro-inflamatorias como la patología pulmonar de estos ratones. Además, observaron un incremento del péptido antimicrobiano *LL-37* en aquellos ratones tratados con CMEs, apoyando lo observado por Krasnodembskaya y colaboradores (Bonfield *et al.*, 2013).

4.1.4. Efecto regenerativo de las CMEs

Algunos estudios han mostrado que las CMEs tienen potencial regenerativo, es decir, que son capaces de regenerar aquellos tejidos dañados. Un ejemplo es el estudio realizado por Lee y colaboradores, en el dividieron 27 cerdos en tres grupos, un grupo en el que los trataron con CMEs y ácido hialurónico (AH), un grupo control en el que inyectaron sólo AH y otro grupo control en el que inyectaron suero salino. A todos los cerdos les produjeron un defecto condral de forma quirúrgica. Al grupo tratado con CMEs más AH les realizaron una inyección de CMEs

suspendidas en AH una semana después de haber producido el defecto y dos inyecciones más de AH en las dos semanas siguientes. En cuanto a los grupos control, les realizaron tres inyecciones de AH o suero en tres semanas separadas. Lo que observaron fue que a las 6 semanas del tratamiento aquellos cerdos del grupo tratado con CMEs y AH, junto con el control AH, histológicamente tuvieron una reparación del defecto condral similar. A las doce semanas del tratamiento, el grupo tratado con CMEs y AH se diferenciaron histológicamente de los dos grupos control, observando una mejora en la calidad del tejido reparado. Además, infiltraron algunas CMEs marcadas con CFDA-SE (éster de succinimidílico diacetato de carboxifluoresceína) y bajo al microscopio de fluorescencia pudieron apreciar que las CMEs se encontraban distribuidas a lo largo del nuevo tejido cartilaginoso que se había formado (Lee *et al.*, 2013). Por otro lado, Desando y colaboradores también realizaron un estudio en el que utilizaban CMEs derivadas de tejido adiposo para tratar la enfermedad de la OA en un modelo animal. Utilizaron conejos a los que les indujeron la OA en las rodillas de forma quirúrgica, seccionando el ligamento cruzado anterior bilateral. Ocho semanas después de la cirugía, inyectaron en esas articulaciones dos dosis distintas de CMEs. Observaron que las CMEs tenían un efecto curativo en el cartílago y meniscos y que producían un efecto de inhibición de la progresión de la OA en la membrana sinovial. Además, las CMEs marcadas se localizaron en los meniscos y en la membrana sinovial (Desando *et al.*, 2013). Otro estudio en el que observaron una calidad de regeneración de tejido por parte de las CMEs fue el realizado por Zorzi y colaboradores. Estos autores dividieron 30 articulaciones, a las que produjeron defectos condrales, de 15 ovejas en tres grupos distintos: un grupo al que se les colocó un biomaterial de colágeno y quitosano en el que sembraron CMEs derivadas de tejido adiposo humano en los defectos condrales (*CELLS*); un grupo en el que solamente colocaron el biomaterial (*SCAFFOLD*); y otro grupo en el que no realizaron ningún tratamiento (*EMPTY*). Observaron que en aquellas articulaciones del grupo *CELLS*, se creó un tejido mezcla de fibrocartílago y cartílago hialino mientras que, en los otros dos grupos, el tejido que cubrió los defectos condrales fue solo fibrocartílago (Zorzi *et al.*, 2015).

4.1.5. Regulación del uso de las CMEs como terapia celular

La terapia celular está actualmente regulada por el Reglamento (CE) N° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo y el RD477/2014 (BOE) del 13 de junio sobre medicamentos de terapia avanzada, y este tipo de terapia está considerada como un medicamento. Sin embargo, en veterinaria no existe ninguna legislación vigente que regule la terapia con células, pero la AEMPS (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios) supervisa cualquier actividad comercial y tiene previsto incorporar una reglamentación específica en los próximos años (Talavera *et al.*, 2017).

5. Modelo de perro en OA

La OA en los seres humanos es una enfermedad muy heterogénea. Debido a esta condición y para poder estudiar su patofisiología, su progresión, el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico (como marcadores biológicos) y el evaluar nuevas terapias contra esta enfermedad, se han desarrollado numerosos modelos animales, puesto que a día de hoy no existe el modelo animal perfecto para esta enfermedad (Aigner *et al.*, 2010; McCoy, 2015).

5.1. Similitudes de la OA entre perros y humanos

La OA es una enfermedad que es común también en los animales de compañía. Estos animales presentan similitudes con la OA que presenta el ser humano tanto microscópica, macroscópica, fisiológica como sintomáticamente, lo que ocurre sobre todo en los perros (Brown, 2007). En perros la heterogeneidad de la OA, la histopatología, la sintomatología clínica de la OA, la similitud anatómica de las articulaciones (se sabe que el cartílago articular, el hueso subcondral, la membrana sinovial, y la cápsula articular están muy conservadas entre la especie canina y la humana), la progresión de la enfermedad, el ser una especie propensa a la OA espontánea, la posibilidad de realizar técnicas como la artroscopia, la obtención de imágenes por resonancia magnética de forma sencilla y el que su genoma esté totalmente secuenciado, hacen del modelo canino el más próximo al modelo animal *gold-standard* para investigaciones sobre la enfermedad de la OA (Brown, 2007; Cook *et al.*, 2010; Gregory *et al.*, 2012; McCoy, 2015; Meeson *et al.*, 2019). El modelo de perro se suele utilizar como modelo de OA en rodilla, pero esta enfermedad también ocurre de forma natural en esta especie tanto en codo como en cadera (McCoy, 2015).

Como se ha comentado anteriormente, el modelo canino está sobre todo indicado en el estudio de la OA espontánea, pues los perros son propensos a desarrollar esta enfermedad de forma natural. Además, los perros que están afectados por la OA comparten comorbilidades con los seres humanos, como es el caso de la obesidad, además de compartir el estilo de vida con sus dueños, como son los ambientes en los que viven y las actividades físicas que realizan (Brown, 2007; Meeson *et al.*, 2019).

Otra de las características remarcables que hacen que estos animales sean un buen modelo de OA es que presentan los mismos estadios de vida que los seres humanos. Es decir, se puede realizar una comparación entre la edad del perro y el humano, y por lo tanto realizar estudios de la enfermedad en la etapa que nos interese, o realizar una evaluación de la OA a lo largo del tiempo (figura 13) (Meeson *et al.*, 2019).

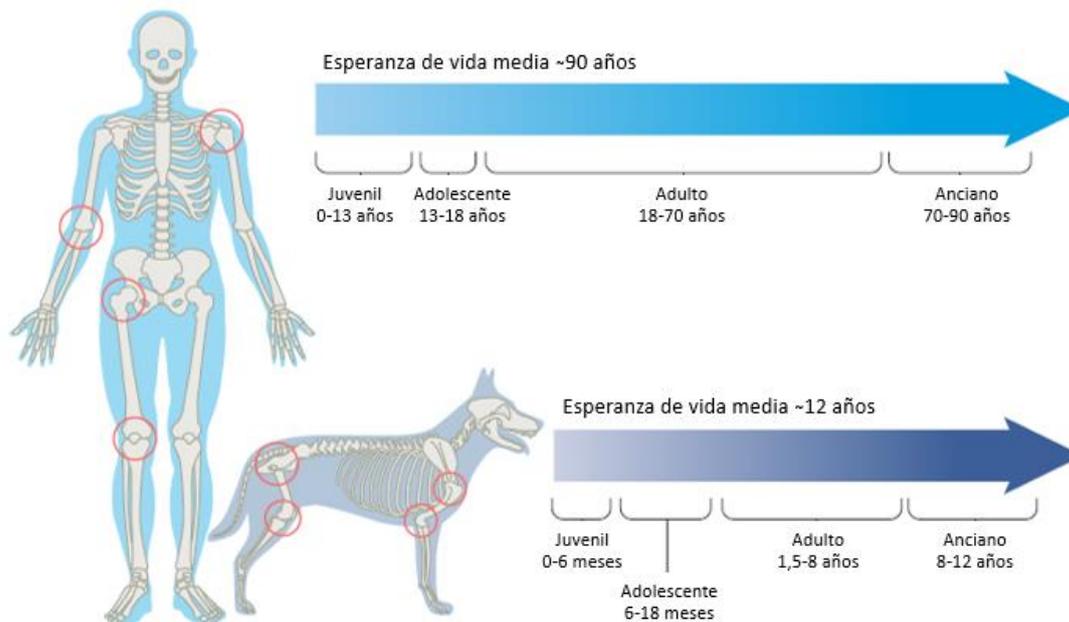


Figura 30. Representación de la comparación de las etapas de vida de un ser humano y un perro. Con un círculo rojo aparecen marcadas las articulaciones más propensas a presentar OA tanto en humanos como en perros. Imagen obtenida y modificada de Meeson *et al.*, 2019.

El síntoma más característico de esta enfermedad articular, tanto en perros como en humanos, es el dolor. Se sabe que la neurofisiología es similar entre todos los mamíferos, por lo que se supone que el dolor experimentado en humanos es análogo al sufrido por los animales mamíferos y, en este caso por los perros, que son unos animales que bajo situaciones de dolor suelen ser menos activos, gimen o se lamen la zona dolorida. Por ello, muchos estudios están dirigidos a paliar este dolor e intentar disminuir la pérdida de funcionalidad siendo, una vez más, el canino un buen modelo (Brown, 2007; Kuyinu *et al.*, 2016; Meeson *et al.*, 2019).

Por todo lo aquí expresado, se podría considerar al perro como un buen modelo para utilizarlo en estudios pre-clínicos para el estudio del uso de tratamientos que aún están siendo investigados, como es el uso de CMEs intraarticular, con vistas a trasladar los datos obtenidos a la especie humana, siempre y cuando se cumplan diversos *ítems* como estabulación y un control exhaustivo de las variables que afecten a los animales.

5.2. Limitaciones del uso del modelo canino para la OA

A pesar de que el modelo canino es el que parece más acertado para el estudio de la OA, hay que tener en cuenta que existen algunos inconvenientes al utilizar este animal a la hora de trasladar los datos obtenidos a humanos. Es preciso conocer qué diferencias existen entre las articulaciones en humanos y perros para llegar a las conclusiones acertadas. Por ejemplo, en cuanto a la biomecánica, el perro tiene un ángulo de flexión de la rodilla mayor que en el caso de los humanos. En cuanto a las dimensiones del cartílago, los perros tienen un cartílago más fino que el que aparece en las articulaciones humanas. Además, hay que tener en cuenta que el

extrapolar los datos de un animal cuadrúpedo a uno bípedo requiere precaución, pues hay factores como que la fuerza total que realizan las articulaciones, que en los perros está dividida 60:40 entre las extremidades anteriores y posteriores (McCoy, 2015; Meeson *et al.*, 2019). Por todo ello, es necesario tener conocimiento de todas las diferencias que pueden existir entre las especies a comparar, para así llegar a unos resultados y conclusiones adecuados.

5.3. Estudios de la OA en perro

Dado que se ha visto que el perro es un animal que puede ser un muy buen modelo para los distintos estudios de la enfermedad de la OA, a lo largo de los años se han utilizado en diversos trabajos, sobre todo, con el fin de encontrar nuevas terapias contra la OA.

El primer modelo animal de OA realizado con perros fue el desarrollado por Pond y Nuki en 1973, donde seccionaban el ligamento cruzado anterior, eutanasiaban a los perros a diferentes tiempos (entre 1 y 26 semanas tras la cirugía) y observaban características de la OA radiológica e histológicamente (Pond y Nuki, 1973).

Un estudio posterior al de Pond y Nuki en el que utilizaron como modelo de OA el canino, es el realizado por Smith y colaboradores en el año 1998. Estos autores observaron que la inyección de AH en las articulaciones de perros afectadas por la OA (n = 7) comparados con un grupo placebo en el que inyectaban suero salino (n = 6), disminuía la cantidad de proteoglicanos, proponiendo que el AH podría tener efectos adversos sobre las articulaciones artrósicas (Smith *et al.*, 1998).

Algunos estudios en los que se utilizaron el canino como modelo para la OA se centraron en el estudio de suplementos en la dieta para mejorar el estado de las articulaciones afectadas por esta enfermedad. Dentro de este tipo de estudios nos encontramos con uno que se centró en la suplementación de la dieta de perros con OA con omega-3 de aceite de pescado (n = 39) con efectos antioxidantes, comparándolo con perros con OA en un grupo placebo a los que les administraban en su dieta aceite de maíz (n = 38). Para observar los cambios evaluaron parámetros hematológicos y bioquímicos de los perros tratados y grupo placebo, observando una mejoría en algunos marcadores de estrés oxidativo en aquellos perros a los que se les suplementaba la dieta con aceite de pescado (Barrouin-Melo *et al.*, 2016). Otro estudio sobre la suplementación de la dieta es el realizado por Scott y colaboradores, en el que investigaron sobre perros con OA el efecto de la toma oral de glucosamina hidrocloreto y sodio condroitin sulfato (Glu/CS). Para ello compararon un grupo en el que combinaban la administración del Glu/CS (n = 36) frente a un control (n = 30), observando un ligero cambio en la actividad física de los perros que tomaban el suplemento (Scott *et al.*, 2017). Un estudio más reciente, observó

los efectos del extracto de lípidos no polares del mejillón de Nueva Zelanda (*Perna canaliculus*) rico en ácidos grasos omega-3 (PCSO-524) solo, o en combinación con un AINE, el firocoxib. Para ello compararon tres grupos, uno en el que administraban solo el PCSO-524 (n = 27), otro con el firocoxib (n = 24) y otro combinando los dos compuestos (n = 28), en el que no observaron cambios significativos entre los grupos (Vijarnson *et al.*, 2019).

Otros estudios se centraron en determinar si el modelo canino sería adecuado para estudiar cómo la OA puede afectar a las funciones fisiológicas. Un ejemplo de ello es el realizado por Knazovicky y colaboradores dónde evaluaron la posibilidad de establecer un modelo canino de OA espontánea para observar las perturbaciones del sueño producidas por esta enfermedad, investigando si la administración de AINEs podría mejorar el sueño de los perros de estudio. Los resultados que obtuvieron reflejaron algunas similitudes con pacientes de OA humanos, por lo que propusieron el modelo canino con OA espontánea como un posible modelo animal adecuado en este campo de estudio (Knazovicky *et al.*, 2015).

Por último, comentar que una vía de estudio en la que el modelo canino para OA está siendo muy utilizado, es en la investigación de la terapia celular con CMEs como posible tratamiento.

Hasta el momento, existen multitud de estudios centrados en la administración de CMEs derivadas de tejido adiposo en las articulaciones de perros que presentan la enfermedad de la OA. Por un lado, hay estudios realizados con CMEs autólogas, como es el caso de Guercio y colaboradores, en el que inyectaron las células junto con plasma rico en plaquetas (PRP) o AH en perros con OA, observando una mejoría en la funcionalidad de las articulaciones después de un mes de tratamiento (Guercio *et al.*, 2012). Otro caso es el de Cuervo y colaboradores en 2014, en el que descubrieron que los perros tratados con CMEs mejoraron con respecto a los tratados con plasma rico en factores de crecimiento (Cuervo *et al.*, 2014). En ese mismo año, Vilar y colaboradores, llevaron a cabo un estudio en el que trataron a 9 perros con una inyección intraarticular de CMEs y observaron su evolución a lo largo de 6 meses, llegando a la conclusión de que estos perros mejoraban a los 3 meses del tratamiento (Vilar *et al.*, 2014). Otro estudio similar es el que realizaron en 2014 Marx y colaboradores, en este caso aplicando las CMEs derivadas de tejido adiposo en puntos de acupuntura, determinando esta aplicación como segura (Marx *et al.*, 2014) (figuran 14).

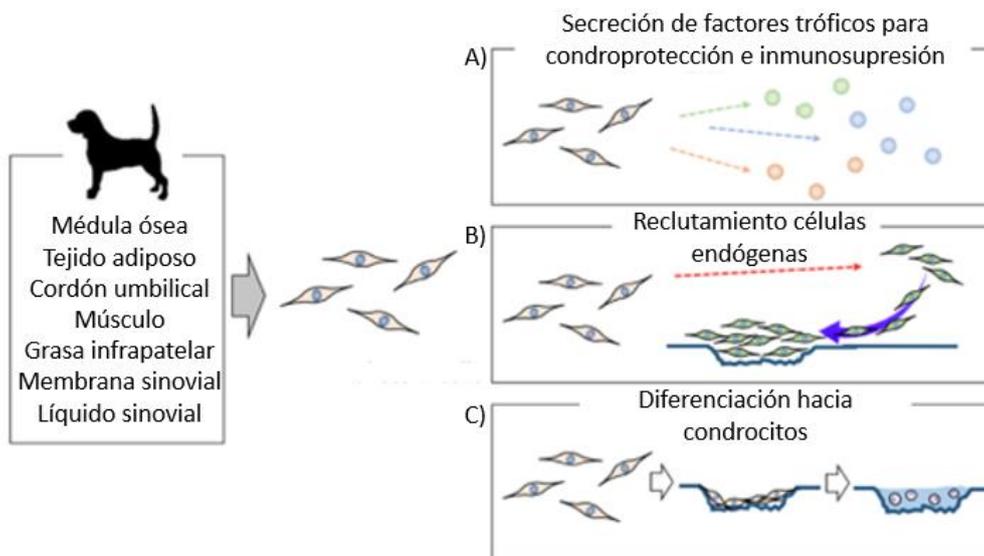


Figura 31. Representación esquemática del papel de las células madre mesenquimales inyectadas en las articulaciones de perros con OA. Las CMEs pueden: A) secretar factores tróficos con efecto de condroprotección e inmunosupresión; B) pueden reclutar células endógenas y situarlas en la lesión; C) pueden tener la capacidad de diferenciarse hacia condrocitos, disminuyendo así el daño del cartílago. Imagen obtenida y modificada de Sasaki *et al.*, 2019.

En los últimos años, los estudios con CMEs se han centrado en la aplicación de CMEs de origen alogénico. Un ejemplo de ello es el publicado por Shah y colaboradores en el año 2018, en el cual observan la mejoría de las articulaciones infiltradas con CMEs alogénicas en 203 perros diagnosticados con OA después de 10 semanas, viendo una tendencia a la mejoría (Shah *et al.*, 2018). Más recientemente, Olsen y colaboradores publicaron un artículo en el que trataban intravenosamente con CMEs alogénicas a 13 perros con OA espontánea en codo, observando una mejoría tras 6 meses de estudio (Olsen *et al.*, 2019).

5.4. Consideraciones éticas

Cuando utilizamos modelos animales en cualquier enfermedad hay que tener presente también las consideraciones éticas. Así, dependiendo del tipo de estudio o investigación que se vaya a realizar con los perros, habrá que pasar las evaluaciones pertinentes por parte de los Comités de Ética.

En España la regulación de los proyectos realizados con animales está regulado por el Real Decreto 53/2013, en el que se establecen las diferentes normas a seguir cuando se utilizan animales en el laboratorio. Este Real Decreto se centra en la protección de una lista de animales que se adjunta en el Anexo I de éste, entre las que se encuentra la especie *Canis lupus familiaris*, el perro y, por lo tanto, nos sirve de guía en las investigaciones donde se utiliza este animal.

Una de las normas más importantes que aparecen en el Real Decreto es la regla de las 3Rs definida por Russell y Burch en el año 1959 (Russell y Burch, 1959), en la que se establecen las

tres normas más importantes a la hora de trabajar con animales, la regla de las 3Rs. Éstas son:

- 1) “Reemplazar” los animales siempre que sea posible, es decir, buscar alguna alternativa que permita realizar la investigación sin la utilización de animales, como simuladores de ordenador, tejidos, cultivos celulares, o usar animales con grado evolutivo menor al que se tenía pensado.
- 2) “Reducir”, en el caso que no se puedan reemplazar, el número de animales utilizados en el estudio todo lo que sea posible llevando a cabo una buena búsqueda bibliográfica y realizando un buen diseño experimental. Esta regla es sumamente importante, pero hay que tener cuidado de no cometer el error de utilizar menos animales de los necesarios, pues al final se obtendrán unos resultados no fiables. Esto conllevaría el utilizar más animales posteriormente, con lo que no habría servido de nada haber reducido el número de animales inicialmente, de ahí la importancia de realizar un buen diseño experimental y utilizar softwares (como el *Experimental Design Assistant, EDA*) que nos ayuden a calcular el número de animales necesarios para que los resultados obtenidos sean estadísticamente fiables.
- 3) “Refinar” los procedimientos que se van a realizar sobre el animal, como mejorar la instrumentación a utilizar, disminuir el grado de la invasión del animal, etc., para así minimizar el sufrimiento animal y llegar a tener unos resultados válidos y de calidad.

A día de hoy hay un vacío legal, no existe ninguna regulación, en cuanto a la realización de ensayos clínicos con animales de compañía, en los que los animales en vez de permanecer dentro de un animalario registrado durante la ejecución del proyecto de investigación con animales, se quedan en casa de sus dueños. Por eso, en la actualidad, estos estudios se rigen por las normas del RD 53/2013 y, tanto para los Comités de Ética habilitados como para el Órgano competente, resulta difícil el incluir a este tipo de proyectos dentro de proyectos de investigación con animales de experimentación.

Es imprescindible el marco legal en este tipo de proyectos para así poder establecer cómo tratar a los animales de experimentación, puesto que, por el momento, en muchos casos es necesario desarrollar investigaciones con animales no solo con el objetivo de trasladar los resultados a humanos, sino también para ampliar los conocimientos veterinarios. Con todo, cuanto mayor conocimiento tengamos, más capaces seremos de trasladar lo que estamos observando en un modelo animal a la especie humana (Gregory *et al.*, 2012; Meeson *et al.*, 2019).



Hipótesis

La hipótesis del presente estudio es que el trasplante alogénico de células mesenquimales estromales (CMEs) derivadas de tejido adiposo poseen propiedades antiinflamatorias y su administración intraarticular es segura y eficaz para tratar la artrosis.



Objetivos

El objetivo general del proyecto de investigación es estudiar la seguridad y el efecto terapéutico del uso alogénico de CMEs expandidas de tejido adiposo.

Los objetivos específicos son los que aparecen a continuación:

1. Caracterizar las CMEs obtenidas de tejido adiposo de perros sanos.
 - 1.1 Analizar una batería de marcadores de superficie mediante citometría de flujo.
 - 1.2 Evaluar la capacidad de las CMEs para diferenciarse a tres linajes distintos, adipogénico, osteogénico y condrogénico.
2. Valorar la seguridad de la inyección alogénica intraarticular de las CMEs después de su administración.
3. Valorar la evolución sintomática y funcional de las articulaciones tratadas durante un año de evaluación de la enfermedad.



Material y métodos

Obtención y caracterización de las
células

1. Obtención y cultivo de las células procedentes de tejido adiposo

1.1. Obtención de muestras de tejido adiposo

El tejido adiposo utilizado para obtener las células se adquirió de perros sin patología artrósica, con una edad de 2 años o menos, con todas las vacunas, con análisis de sangre y pruebas de las enfermedades más comunes en perros (como la Leishmaniosis) realizadas y negativas. Una vez seleccionados los donantes, y tras el consentimiento informado de los dueños, se procedió a sustraer una pequeña cantidad de tejido adiposo (aproximadamente unos 3 gramos de grasa), aprovechando cirugías de esterilización. Estas muestras donadas se recogieron en diversas clínicas veterinarias colaboradoras para su posterior procesado y obtención de células.

1.2. Aislamiento y cultivo celular

El tejido donado se procesó para obtener las células necesarias para este estudio. Todos los procedimientos se realizaron en una cabina de bioseguridad (Telstar Bio II Advance 4, España) para mantener la esterilidad de la muestra. En primer lugar, se limpió la grasa de fascia (tejido conectivo que separa y rodea las estructuras más importantes del cuerpo, que se organiza en láminas fibrosas) (Dyce *et al.*, 2007), músculo, u otros tejidos adheridos a la muestra, fruto de la intervención quirúrgica. A continuación, se llevó a cabo una digestión mecánica, en la que la grasa se cortó con un bisturí (*Swann-Morton*[®], Inglaterra) en secciones de unos milímetros de espesor. Una vez cortada se lavó con suero salino estéril (*Fresenius Kabi*, España), con el objetivo de eliminar cualquier resto de sangre que pudiese quedar. Tras el lavado, se procedió a realizar una digestión enzimática. Para ello se utilizó una solución de colagenasa I a una concentración de 0,4 mg/mL (*Sigma-Aldrich*, EEUU) y *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*; Lonza, España) al 0% de suero bovino fetal (SBF; *Thermo Fisher*, EEUU) y 1% de una mezcla de los antibióticos Penicilina y Estreptomina (P/E; *Gibco*, EEUU), y se dejó actuar durante 30 minutos a 37°C y a 200 U/min de agitación (*Labnet International*, EEUU). Transcurrido ese tiempo, la solución obtenida se filtró utilizando un filtro de nylon de 100 µm (*Corning*, EEUU). El filtrado resultante se centrifugó a 250 xg durante 8 minutos, tras añadirle *DMEM* al 5% de SBF y 1% de P/E, para realizar un lavado de las células obtenidas antes de pasar a cultivarlas. Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en *DMEM* al 20% de SBF y 1% P/E, tras lo cual se sembraron en una placa adherente de 60 cm² de diámetro (*Corning*, EEUU) en la que se dejaron crecer en una estufa de cuarentena (*Panasonic Healthcare Co.*, Japón) a 37°C y 5% de CO₂ y a un porcentaje de humedad aproximado del 91%, siendo éste al que denominamos pase 0 (S₀) (figura 15).

Calculamos la tasa de crecimiento de las células realizando una media de los días que tardaban en pasar del S_0 al S_1 . También realizamos el cálculo de la media de células obtenidas en S_1 .

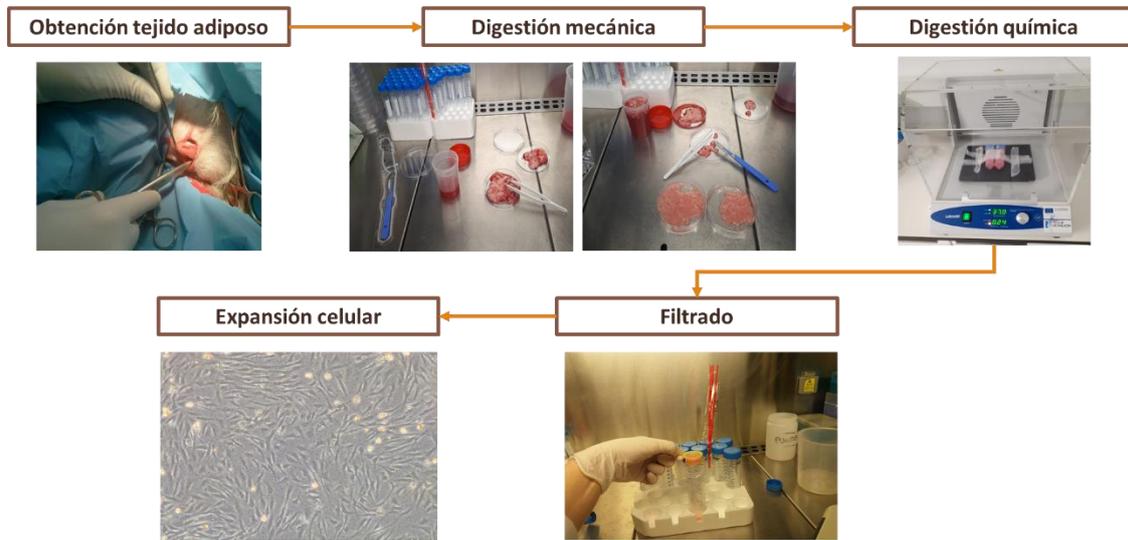


Figura 32. Pasos para el aislamiento de las células con las que trabajamos.

1.3. Test de mycoplasma

De todos los cultivos celulares se recogió 1,5 mL del medio de crecimiento para realizar una prueba de presencia/ausencia de mycoplasma (Drexler y Uphoff, 2002; Aguayo *et al.*, 2006).

El mycoplasma es una bacteria sin pared celular que interfiere en el ciclo celular. Esta contaminación es muy difícil de detectar observando los cultivos celulares al microscopio, por lo que es necesario realizar una prueba molecular para asegurarse de la ausencia de ésta en los cultivos.

Para ello, la muestra de medio de cultivo se centrifugó a 8.000 xg durante 5 minutos. Una vez realizada la centrifugación se retiró el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en *Chellex* al 10% (*Sigma-Aldrich*, EEUU). A continuación, se incubó a 95°C durante 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Tras este paso, se realizó un *spin* y se dejó a 4°C mientras se preparó la mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*, PCR). En un tubo *ependorf* (*Eppendorf*) se añadieron 23 μ L de la mezcla de PCR y 2 μ L de ADN extraído. Con un programa de ciclos específico (desnaturalización inicial 94°C de 5 minutos, 5 ciclos de 94°C 30 segundos - 50°C 30 segundos - 72°C 30 segundos, a continuación 25 ciclos de 94°C 30 segundos - 58°C 30 segundos y 72°C 30 segundos, una extensión final de 72°C 7 minutos, y por último un ciclo de tiempo infinito a 4°C) en un termociclador (*Gene AMP PCR System 9700*, EEUU) se amplificó el posible ADN que pudiera contener la muestra de medio.

Una vez terminado el programa de *PCR*, se cargó la muestra, un control negativo y un control positivo en un gel de agarosa 1,5% (*Sigma-Aldrich*, EEUU) con tampón Tris, acetato y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1x (TAE) y con 2 μ L de *SYBR Safe* (*Invitrogen*, EEUU). El gel se corrió en una cubeta de electroforesis con un voltaje de 100 V durante 30 minutos y se analizó la presencia/ausencia de una banda correspondiente a un fragmento de 400 pares de bases en las muestras y en los controles. En caso de no aparecer, las células estarían libres de esta bacteria, y por tanto se podrían seguir manteniendo en la estufa de cultivo (*Thermo Electron Corporation*, EEUU) para continuar con el estudio.

1.4. Preplating

Una vez comprobada la ausencia de este microorganismo, las células se siguieron manteniendo hasta que alcanzaron el 80% de confluencia, momento en el que se realizó el primer subcultivo, también denominado pase 1 (S_1). Para ello se procedió a separar las células de las placas de cultivo con tripsina al 2% (*Gibco*, EEUU) y se les realizó la técnica de *preplating*. Ésta consiste en realizar un lavado con suero salino para eliminar los restos del medio de cultivo de la placa (puesto que el SBF inhibe la acción de la tripsina) y a continuación incubar las células con tripsina (*Gibco*, EEUU) a 37°C. Una vez que todas las células se encontraban en suspensión, se añadió *Ringer lactato Grifols*® (*Laboratorios Grifols S.A.*, España) para inactivar la tripsina, y unos 2 mL de *DMEM* al 5% de SBF con el objetivo de que las células no se deterioraran. Una vez realizado esto, se dejaron en la estufa 15 minutos a 37°C. Tras ese tiempo, las células mesenquimales siguen en suspensión, pero un porcentaje muy elevado de macrófagos, fibroblastos o células endoteliales que pudieran estar presentes en la muestra se vuelven a adherir, puesto que está descrito que el tiempo de adhesión de estos tipos celulares es menor que el de las mesenquimales (Richler y Yaffe, 1970). Con esta técnica intentamos minimizar la heterogeneidad de los cultivos celulares de CMEs.

Una vez realizado el *preplating*, se recogieron las células, se centrifugaron y se contaron utilizando una cámara de Neubauer (*Optik Labor*, Reino Unido) y se sembraron en 4-5 placas de 100 cm² (*Corning*, EEUU) (sembrando siempre una cantidad mínima de 200.000 células por placa) para expandirlas. El *preplating* se realizó también en el pase siguiente, es decir, se realizaron dos, uno de S_0 a S_1 , y otro de S_1 a S_2 (pase 2), para asegurarnos de eliminar el mayor porcentaje de células que no eran de nuestro interés.

1.5. Criopreservación

Tras el segundo *preplating*, las células se recogieron (en pase 1, S_1) y se criopreservaron utilizando una mezcla del 10% del agente crioprotector dimetilsulfóxido (*DMSO*; *Sigma-Aldrich*,

EEUU) en *DMEM* al 5% de SBF y 1% P/E. Esta mezcla se añadió gota a gota sobre las muestras a congelar, dejando una proporción de máximo 3×10^6 células/mL. A continuación, estas células se colocaron en un contenedor (CoolCell[®]) que asegura un ratio de congelación estandarizado y controlado de $-1^\circ\text{C}/\text{minuto}$ en un congelador de -80°C durante 48 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se trasladaron a un tanque de nitrógeno líquido para criopreservarlas hasta su uso.

2. Caracterización de las células aisladas de tejido adiposo

2.1. Citometría de flujo

Se analizaron una batería de marcadores de superficie de células mesenquimales típicos y descritos, entre los que se incluyeron los recomendados por la *ISCT* (Tabla 4).

Tabla 8. Información sobre los anticuerpos utilizados para la realización de la citometría de flujo en busca de los marcadores de superficie establecidos de CMEs. *PE* (*phycoerythrin*, ficoeritrina), *FITC* (*fluorescein isothiocyanate*, isocitocinato de fluoresceína).

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Dilución	Casa comercial
CD29	<i>PE</i>	<i>TS2/16</i>	3:50	<i>BioLegend[®]</i>
CD34	<i>PE</i>	<i>1H6</i>	5:50	<i>EBioscienceTM</i>
CD44	<i>PE</i>	<i>IM7</i>	1:50	<i>BD PharmingenTM</i>
CD45	<i>FITC</i>	<i>YKIX716.13</i>	5:50	<i>Invitrogen by Thermo Fisher Scientific</i>
CD73	<i>PE</i>	Policlonal	5:50	<i>Bioss antibodies</i>
CD90	<i>PE</i>	<i>YKIX337.217</i>	5:50	<i>Invitrogen by Thermo Fisher Scientific</i>
CD105	-	<i>8A1</i>	1:100	<i>abcam[®]</i>
<i>MHC Class II</i>	<i>FITC</i>	<i>CVS20</i>	1:50	<i>LsBio LifeSpan Biosciences, Inc.</i>

Para ello, al ser anticuerpos específicos para la especie canina, se realizó la titulación de todos ellos a excepción del CD29 y CD44, que ya se utilizaban de rutina en el laboratorio.

Una vez realizada la titulación y asegurarnos de que esos marcadores servían para las células objeto de estudio, se pasó a analizar estos marcadores en estas células mediante citometría de flujo (*BD FACSCalibur*, Irlanda).

Las células se contaron y se pusieron un total de 200.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo cónico (*DELTA LAB S.L.*, Barcelona) y se incubaron durante 40 minutos a una temperatura de 4°C en oscuridad con cada uno de los anticuerpos seleccionados, utilizando la dilución correspondiente. A continuación, se pasó a realizar la citometría de flujo. Se indicó al programa que recogiera un número de eventos de 1×10^4 para cada uno de los marcadores. Tras

realizar este paso, los resultados se procesaron usando el programa informático *BD Cell-Quest Pro* (versión 1.c.8fb, BD, Irlanda).

En el caso del marcador CD105, fue necesario realizar un protocolo distinto, especificado por la casa comercial (<https://www.abcam.com/cd105-antibody-oti8a1-ab156756.html#top-400>). En resumen, el protocolo a seguir con este anticuerpo fue: 1. fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos; 2. permeabilizar con 0,1% PBS-Tween durante 20 minutos; 3. incubar las células en PBS 1x – 10% SBF – glicina 0,3 M (MERK) durante 15 minutos (para bloquear las interacciones no específicas proteína-proteína); 4. Incubación con el anticuerpo CD105 durante 30 minutos a 22°C y 5. finalmente, incubar durante 30 minutos a 22°C con el anticuerpo secundario anti-mouse FITC (*Palex Medical, S.A.*).

2.1.1. Comparación marcadores

En este estudio utilizamos 5 muestras de CMEs de entre las 13 que teníamos inicialmente. Para determinar que el porcentaje de positividad de los marcadores de superficie de las células seleccionadas no tenía diferencias significativas con el porcentaje de positividad de las otras 8 restantes, comprobamos que las medias del porcentaje de positividad para cada uno de los marcadores de superficie era igual entre las 5 y las 8 muestras, para lo que aplicamos la prueba de Mann – Whitney con el programa SPSS (*IBM SPSS Statistics v.24*).

2.2. Diferenciación celular

Para determinar la capacidad de diferenciación de las células aisladas de grasa de perro, se procedió a cultivarlas en medios de inducción a tres linajes celulares distintos, en este caso osteogénico, condrogénico y adipogénico. Los medios que se utilizaron fueron para la osteogénesis *hMSC Osteogenic Differentiation BulleKit™ Medium* (Lonza, Suiza), para la condrogénesis *hMSC Chondrogenic Differentiation BulleKit™ Medium* (Lonza, Suiza) suplementándolo con el factor de crecimiento transformante beta 3 (*transforming growth factor β3, TGF-β3; Prospec-Tngy Technogene LTD, Israel*) en proporción 33 ng/mL, y para la adipogénesis *Canine Adipocyte Differentiation Medium* (*CELL Applications INC., EEUU*). Las células se cultivaron durante 21 días con estos medios, realizándose un cambio de medio cada 3 días.

Para determinar la capacidad de diferenciación a estos linajes, se realizaron pruebas tanto de tinción citológica como de biología molecular.

- **Osteogénesis**

Las células se sembraron en S₂ en una cámara de 8 pocillos para microscopía (*Merck Millipore*, Irlanda) en una cantidad de 5.000 células por pocillo. En estas cámaras de ocho pocillos se sembraron seis con células a las que se les indujo la diferenciación utilizando el medio de inducción osteogénica antes descrito y dos pocillos control, a los que se les añadió medio de cultivo basal (*DMEM* al 20% de SBF y 1% P/E) (tabla 5). Tras 21 días, se realizó la tinción de Rojo Alizarina (*Sigma-Aldrich*, EEUU) que evidencia la presencia de depósitos cálcicos.

Se sembraron también en placas de seis pocillos (*Corning*, EEUU), en una cantidad de 50.000 células por pocillo, con el objetivo de recoger las células y extraer el ARN para realizar el análisis de expresión de los genes *IBSP* (*Integrin binding sialoprotein*), *SPP1* (*Secreted phosphoprotein 1*) y *RUNX2* (*RUNX family transcription factor 2*) (Neupane *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2010; Russell *et al.*, 2016) (tabla 5) mediante *PCR* a tiempo real (*qPCR*, *LightCycler 480 Real Time PCR*). Al igual que anteriormente, en este caso se dejaron dos pocillos como control cultivando las células con medio basal (*DMEM* al 20% de SBF y 1% P/E) (tabla 5.).

- **Adipogénesis**

Las células se sembraron en S₂ en una cámara de ocho pocillos para microscopía en una cantidad de 5.000 células por pocillo. En estas cámaras de ocho pocillos se sembraron seis pocillos con células a las que se les indujo la diferenciación utilizando el medio de adipogénesis antes descrito y dos pocillos control, a los que se les añadió medio de cultivo basal (*DMEM* al 20% de SBF y 1% P/E) (tabla 5). Tras 21 días, se realizó la tinción *Oil Red O* (*Sigma-Aldrich*, EEUU) que evidencia la presencia de gotas lipídicas dentro de las células que se están diferenciando.

Se sembraron también en placas de seis pocillos, en una cantidad de 50.000 células por pocillo, con el objetivo de recoger las células y extraer el ARN para realizar el análisis de expresión de los genes *FABP4* (*fatty acid binding protein 4*) y *LPL* (*Lipoprotein lipase*) (Neupane *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2010; Russell *et al.*, 2016) (tabla 5) mediante *qPCR*. Al igual que anteriormente, en este caso se dejaron dos pocillos como control cultivando las células con medio basal (*DMEM* al 20% de SBF y 1% P/E) (tabla 5).

- **Condrogénesis**

Para llevar a cabo la diferenciación condrogénica, se formaron micromasas siguiendo protocolos previos con algunas modificaciones (Díaz-Prado *et al.*, 2012; Cicione *et al.*, 2014). Para ello se sembraron 200.000 células en S₂ en tubos de propileno con 500 µL de *DMEM* 20% SBF y 1% P/E y se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos. A continuación, a aquellas micromasas a las que

se les indujo la diferenciación, se les retiró ese medio y se les añadió medio de inducción condrogénica anteriormente descrito. A las micromasas que sirvieron de control se les dejó el medio basa (*DMEM* 20% SBF y 1% P/E) (tabla 5). Tras 21 días, las micromasas se recogieron y se incluyeron en bloques de parafina. A continuación, se les realizaron cortes de 4 μm en el microtomo de rotación (*Leica RM2155*, Alemania) para realizar tinciones histológicas: Hematoxilina-Eosina, Azul de Toluidina (*Merck*, Alemania), Safranina O (*Sigma-Aldrich*, EEUU) y Tricrómico de Masson. Además, se recogieron tres micromasas estimuladas y tres micromasas control para realizar la extracción de ARN y así poder realizar pruebas de expresión de los genes *ACAN* (agrecano), *COL2A1* (*collagen type II Alpha 1 chain*, colágeno 2A1) y *SOX9* (*SRY-box transcription factor 9*) (Neupane *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2010) (tabla 5) mediante *qPCR*.

Tabla 9. Tipos de cultivos realizados para el estudio de la capacidad de las células para diferenciarse a tres linajes distintos.

Diferenciación	Recipiente cultivo	n diferenciación	n control
Osteogénesis	Cámara 8 pocillos	3 pocillos/muestra	1 pocillo/muestra
Osteogénesis	Placa 6 pocillos	2 pocillos/muestra	1 pocillo/muestra
Adipogénesis	Cámara 8 pocillos	3 pocillos/muestra	1 pocillo/muestra
Adipogénesis	Placa 6 pocillos	2 pocillos/muestra	1 pocillo/muestra
Condrogénesis	Tubos propileno	4 micromasas/muestra	3 micromasas/muestra

2.2.1. Técnicas de tinción citoquímica e histoquímica

2.2.1.1. Tinciones citoquímicas

- Rojo Alizarina

Reactivos:

Solución rojo alizarina (2g de rojo alizarina (*Sigma-Aldrich*, EEUU) por cada 100 mL de agua destilada, pH entre 4,1 y 4,3).

Procedimiento:

1. Realizar lavados con *PBS* (*Oxoid*, Inglaterra) 1x frío dos veces.
2. Fijación de las células con paraformaldehído 4% (*Panreac Química S.A.*, España) en *PBS* durante 10 minutos.
3. Lavado con *PBS* 1x.
4. Tinción con la solución rojo alizarina durante 5 minutos.
5. Hacer un lavado en frío con *PBS* 1x.
6. Montaje de las muestras con *Glycergel* (*Dako Cytomation*, EEUU).

En las diferenciaciones osteogénicas, los depósitos cálcicos se observaron en tonos rojizos.

- **Oil Red O**

Reactivos:

Solución A (100 mL de alcohol isopropílico 60% (60 mL de 2-propanol (*Panreac Química S.A.*, España) y 40 mL de agua destilada) más 0,5 g de *Oil Red O* (*Sigma-Aldrich*, EEUU)); Solución de trabajo (60 mL solución A más 40 mL agua destilada y posterior filtrado).

Procedimiento:

1. Lavado con *PBS* 1x frío dos veces.
2. Fijar las células con paraformaldehído 4% durante 10 minutos a 4°C.
3. Cubrir las células con alcohol isopropílico al 60% durante 10 minutos en un recipiente cerrado.
4. Cubrir las células con la solución de trabajo durante 20 minutos.
5. Lavado con alcohol isopropílico 60%.
6. Lavado con agua destilada.
7. Sumergir en Hematoxilina de Gill III (*Panreac Química S.A.*, España) 2 minutos, para contrateñir.
8. Montaje de las muestras con *Glycergel*.

En las diferenciaciones adipogénicas, con esta tinción, observamos las gotas lipídicas acumuladas en el citoplasma de las células de color rojo, mientras que los núcleos son de color azulado por la contratinción con Hematoxilina.

2.2.1.2. Tinciones histoquímicas

Procedimiento previo para tinciones de micromasas:

1. Desparafinar las muestras a 60°C durante 30 minutos.
2. Sumergir las muestras en Xilol (*Panreac Química S.A.*, España) durante 10 minutos.
3. Hidratación de la muestra: 1. Pases en alcohol absoluto; 2. Pases en alcohol de 96°; 3. Pases en agua destilada.

- **Hematoxilina-Eosina**

Reactivos:

- Hematoxilina de Harris (*Panreac Química S.A.*, España).
- Eosina 0,7‰ (*Merck*, Alemania) en agua destilada.

Procedimiento:

Una vez realizado el procedimiento previo para las tinciones de micromasas, se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Sumergir las muestras en Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.

2. Lavar en agua corriente caliente para que vire la tinción.
3. Eosina durante 5 minutos.
4. Deshidratar la muestra en alcohol de 96°, etanol absoluto y xilol.
5. Montaje de las muestras con *DePeX* (*BHD VWR Internacional LTD*, Inglaterra).

La tinción de Hematoxilina-Eosina nos permite valorar la estructura y morfología general de las micromasas, donde los núcleos de las células se observan de color azul y el citoplasma de un color rosa.

- **Azul de Toluidina**

Reactivos:

Tampón acetato pH 4,2 (solución A 2,7g de acetato sódico (*Merck*, Alemania) en 100mL agua destilada; solución B 1,1 mL ácido acético 0,5M (*Panreac Química S.A.*, España) en 100 mL agua destilada; la solución de trabajo sería una mezcla de 30 mL de solución A con 90 mL de la solución B). Solución de azul de toluidina (*Merck*, Alemania) al 0,2%.

Procedimiento:

Una vez realizado el procedimiento previo para las tinciones de micromasas, se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Sumergir la muestra en azul de toluidina durante 5 minutos.
2. Lavar con tampón ácido acético pH 4,2.
3. Lavar con agua destilada y después agua corriente.
4. Pases en alcohol de 96°.
5. Deshidratar la muestra con alcohol 96°, etanol absoluto y xilol.
6. Montaje de las muestras con *DePeX*.

Este es un colorante metacromático acidófilo, lo que significa que cambia de color frente a determinados componentes. En las tinciones de micromasas sirve para poder evidenciar la presencia de proteoglicanos que aparecen de un color rojizo mientras que los núcleos y citoplasmas, se tiñen de color azul.

- **Safranina O**

Reactivos:

Solución stock (16,6 g Safranina O (*Sigma-Aldrich*, EEUU) en 241,6 mL de agua destilada y 258,3 mL de alcohol 96°); Solución de trabajo (50 mL de solución stock de Safranina + 200 mL de alcohol 50°), se filtra antes de utilizarla.

Procedimiento:

Una vez realizado el procedimiento previo para las tinciones de micromasas, se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Teñir con Safranina O (solución de trabajo) durante 30 minutos.
2. Deshidratar la muestra con etanol absoluto y xilol.
3. Montaje de las muestras con *DePeX*.

La Safranina O, que es un colorante catiónico, pone de manifiesto los proteoglicanos de la matriz generada en las micromasas tiñéndolos de un color naranja-rojizo.

- **Tricrómico de Masson**

Reactivos:

Solución de alumbre férrico (*Merck*, Alemania); solución de hematoxilina de Weigert, se prepara mezclando las soluciones A + B (1g de hematoxilina férrica (*Fluka*, Suiza) en 100 mL de alcohol absoluto dejándola madurar 7 días (solución A) y, por otro lado, 4 mL de cloruro férrico (*Merck*, Alemania) al 20% en 95 mL de agua destilada y 1 mL de ácido clorhídrico (*Panreac Química S.A.*, España) (solución B)) ; solución de ácido pícrico (*Panreac Química S.A.*, España) a saturación en alcohol de 96° y filtrar); solución de fucsina de Ponceau, preparándose con una mezcla de las soluciones A + B (0,5 g fucsina ácida (*Merck*, Alemania) en 1 mL de ácido acético y enrasar con agua destilada hasta 1000 mL (Solución A) y, por otro lado, se mezcla 1 g de fucsina de Ponceau (*Merck*, Alemania) en 1 mL de ácido acético y se enrasa con agua destilada hasta los 1000 mL); solución de azul de anilina (*Laboratorium Leipzig*, Alemania); ácido fosfomolibdico (*Merck*, Alemania).

Procedimiento:

Una vez realizado el procedimiento previo para las tinciones de micromasas, se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Sumergir en alumbre férrico 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Lavar en agua destilada.
3. Sumergir en hematoxilina férrica de Weigert durante 10 minutos.
4. Lavado en agua destilada.
5. Sumergir en alcohol-ácido pícrico durante 6 minutos.
6. Lavado en agua corriente 5 minutos.
7. Sumergir la muestra en fucsina de Ponceau durante 8 minutos.
8. Utilizar ácido fosfomolibdico I durante 5 minutos.
9. Sumergir en ácido fosfomolibdico II durante 5 minutos.
10. Sumergir la muestra en azul de anilina durante 12 minutos.
11. Lavado con agua destilada.
12. Deshidratación de la muestra alcohol 96°, etanol absoluto, xilol.

13. Montaje de la muestra con DePeX.

Esta tinción evidencia la presencia de colágeno en las micromasas tiñéndolo de un color azul intenso.

2.2.2. Técnica de cuantificación de la expresión génica mediante *qPCR*

2.2.2.1. Extracción de ARN

- **Micromasas**

Se recogieron tres micromasas en tubos *ependorf* y se lavaron con suero salino para eliminar los restos de medio. Una vez realizado, se procedió a realizar el siguiente protocolo:

1. Se introdujeron esferas de zirconio dentro de los tubos *ependorf* para deshacer las micromasas con la ayuda del homogenizador de tejidos (*DomeI*, Eslovenia) realizando 3 ciclos de 1' 30'' a una frecuencia de 25 (1/s). Entre ciclos se realizó un enfriamiento de las muestras con nitrógeno líquido.
2. Una vez que las micromasas estuvieron disgregadas, se añadió 1 mL de Trizol (*Molecular Research Center*, EEUU) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Se añadieron 200 μ L de cloroformo (*Sigma-Aldrich*, Francia) por cada mililitro de Trizol y se agitó a mano vigorosamente durante 15 segundos, tras lo cual se incubó de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.
4. Esta mezcla se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 *xg* y 4°C.
5. Se recuperó la fase superior y se transfirió a otro tubo *ependorf*, donde se añadió 1 μ L de glicógeno (*Sigma-Aldrich*, EEUU) y 500 μ L de isopropanol (*Sigma-Aldrich*, EEUU) por cada mililitro de Trizol.
6. La mezcla se incubó durante 48 horas a -20°C para precipitar el ARN.
7. 48 horas después se centrifugó 10 minutos a 12.000 *xg* y 4°C.
8. Se desechó el sobrenadante y se lavó el *pellet* de ARN con 1 mL de etanol 70° por cada mililitro de Trizol.
9. Se centrifugó durante 5 minutos a 7.500 *xg* y 4°C.
10. Se desechó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1 mL de etanol 100° por cada mililitro de Trizol.
11. Se centrifugó durante 5 minutos a 7.500 *xg* y 4°C.
12. Se desechó el sobrenadante, dejó secar el *pellet* de ARN y se resuspendió 10 μ L de agua de biología molecular (*Millipore*, EEUU).

Una vez terminado el proceso de extracción, las concentraciones de ARN se cuantificaron en un bio-espectrofotómetro para microgota y cubeta (*MySpec Twin* de VWR, Alemania), tras lo que se conservaron a -80°C hasta continuar con el siguiente paso.

- **Células en cultivo**

Una vez transcurridos los 21 días, se eliminó el medio y se lavaron con suero salino. Una vez lavadas se añadieron 500 mL de Trizol pipeteando repetidamente y se recogieron las células en un tubo *Eppendorf*. A continuación, se realizaron los mismos pasos que en el caso de la extracción de ARN de micromasas a partir del punto 3 (apartado [micromasas](#)).

2.2.2.2. Cuantificación y medidas de calidad del ARN

Se cuantificó y se realizaron medidas de calidad del ARN obtenido. Para ello se recogió de cada una de las muestras 1 µL que se midió en un bio-espectrofotómetro para microgota y cubeta (*MySPEC Twin* de VWR). De esta forma, se recogieron los datos de concentración de ARN (en ng/µL) y los valores de calidad, es decir la Absorbancia 260/230 que nos ofrece información sobre contaminación con alcoholes en la muestra y Absorbancia 260/280 que nos indica si la muestra tiene contaminación orgánica.

2.2.2.3. Síntesis ADN complementario

Para realizar la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizamos la *SuperScript Vilo MasterMix* (*Thermo Fisher*). La cantidad de ARN utilizado fue de 500 ng. Los pasos seguidos fueron los que aparecen a continuación:

1. *DNasa* (*Quiagen, IZASA*): A los 500 ng de ARN se añadió 0,5 µL de buffer; 0,5 µL de *DNasa* y agua de biología molecular hasta 7 µL. Una vez hecha la mezcla se incubó en el termociclador (*AB Applied Biosystems*) durante 30 minutos a 37°C.
2. *EDTA*: Una vez transcurrida media hora, se añadieron 0,5 µL de *EDTA* a la mezcla, y se incubó 10 minutos a 65°C.
3. *VILO*: Tras esos 10 minutos se añadieron 1,5 µL de la *SuperScript Vilo MasterMix*, y se incubó 10 minutos a 25°C – 90 minutos a 42°C – 5 minutos a 85°C.

Una vez que las muestras salieron del último ciclo del termociclador se guardaron a -20°C hasta su uso.

2.2.2.4. PCR a tiempo real (qPCR)

Para observar la expresión de los genes relacionados con la diferenciación, se utilizaron los *primers* y las sondas que vienen especificados en la tabla 6. Los *primers* fueron diseñados en la plataforma de centro de diseño de ensayo de *Roche Life Science*.

Tabla 10. Información de los *primers* y sondas utilizados para amplificar los genes objeto de estudio.

		<i>Primers</i>	% G/C	Gen	Nº sonda	Amplicón
Adipogénesis	<i>Forward</i>	5' ACC ATA AAG AGA AAA CGA GTG GA 3'	39	<i>FABP4</i>	77	64
	<i>Reverse</i>	5' AAG TGA CGC CTT TCA TGA TAC A 3'	41			
	<i>Forward</i>	5' GAG GCA CTT TTC AAC CAG GA 3'	50	<i>LPL</i>	60	61
	<i>Reverse</i>	5' CCT CTC TCT GCA ATC AGA CG 3'	55			
Osteogénesis	<i>Forward</i>	5' CAA TCT GTG TCA CTC ACT CCT GT 3'	48%	<i>IBSP</i>	38	60
	<i>Reverse</i>	5' GCT TCC TTT TGC AGT TCT GG 3'	50%			
	<i>Forward</i>	5' GAC ATT CCA GCA ACC CAA TTA 3'	43%	<i>SPP1</i>	78	62
	<i>Reverse</i>	5' CGG CCA TCA TAT GAA CCT CT 3'	50%			
	<i>Forward</i>	5' AAT GAC ACC ACC CAG CAA AT 3'	45%	<i>RUNX2</i>	36	36
	<i>Reverse</i>	5' GGG GCA CAG AAT TGA AAA GA 3'	45%			
Condrogénesis	<i>Forward</i>	5' CTT CTT TGT CAG CGG AGA GG 3'	55%	<i>ACAN</i>	9	60
	<i>Reverse</i>	5' TTC CAC TCT CCC TTC TCG TG 3'	55%			
	<i>Forward</i>	5' CAA GGG TCA CAG AGG CTA CC 3'	60%	<i>COL2A1</i>	7	73
	<i>Reverse</i>	5' CTC TCC CTT CAC ACC TGG AG 3'	60%			
	<i>Forward</i>	5' CCA ACG CCA TCT TCA AGC 3'	56%	<i>SOX9</i>	63	70
	<i>Reverse</i>	5' GAG TGC ACC TCG TTC ATG C 3'	58%			

Para cuantificar la expresión génica, se siguió el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Para esto se necesitó un gen de referencia (*housekeeping*). Para poder determinar cuál era el mejor gen de referencia se utilizó el algoritmo estadístico geNORM, utilizando el programa qbase⁺ (versión 3.1). Los genes de referencia que se analizaron fueron el *RPS5* (*ribosomal protein S5*), *B2M* (*beta-2-microglobulin*), *GAPDH* (*glyceraldehaye-3-phosphate dehydrogenase*), *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*), *RPS19* (*ribosomal protein S19*) y *RPL13A* (*ribosomal protein L13a*) (Brinkhof et al., 2006; Ayers et al., 2007; Peters et al., 2007). Los *primers* y las sondas que se utilizaron aparecen en la tabla 7.

Tabla 11. Información de los *primers* y sondas utilizados para realizar los análisis de los genes de referencia.

		<i>Primers</i>	%G/C	Gen	Nº sonda	Amplificón
Genes de referencia	<i>Forward</i>	5' AAG AAG GAT GAG CTG GAA CG 3'	50	<i>RPS5</i>	76	81
	<i>Reverse</i>	5' CCA AGG GCA GAC AGG TTT AT 3'	50			
	<i>Forward</i>	5' ACC TTC TAT CTT CTG GTC CAC ACT 3'	46	<i>B2M</i>	15	73
	<i>Reverse</i>	5' CAT GCT TTA CAC GGC AGC TA 3'	50			
	<i>Forward</i>	5' GCT GGG GCT CAC TTG AAA 3'	56	<i>GAPDH</i>	68	87
	<i>Reverse</i>	5' GTT CAC GCC CAT CAC AAA C 3'	53			
	<i>Forward</i>	5' TCA GGA AAG AAC AGA AGT GAT TGA 3'	38	<i>HPRT</i>	68	110
	<i>Reverse</i>	5' CAG AAC AAT ACC TTA AAT GCT GTC A 3'	36			
	<i>Forward</i>	5' GCT TGC TCC CTA CGA TGA GA 3'	55	<i>RPS19</i>	38	110
	<i>Reverse</i>	5' CCC CGT AGA TCT TAG TCA TGG A 3'	50			
	<i>Forward</i>	5' TTT TGG CGG ACA GTT AGA GG 3'	50	<i>RPL13A</i>	37	89
	<i>Reverse</i>	5' GGG ATC CCA TCA AAC ACC TT 3'	50			

Para cada uno de los genes de referencia se recogieron los ciclos umbrales (*cycle threshold, Ct*) que se transforman mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (tomando el valor de la muestra del *Ct* más bajo como valor de referencia) y se incluyeron en el programa qbase⁺, para poder utilizar el algoritmo geNORM. Este programa devuelve un valor denominado M, que se define como la variación a pares media de un gen particular frente a todos los otros genes normalizados (López, 2010). Este gen debe ser menor que 1,5 y, en función del valor de M, se determinó cuál era el gen más estable, y por lo tanto el mejor gen de referencia para cada uno de los experimentos. En este caso los genes de referencia para cada una de las condiciones fueron: para las células diferenciadas a adipogénesis los genes *RPS5* y *B2M*; para las células diferenciadas a condrogénesis *RPL13A*, *HPRT* y *B2M*; como ya se comentará más adelante, en el caso de la osteogénesis no fue posible realizar estos experimentos.

La *PCR* a tiempo real se llevó a cabo en un *LightCycler® 480 Instrument*, con *LightCycler® 480 Probes Master* y con sondas (*Roche Diagnostics, S.L.*). Las reacciones de *PCR* consistieron en:

- Pre-incubación 10 minutos a 95°C
- Amplificación, constando de hasta 45 ciclos de los pasos:
 - Incubación 10 segundos a 95°C
 - Extensión 30 segundos a 60°C
 - Enfriamiento 1 segundo a 72°C
- Rampa final de enfriamiento de 20 segundos a 40°C

Cada reacción contenía 2 μ L de ADNc, 5 μ L de *LightCycler*[®] 480 Probes Master, 0,35 μ L de primers sentido y antisentido, y 0,2 μ L de sonda en una concentración de 200 nM.

Una vez obtenidos los datos de las Ct por el equipo *LightCycler 480 Real Time PCR* (Roche), con la ayuda software *qbase*⁺ y *Graph Pad Prism 5.01*, se obtuvieron los resultados de las diferencias existentes entre las muestras diferenciadas y las muestras control, utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney.



Material y métodos

Evaluación clínica del tratamiento

Todos los procedimientos de este proyecto, así como las muestras y datos obtenidos, se realizaron bajo la firma voluntaria por parte de los dueños de los animales de un consentimiento informado (anexo...) (Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica). Al tratarse de un estudio clínico veterinario, los animales que entraron a formar parte de él no han sido estabulados en ningún centro, sino que se han mantenido con sus familias durante todo el año de estudio. En todos los casos se garantizó la confidencialidad de los datos identificativos, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), órgano habilitado. El proyecto se ha realizado conforme al Real Decreto 53/2013 (RD53/2013), cubriendo el “Documento de evaluación de severidad”, en el que se indica el criterio de punto final que se pondría en marcha de ser necesario.

1. Pacientes incluidos dentro del estudio

Dentro de esta tesis nos encontramos con tres grupos de perros. Uno de los grupos son los perros a los que les realizamos el seguimiento y a los que les realizamos una inyección intraarticular de CMEs derivadas de tejido adiposo, donado por diferentes clínicas veterinarias, en las articulaciones que sufrían de la enfermedad de la OA al que llamamos grupo de inyección intraarticular (**GI**). Los datos del grupo de perros (n = 11) al que llamamos grupo control (**GC**) en el que los perros fueron tratados con Meloxicam oral y el grupo de perros (n = 7) llamado grupo analítica (**GA**) a los que se les realizó una infiltración de CMEs derivadas de tejido adiposo, cultivadas por la empresa Integral Vetter S.L., en diferentes clínicas veterinarias del ámbito geográfico de España fueron colaboraciones externas con este proyecto. A este grupo se les realizó un análisis de sangre antes y después de la infiltración de CMEs, llevado a cabo por la empresa SEASLAB S.L.

2. Grupo inyección intraarticular (GI)

2.1. Criterios de inclusión/exclusión

El reclutamiento de estos perros se realizó siguiendo una serie de criterios de inclusión/exclusión (tabla 8).

Tabla 12. Relación de criterios de inclusión y exclusión seguidos durante la selección de pacientes para entrar a formar parte del estudio.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Consentimiento informado firmado	Presencia de una hemorragia intensa o trastorno trombótico
Artrosis diagnosticada	Haber sido transfundido en alguna ocasión
Mayor de 12 meses de edad	Tratamiento antineoplásico en los 2 años anteriores a la entrada en el estudio
En tratamiento ambulatorio	Neoplasia maligna pasada o actual
Si tratado con AINES, dosis estable desde 1 semana antes de la selección hasta que haya completado la visita del primer mes de estudio	Corticosteroides en un plazo de 4 semanas antes de la entrada en el estudio (intraarticulares, intramusculares o intravenosos)
Si es hembra, no cruzarse durante el periodo de estudio	Enfermedad infecciosa crónica o activa en curso que requiera un tratamiento sistémico
No subir más de un 15% de su peso durante el estudio	Proceso médico no controlado concomitante de importancia
Consentimiento por parte del propietario para realizar radiografías	Positividad conocida para Leishmaniosis
Mantenimiento del ritmo de vida	Cualquier vacuna (de microorganismos vivos, atenuados o muertos) en las 8 semanas anteriores a la visita basal (VB _{GI})

Este reclutamiento se llevó a cabo en las instalaciones del Hospital Veterinario 4 de Octubre de A Coruña, en una visita a la que denominamos VB_{GI} (figura 16).

A estos perros se les realizó una analítica de sangre (ANEXO “Análisis de sangre”), cuyos parámetros analizados aparecen recogidos en la tabla 9.

Tabla 13. Parámetros de las analíticas recogidos de cada uno de los perros dentro del grupo GI. V.C.M. (volumen corpuscular medio); H.C.M. (hemoglobina corpuscular media); C.H.C.M. (concentración de hemoglobina); R.D.W. (índice de distribución de los hematíes); V.P.M. (volumen plaquetario medio); ALT (alanina aminotransferasa); AST (aspartato aminotransferasa).

Serie roja	Serie blanca	Plaquetas	Bioquímica	Otros
<ul style="list-style-type: none"> - Hemtíes (mil/mm³) - Hemoglobina (g/dL) - Hematocrito (%) - V.C.M. (fL) - H.C.M. (pgr) - C.H.C.M. (g/dL) - R.D.W. (%) - Reticulocitos (%) 	<ul style="list-style-type: none"> - Leucocitos (x10³/mm³) - Segmentados (%) - Linfocitos (%) - Monocitos (%) - Eosinófilos (%) - Basófilos (%) - Cayados (%) 	<ul style="list-style-type: none"> - Plaquetas (x10³/mm³) - V.P.M. (fL) 	<ul style="list-style-type: none"> - Glucosa (mg/dL) - Urea (mg/dL) - Creatinina (mg/dL) - Colesterol total (mg/dL) - Triglicéridos (mg/dL) - Proteínas totales (g/L) - Albúmina (g/L) - Globulinas totales (g/L) - ALT (UI/L) - AST (UI/L) - Creatina fosfoquinasa (UI/L) - Fosfatasa alcalina (UI/L) - Bilirrubina total (mg/dL) - Lipasa (UI/L) - Amilasa (UI/L) 	<ul style="list-style-type: none"> - Frotis sanguíneo

2.2. Procedimiento seguido con los perros GI

A los pacientes dentro del GI se les realizó una infiltración de CMEs en aquellas articulaciones que mostraban signos de OA. Una vez infiltradas, se realizaron una serie de visitas a lo largo de 12 meses (figura 16) en las cuales se realizaron diferentes pruebas.

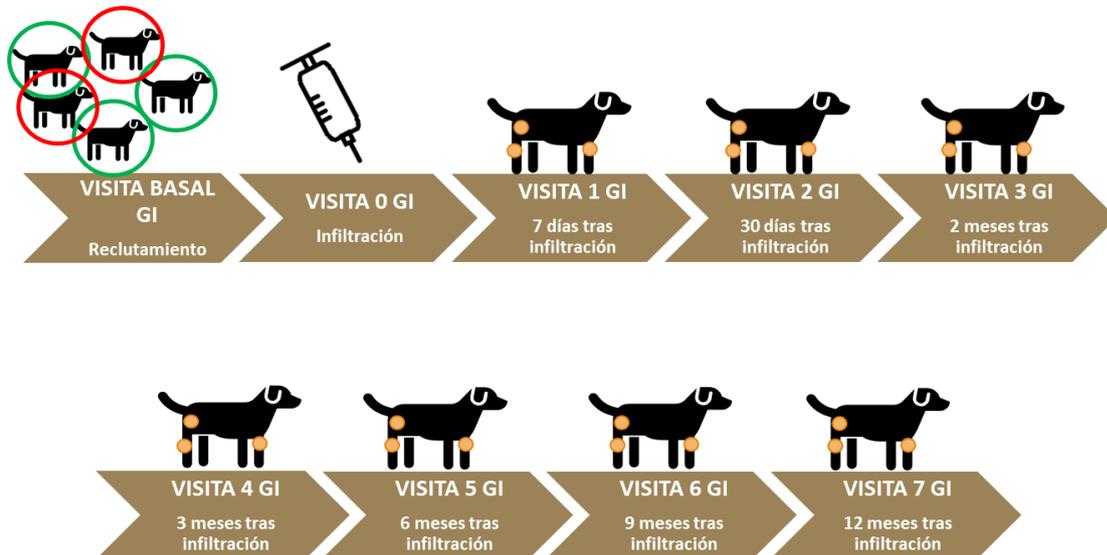


Figura 33. Diferentes visitas a lo largo de un año de evaluación de las articulaciones de los perros seleccionados.

2.2.1. Visita basal GI (VB_{GI})

En esta visita se realizó el reclutamiento de los pacientes siguiendo los criterios de inclusión/exclusión comentados en el apartado “[criterios de inclusión/exclusión](#)”. Grupo inyección intraarticular (GI). Según los datos obtenidos después de revisar esos criterios, los perros entraron o no a formar parte del GI para continuar con el estudio.

También se llevó a cabo un análisis de las radiografías cedidas por los dueños, para observar y determinar cómo se encontraban las articulaciones. Para realizar la valoración se siguieron los parámetros establecidos por la *Escala Bioarth* (Sánchez-Carmona *et al.*, 2006; <https://bevet.com/servicios/escalabioarth>), descrita en la introducción apartado “[valoración radiográfica](#)”.

Además, se realizó una exploración inicial, en la que se tomaron datos por parte del veterinario (funcionalidad articular, movilidad articular y atrofia muscular) (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Veterinarios”). Los dueños cubrieron un cuestionario en el que contestaron a preguntas relacionadas con el comportamiento de su mascota en cuanto a movilidad, además de cubrir una escala visual analógica (EVA) en la que marcaban el dolor aproximado que creían que sufría su perro (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Dueños”).

En esta visita, se les explicó más en detalle a los dueños en qué consistiría el estudio, se les dio un teléfono de contacto para cualquier duda que tuvieran y firmaron el consentimiento informado (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Consentimiento informado”) para que sus mascotas pudieran entrar a formar parte del estudio.

2.2.2. Visita 0 GI (V0_{GI})

Se corresponde con la visita en la que se inyectaron las CMEs en las articulaciones a tratar, que fueron cadera, codo o rodilla (figura 17).

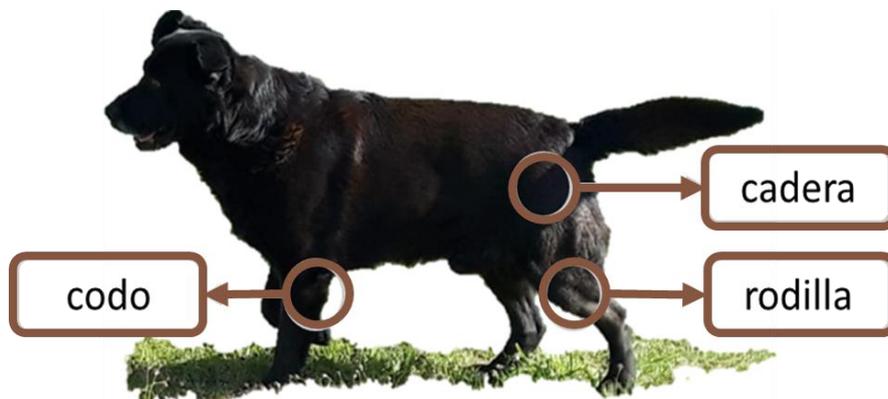


Figura 17. Articulaciones tratadas en este estudio.

Para la infiltración las CMEs criopreservadas se descongelaron en placas de 150 cm² (Corning, EEUU) y se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar el número de células adecuado para infiltrar en cada caso. En este estudio el número de células infiltradas por articulación fue de 1×10^6 células por kg de peso del perro.

Una vez que los cultivos alcanzaron el crecimiento adecuado, se procedió a recoger las células de las placas siguiendo el protocolo de subcultivo celular (apartado “obtención y cultivo celular”). Estas células se lavaron dos veces con suero salino centrifugándolas a 250 xg durante 8 minutos. Tras estos lavados se introdujeron en un vial para ser transportadas al Hospital Veterinario 4 de Octubre, instalación en las que se realizaron las inyecciones intraarticulares.

Antes de inyectar las células, los viales se atemperaron para que estuviesen a una temperatura lo más cercana posible a la de la activación celular (36-37°C). A continuación, se disgregaron las células, golpeando suavemente la base de los viales. Por último, las células del vial se recogieron con una aguja estéril (BD Bioscience 20G) de forma estéril y suave para evitar el lisado celular.

A los perros se les administró una sedación profunda con dexmedetomidina (3µg/kg) y butorfanol (0,2 mg/kg) + meloxicam (0,2 mg/kg) para proceder a continuación con el proceso de la infiltración de las CMEs.

Una vez que los perros estuvieron sedados, se les rasuró y desinfectó la zona en la que se iba a proceder a infiltrar las células, para así evitar la posible contaminación de la articulación a tratar. A continuación, de forma estéril, se introdujo una aguja de calibre 20 G a 24 G (en función del tamaño del paciente) en la articulación, conectada a una jeringa de 1 o 2 mL y se aspiró el líquido sinovial para comprobar la entrada de ésta en la articulación. Tras realizar esto, se retiró la jeringa con cuidado, sin mover la aguja, y se conectó entonces la jeringa que se cargó previamente en el proceso de preparación de las células. Por último, se inyectaron las células de forma lenta dentro de la articulación a tratar.

En el caso del **codo**, la infiltración de las CMEs se realizó buscando la zona por palpación. Para ello el codo se situó semiflexionado. A continuación, la aguja se situó de forma paralela al olecranon entre éste y la zona caudal del epicóndilo lateral. La aguja avanza en una trayectoria distal y ligeramente medial hacia la fosa del olécranon. Se aspira levemente (para comprobar la salida de líquido sinovial con una jeringa vacía) y a continuación se administran las CMEs en esa zona (figura 18).

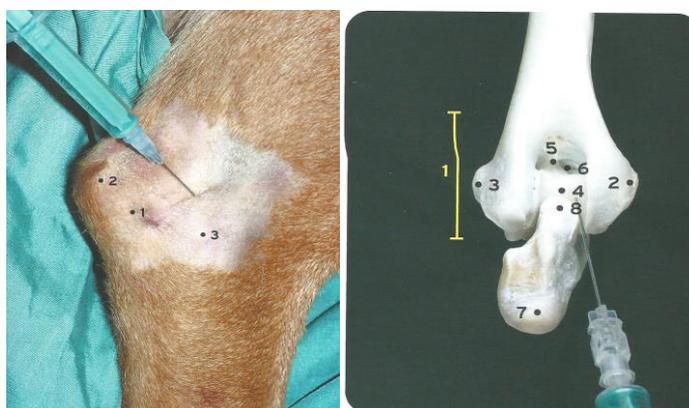


Figura 18. Zona de infiltración de las CMEs en codos.

En cuanto a la infiltración de la **rodilla**, ésta se situó semiflexionada, introduciendo la aguja en el triángulo delimitado por la meseta tibial, el cóndilo femoral y el ligamento rotuliano (figura 19). El resto del procedimiento es del mismo modo que en el codo (se aspira suavemente para comprobar, al extraer líquido sinovial, que estamos dentro de la articulación).

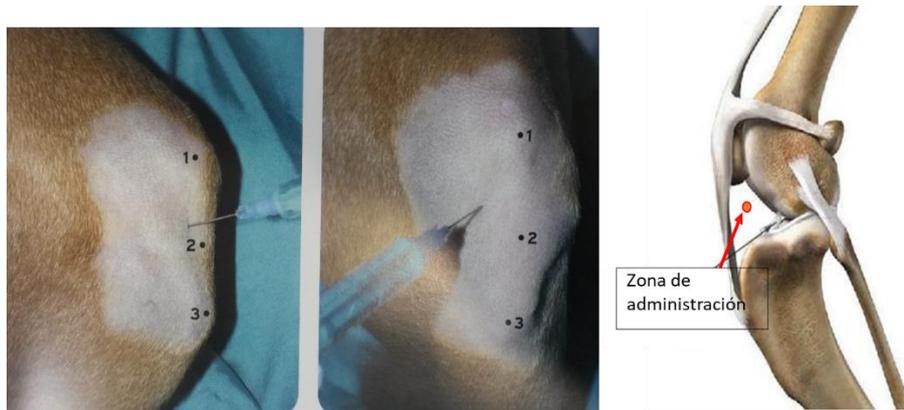


Figura 19. Zona de administración de CMEs en rodilla.

En la inyección intraarticular de las **caderas**, se utilizó un ecógrafo. Con esta técnica se buscó el acetábulo articular de la cadera, y fue en esa zona donde se realizó la inyección de las CMEs (Bergamino *et al.*, 2015) (figura 20).

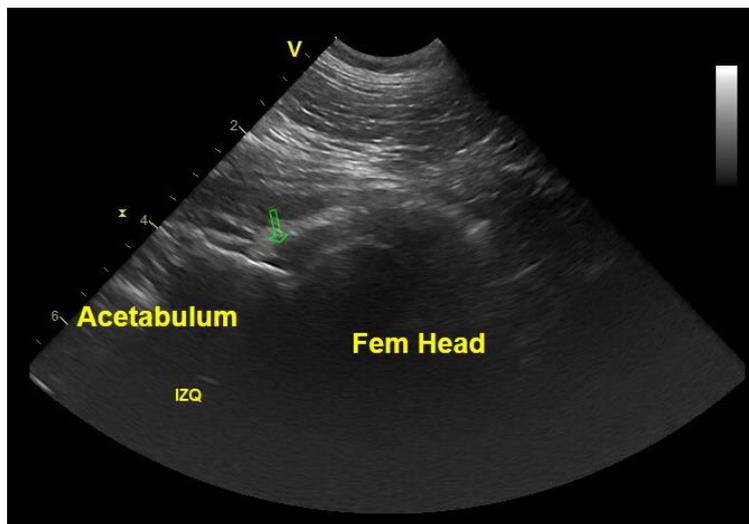


Figura 20. Imagen de ecografía para la inyección intraarticular de las CMEs en cadera. La flecha verde indica el lugar donde se infiltraron las CMEs.

El pinchazo en la membrana sinovial puede dar lugar a un proceso inflamatorio leve y/o molestias en dicha articulación durante unos días, por lo que, por ello, a todos los animales a los que se les realizó la inyección, se les recetó el AINE meloxicam (0,1 mg/kg) durante 3 días para que los dueños se lo administraran en el caso de que observaran molestias/inflamación de los animales.

2.2.3. Visita 1 GI (V1_{GI})

Se corresponde con una semana después de haber realizado la inyección intraarticular de las CMEs.

En esta visita el veterinario realizó una exploración de las articulaciones tratadas con el fin de determinar si existía algún tipo de inflamación. A los perros también se les midió la fiebre, la frecuencia cardíaca (FC) y la frecuencia respiratoria (FR). Los dueños cubrieron la EVA para darnos una visión del dolor general que podían estar sufriendo los perros.

2.2.4. Visitas 2, 3, 4, 5 y 6 GI (V2_{GI}, V3_{GI}, V4_{GI}, V5_{GI} y V6_{GI})

Estas visitas se corresponden con: V2_{GI}, un mes después de realizar la inyección intraarticular; V3_{GI}, dos meses después de realizar la inyección intraarticular; V4_{GI}, tres meses después de realizar la inyección intraarticular; V5_{GI}, seis meses después de realizar la inyección intraarticular; V6, 9 meses después de realizar la inyección intraarticular.

En todas estas visitas se realizó la evaluación de las articulaciones por parte del veterinario (funcionalidad articular, movilidad articular y atrofia muscular) (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Veterinarios”) y también se recogieron datos de la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura (T^a). Además, los dueños, al igual que en la visita basal, cubrieron un cuestionario establecido (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Dueños”) para observar los cambios de comportamiento en cuanto al movimiento que fueron sufriendo sus perros, y también cubrieron la EVA para determinar cuál era el grado de dolor que pensaban que los perros sentían.

2.2.5. Visita 7 GI (V7_{GI})

La V7 se corresponde con la última visita, 12 meses después de que los animales fueran tratados con las CMEs.

En esta última visita, además de realizar la misma evaluación que en las 5 visitas anteriores, se realizó una radiografía para poder comparar las posibles diferencias entre la radiografía valorada antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después. Para realizar la valoración de estas radiografías se utilizó, al igual que en la V0_{GI}, la Escala Bioarth.

Tabla 14. Resumen de las técnicas realizadas en cada una de las visitas a lo largo de los 12 meses de estudio.

Técnicas	V _B _{GI}	V ₀ _{GI}	V ₁ _{GI}	V ₂ _{GI}	V ₃ _{GI}	V ₄ _{GI}	V ₅ _{GI}	V ₆ _{GI}	V ₇ _{GI}
Revisión criterios inclusión/exclusión	X								
Radiografía	X								X
Análisis de sangre	X								X
Valoración veterinaria de las articulaciones	X			X	X	X	X	X	X
Valoración de los dueños	X			X	X	X	X	X	X
EVA	X		X	X	X	X	X	X	X
Infiltración CMEs		X							
Revisión inflamación			X						
FC, FR y T ^a			X	X	X	X	X	X	X

3. Grupo control (GC)

En el caso del GC, estos datos pertenecen a un seguimiento que veterinario de una n igual a 11 perros a lo largo de seis meses tras tratarlos con el antiinflamatorio Meloxicam.

3.1. Población perros GC

Dos de los 11 perros que entraron en este estudio fueron excluidos porque el Meloxicam no fue suficiente para reducirles el dolor, con lo que se les cambió el tratamiento.

Los datos de razas, sexo, edad y peso de los 9 perros que continuaron dentro del estudio aparecen recogidos en la tabla 11.

Tabla 15. Información demográfica de los animales que entraron a formar parte del GC. M: Mestizo; GR: Golden Retriever; BF: Bulldog Francés; CC: Chow-Chow; L: Labrador.

	n (%)	media ± dt	rango
Edad (años)		8,7 ± 1,41	7 – 11
Sexo	6 (66,7) ♂ 3 (33,3) ♀		
Peso (kg)		24,9 ± 7,37	12,8 – 32,7
Razas	3 (33,3) M 2 (22,2) GR 1 (11,1) BF 1 (11,1) CC 2 (22,2) L		

El número de articulaciones evaluadas en este grupo fue igual a 15.

3.2. Procedimiento seguido con los perros GC

A los perros incluidos dentro del grupo GC se les administró mediante vía oral Meloxicam, medicamento utilizado de forma rutinaria en medicina veterinaria para tratar dolor en los perros. El Meloxicam se encuadra dentro de los AINEs cuya acción es inhibir las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2. La dosis administrada de este AINE fue de 0,1 mg/kg a lo largo de 15 días, a algunos perros les dieron 2, e incluso, 3 dosis. Estos perros realizaron diversas visitas a lo largo de 6 meses (figura 21) en las que se les evaluaron las articulaciones que presentaban la dolencia de la OA.

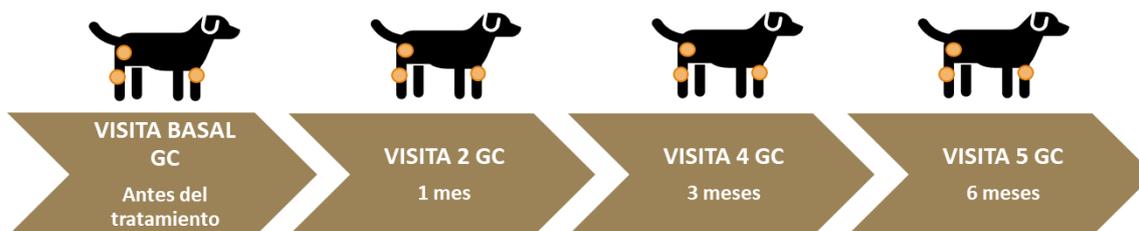


Figura 34. Diferentes visitas a lo largo de seis meses de evaluación de las articulaciones de los perros seleccionados.

3.2.1. Visita basal GC (VB_{GC})

En la visita basal a estos perros se les realizó una evaluación de la funcionalidad articular, movilidad articular y atrofia muscular (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Veterinarios”) por parte del veterinario. Además, los dueños cubrieron la EVA para indicar el dolor general que pensaban que sufría su mascota, así como contestaron a una serie de preguntas (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Dueños”) que dieron una visión del comportamiento de la mascota en casa.

Además, se realizó la valoración de las radiografías de las articulaciones afectadas siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado “[valoración radiográfica](#)” al igual que en el grupo GI.

3.2.2. Visitas 2, 4 y 5 GC (V2_{GC}, V4_{GC} y V5_{GC})

Una vez que se trataron los perros con el antiinflamatorio Meloxicam (una dosis de 0,1 mg/kg), se realizaron varias visitas a lo largo de 6 meses para observar la evolución del dolor de las articulaciones que presentaban la enfermedad de la OA. Estas visitas se corresponden a: V2_{GC}, un mes; V4_{GC}, tres meses; V5_{GC}, seis meses. Para ello, y al igual que en la VB_{GC}, el veterinario evaluó la funcionalidad articular, movilidad articular y atrofia muscular (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Veterinarios”). Los dueños también aportaron datos, como el dolor general que parecía sentir sus perros mediante la EVA.

A todos los perros excepto dos se les trató con una segunda dosis de Meloxicam a los dos meses del primer tratamiento, al igual que en la V4_{GC}, que se administró una tercera dosis en 8 de los 11 perros.

4. Grupo analítica (GA)

Este grupo está conformado por 7 perros a los que se les realizaron analíticas de sangre antes y después de ser tratados con CMEs autólogas o alogénicas (tabla 13).

4.1. Población perros GA

Los datos de razas, sexo, edad y peso de los 8 perros que se encuentran dentro del GA son los que aparecen en la tabla 12.

Tabla 16. Información demográfica de los animales que entraron a formar parte del GA. M: Mestizo; P: Podenco; CC: Chow-Chow; BC: Border Collie; GR: Golden Retriever; BB: Bollero de Berna; R: Rotweiler.

	n (%)	media ± dt	rango
Edad (años)		6,57 ± 1,9	3 – 9
Sexo	4 (50) ♂ 4 (50) ♀		
Peso (kg)		31,7 ± 14,1	9,6 – 53
Razas	2 (25) M 1 (12,5) P 1 (12,5) CC 1 (12,5) BC 1 (12,5) GR 1 (12,5) BB 1 (12,5) R		

4.2. Procedimiento seguido con los perros GA

Dentro de este grupo los perros fueron tratados con CMEs autólogas o alogénicas (tabla 13). Para aquellos perros tratados con las CMEs alogénicas se utilizó el mismo donante. Las células fueron preparadas por la empresa Integral Vetter y enviadas a las clínicas veterinarias a las que pertenecían cada uno de los perros tratados.

Tabla 17. Datos sobre el tipo de CMEs que se infiltraron en los perros dentro del grupo GA (PA, perro analítica).

Perro	CMEs autólogas/CMEs alogénicas
PA01	Autólogas
PA02	Alogénicas
PA03	Alogénicas
PA04	Alogénicas
PA05	Alogénicas
PA06	Alogénicas
PA07	Autólogas
PA08	Alogénicas

Las analíticas de sangre se llevaron a cabo en el laboratorio SEASLAB S.L. Estas analíticas se realizaron antes y una semana después del tratamiento con CMEs.

De las analíticas realizamos el análisis de la proteína C reactiva. Esta proteína, producida en el hígado como respuesta a la presencia de citoquinas proinflamatorias se utiliza, por lo tanto, como marcador de inflamación en varias enfermedades tanto en humanos, como la arterosclerosis, o en perros, en enfermedades inmunomediadas (Nakamura *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2018). Nosotros evaluamos si existían diferencias de esta proteína antes y después de la inyección intraarticular de las CMEs tanto autólogas (del mismo paciente) como alogénicas (de un paciente a otro).

Para cuantificar la proteína C reactiva, los sueros de las sangres de los perros se analizaron en el laboratorio SEASLAB S.L., en el que utilizaron un método inmunoturbidimétrico. Para ello mezclaron 180 µL de unas partículas de látex que contenían anticuerpos contra la proteína C reactiva fijados covalentemente con 2 microlitros de muestra. Estas partículas se unen a la proteína C reactiva formando inmunoagregados que aumentaban la turbidez del suero. Inmediatamente después de haber añadido las partículas se realizó una primera medida de absorbancia a 600 nm. A continuación, se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos y se volvió a realizar una lectura de la absorbancia a 600 nm. Por último, se determina el aumento de la absorbancia (segunda lectura menos la primera) y este aumento de absorbancia es proporcional a la concentración de proteína C reactiva (se calcula utilizando una curva de calibración con los calibradores que son aportados por el kit) (*Acuvet Biotech*, España).

5. Análisis estadístico

5.1. Evaluación de la evolución de los parámetros veterinarios del GI

Para conocer la evolución que presentaron las articulaciones tratadas con CMEs a lo largo de los 12 meses, hemos realizado un análisis descriptivo de cada uno de los parámetros evaluados por el veterinario (funcionalidad articular, movilidad articular y atrofia muscular).

5.1.1. Funcionalidad articular

Para la funcionalidad articular, el veterinario observó para cada una de las articulaciones las siguientes variables obtenidas de la Escala *Bioarth*, cada una de ellas con cuatro categorías (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Veterinarios”):

1) Cambios de los apoyos en la estación

- * Apoyo normal
- * Desplaza carga
- * Apoya solo dedos
- * No apoya

- 2) Cambio de postura al levantarse
 - * Se levanta correctamente
 - * Modifica posición
 - * Presenta muchas dificultades
 - * No se levanta
- 3) Cojera en frío
 - * No cojea
 - * Cojera leve
 - * Cojera intensa
 - * No apoya
- 4) Cojera en caliente (tras 10 minutos de marcha)
 - * No cojea
 - * Cojera leve
 - * Cojera intensa
 - * No apoya

El veterinario recogió dichas variables para cada articulación evaluada en cada uno de los perros.

Una vez recolectados los datos, se realizó un análisis descriptivo comparando el porcentaje de articulaciones que mejoraron, se mantuvieron o empeoraron entre la VB_{GI} y las demás visitas utilizando el programa SPSS (*IBM SPSS Statistics v.24*). Se calculó el cambio en cada visita respecto a la visita basal (VB) como la diferencia entre el valor basal y el observado en la correspondiente visita. Se consideró mejoría en aquellos casos con diferencia positiva, empeoramiento en aquellos con diferencia negativa y, se consideró que se mantenía en los casos con diferencia nula.

5.1.2. Movilidad articular

En el caso de la movilidad articular tenemos tres variables distintas, al igual que en el caso de la funcionalidad, basadas en la Escala *Bioart*. La primera de ellas con cuatro categorías, mientras que las otras dos con tres (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Veterinarios”):

- 1) Movilidad articular manual pasiva
 - * Sin dolor ni crepitación
 - * Dolor leve
 - * Dolor y/o crepitación
 - * Dolor y/o crepitación elevado
- 2) Limitación movimiento flexión

- * Flexión total
 - * Ligera limitación
 - * Limitación severa
- 3) Limitación movimiento extensión
- * Extensión total
 - * Ligera limitación
 - * Limitación severa

El veterinario cubrió el cuestionario en el que se encontraban esas variables en función de lo que observaba en la evaluación de las articulaciones.

Una vez recolectados los datos, se realizó un análisis descriptivo comparando el porcentaje de articulaciones que mejoraron, se mantuvieron o empeoraron entre la VB_{GI} y las demás visitas utilizando el programa SPSS, y siguiendo la metodología descrita en el apartado “[Funcionalidad articular](#)”.

5.1.3. Atrofia muscular

Para la atrofia muscular existen tres categorías (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Veterinarios”): no hay signos de atrofia; atrofia leve; atrofia severa.

El veterinario cubrió el cuestionario en el que se encontraban esas variables en función de lo que observaba en la evaluación de las articulaciones.

Una vez recolectados los datos, se realizó un análisis descriptivo comparando el porcentaje de articulaciones que mejoraron, se mantuvieron o empeoraron entre la VB_{GI} y las demás visitas utilizando el programa SPSS, y siguiendo la metodología descrita en el apartado “[Funcionalidad articular](#)”.

5.2. Evaluación de la evolución de las variables observadas por los dueños del GI

Por un lado, los dueños cubrieron un cuestionario con preguntas que nos brindaron información sobre posibles cambios en el comportamiento del perro (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Dueños”). Para la redacción del cuestionario nos basamos en la Escala *Bioarth* y en otros estudios clínicos con perros que realizaban una evaluación similar a la que realizamos nosotros (Bennett *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014; Serrato, 2015). Una vez obtenidos esos datos, pudimos realizar un análisis descriptivo en el que observamos si existía una mejora en los cambios de comportamiento de los perros en sus casas comparando la VB_{GI}

frente al resto de visitas siguiendo la metodología descrita en el apartado “[Funcionalidad articular](#)”.

Además de los cambios de comportamiento, los dueños nos ofrecieron información de si observaban que su mascota tuviera mayor o menor dolor o se mantenía conforme pasaban las visitas, para lo que utilizamos, como ya se ha descrito anteriormente, la EVA (ANEXO “Cuestionarios y consentimiento informado – Dueños”). Para comparar los resultados recogidos en la VB_{GI} con el resto de visitas, utilizamos la prueba de rangos con signo de Wilcoxon utilizando el software SPSS, puesto que nos permite comparar una misma variable que cambia a lo largo del tiempo.

5.3. Evaluación del dolor del GC siguiendo los datos obtenidos de los dueños

En el caso del GC (aquellos perros tratados con el antiinflamatorio Meloxicam), nos cedieron los datos del EVA que habían cubierto los dueños. Para comparar los resultados recogidos en la VB_{GC} con el resto de visitas, utilizamos la prueba de rangos con signo de Wilcoxon utilizando el software SPSS, puesto que nos permite comparar una misma variable que cambia a lo largo del tiempo.

5.4. Comparación GI vs. GC parámetros veterinarios

Para realizar la comparativa entre los dos grupos de perros en primer lugar, calculamos en porcentaje el número de articulaciones clasificándolas en cada una de las articulaciones que hemos tratados codo, cadera o rodilla, para observar si existían diferencias en cuanto a ese parámetro mediante una tabla cruzada con el programa SPSS.

A continuación, y también mediante el uso de tablas cruzadas, realizamos una comparación del porcentaje de articulaciones tratadas que mejoraban, se mantenían o empeoraban en la VB frente a las visitas de 1 mes, 3 meses y 6 meses, del GC frente al GI para cada una de las variables seleccionadas.

5.5. Comparación GI vs. GC EVA

Para compara los valores de la EVA cubierta por los dueños de los perros de los dos grupos, se aplicó la prueba de Mann – Whitney con el SPSS. En primer lugar, calculamos la disminución de la EVA en comparación con la VB en cada una de las visitas (V2, V4 y V5) para ambos grupos y, a continuación, calculamos si existían diferencias significativas entre las disminuciones del GI frente al GC.



Resultados

Obtención y caracterización de las
células

1. Obtención y cultivo de las células procedentes de tejido adiposo

Los cultivos celulares procedentes de diferentes donantes de grasa (n = 13 muestras) de este estudio presentaron adherencia al plástico de cultivo y morfología fibroblástica (figura 22), tras los dos *preplatings*, gracias a los cuales se eliminaron los macrófagos presentes en el cultivo una vez procesada la grasa. De estas 13 muestras de células, seleccionamos las cinco con las mejores características morfológicas y de crecimiento (figura 22).

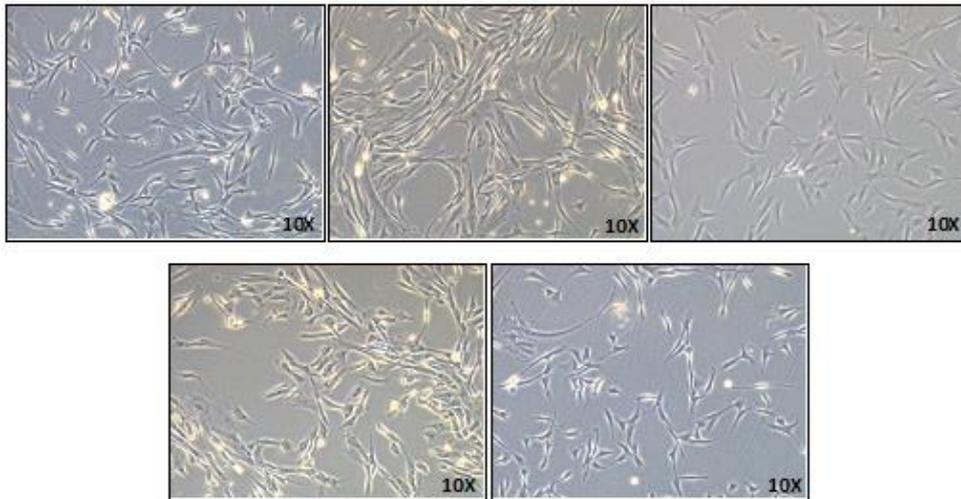


Figura 22. Células en cultivo en fase 1 (S1) seleccionadas para la infiltración.

Estas cinco muestras de células tuvieron un crecimiento medio de S_0 a S_1 igual a $6 \pm 1,87$ días, mientras que las otras 8 muestras de células no seleccionadas este crecimiento medio de S_0 a S_1 fue igual a $8,87 \pm 3,85$ días. Además, la cantidad media de células obtenidas en las 5 muestras seleccionadas en S_1 fue mayor que en las 8 muestras descartadas ($18 \pm 14,3$ millones de células y $3,93 \pm 1,38$ millones de células, respectivamente).

2. Caracterización celular

2.1. Citometría

La media y desviación estándar de los marcadores típicamente descritos como positivos para las CMEs de las 13 muestras de células obtenidas fueron CD29 ($92,16\% \pm 11,6$), CD44 ($95,05\% \pm 5,1$), CD73 ($26,98\% \pm 21,39$), CD90 ($83,87\% \pm 18,43$) y CD105 ($49,88\% \pm 30,06$) (figura 23). Para los marcadores descritos como típicamente negativos, los resultados obtenidos con nuestras células fueron para el CD34 ($2,09\% \pm 2,32$), CD45 ($1,1\% \pm 0,78$) y MHC clase II ($0,47\% \pm 0,38$) (figura 23). En la tabla... aparecen los valores de estos marcadores para las cinco muestras de células seleccionadas para utilizar en las inyecciones intraarticulares, y también se puede observar la comparación de su representación gráfica en la figura 23.

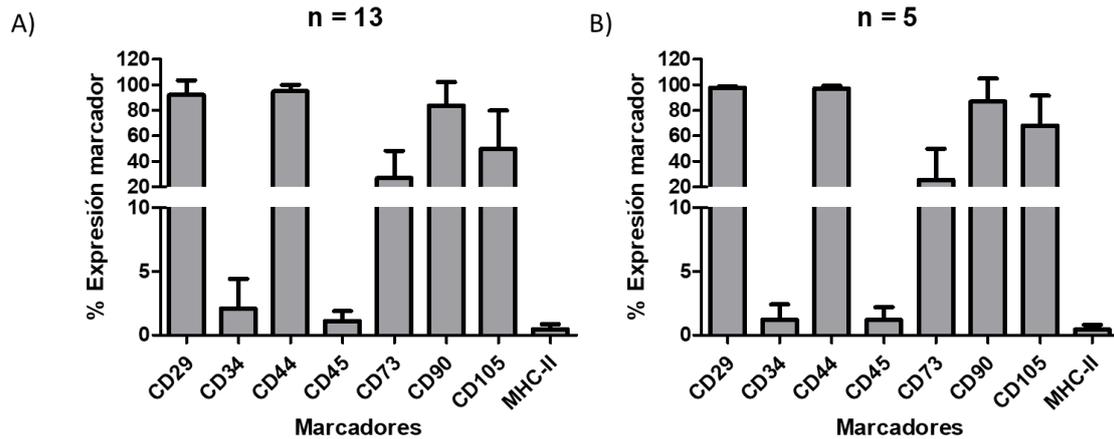


Figura 23. A) Representación del porcentaje de expresión de los distintos marcadores de superficie de las células seleccionados en todas las muestras seleccionadas para el estudio. B) Representación del porcentaje de expresión de los distintos marcadores de superficie seleccionados de las células en las 5 muestras seleccionadas para ser infiltradas.

Para determinar si la media del porcentaje de positividad para cada uno de los marcadores no tenía diferencias significativas entre las cinco muestras seleccionadas y las ocho restantes, aplicamos la prueba de Mann – Whitney (tabla 14).

Tabla 18. Valores medios del porcentaje de positividad de los marcadores de superficie de las muestras no seleccionadas (8 muestras) y las seleccionadas (5 muestras). p-valor obtenido de la prueba Mann-Whitney.

	8 muestras (media ± dt) (%)	5 muestras (media ± dt) (%)	p-valor
CD29	89,33 ± 13,52	97,14 ± 1,42	0,089
CD34	2,65 ± 2,7	1,2 ± 1,3	0,241
CD44	93,66 ± 6,03	97,27 ± 2,1	0,143
CD45	0,96 ± 0,65	1,33 ± 0,98	0,461
CD73	27,83 ± 18,87	25,62 ± 27,29	0,464
CD90	81,92 ± 18,36	86,97 ± 20,23	0,464
CD105	38,52 ± 27,52	68,05 ± 26,31	0,107
MHC II	0,5 ± 0,38	0,43 ± 0,43	0,658

Como se puede observar, ninguno de las medias de los porcentajes de positividad de los marcadores presenta diferencias significativas entre las muestras seleccionadas (5 muestras) y el resto (8 muestras).

Observando los datos obtenidos en cuanto a la caracterización fenotípica y de diferenciación, podemos determinar que las cinco muestras de células obtenidas de tejido adiposo presentan características de CMEs, por lo que de aquí en adelante las denominaremos de esta forma.

2.2. Capacidad de diferenciación

A las células que posteriormente serían infiltradas (n = 5 muestras distintas), se les indujo la diferenciación hacia tres linajes distintos: adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis. Para determinar si estas células presentaban esta capacidad se realizaron tinciones citológicas, histológicas y expresión génica.

2.2.1. Adipogénesis

Tinción citológica

La tinción Oil Red O se caracteriza por evidenciar, de color rojo, la presencia de gotas lipídicas dentro del citoplasma de las células que han sufrido diferenciación adipogénica. En las muestras analizadas para esta tesis se observó que solamente una de ellas mostraba esta tinción en las células estimuladas con medio de diferenciación (figura 24). En algunos casos se pudo observar un cambio morfológico con respecto al control (figura 24). En los cultivos control, los que no fueron estimulados con medio de diferenciación adipogénica, se observó algo de tinción basal.

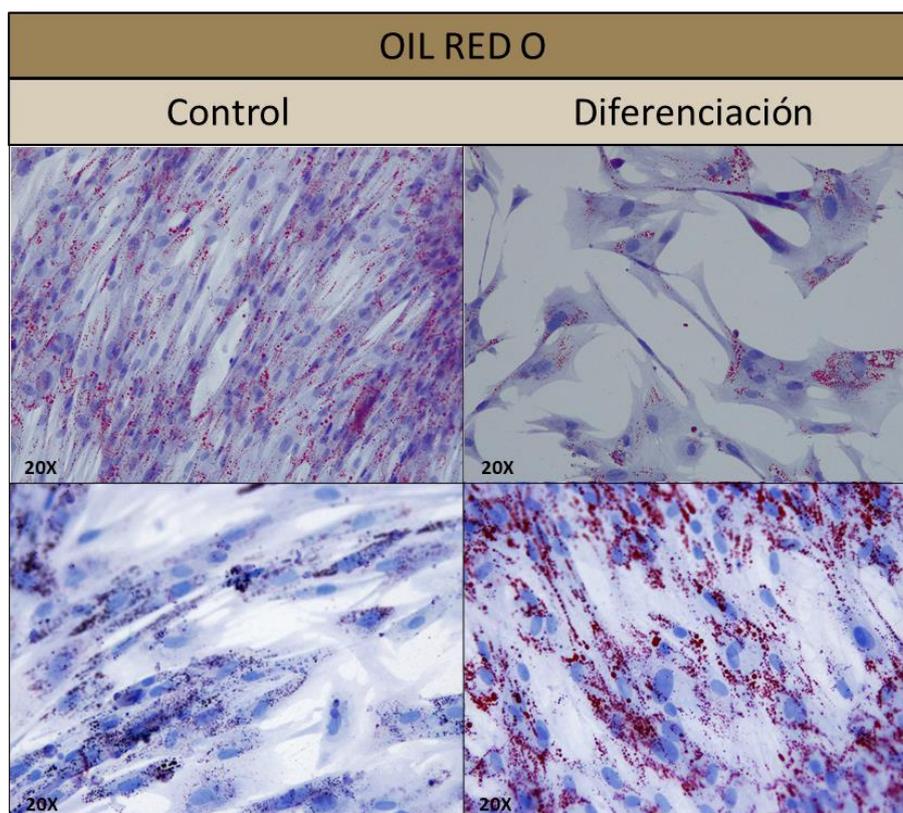


Figura 24. Tinción *Oil Red O* de dos de las muestras celulares seleccionadas para la infiltración. A) Se observa el cambio de morfología de las células y un pequeño aumento de la cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma entre el control y la diferenciación; B) Se observa el aumento significativo de cantidad de gotas lipídicas entre el control y las células en diferenciación. Todas las imágenes están a 20X aumentos.

Expresión génica

En cuanto a los genes que hemos analizado para determinar si se había inducido la diferenciación adipogénica en las células, se han observado diferencias significativas entre la expresión de las células control (cultivadas en *DMEM* al 20% SBF) y las células cultivadas en medio de inducción a la adipogénesis. Así, observamos que la media de las células inducidas a adipogénesis para los dos genes analizados con respecto al control es mucho mayor: *FABP4*, control $1,110 \pm 0,52$ /diferenciación $171,6 \pm 318,8$; *LPL*, control $4,356 \pm 6,330$ /diferenciación $134,7 \pm 110,6$ (figura 25 A y figura 25 B respectivamente). En ambos genes obtuvimos diferencias significativas, siendo el *p*-valor para el *FABP4* de 0,008 y para *LPL* de 0,008. Si observamos la expresión génica relativa de cada una de las muestras con respecto al control, observamos que todas las muestras analizadas alcanzan valores mayores que el control, destacando la muestra GR2 para ambos genes (figura 26).

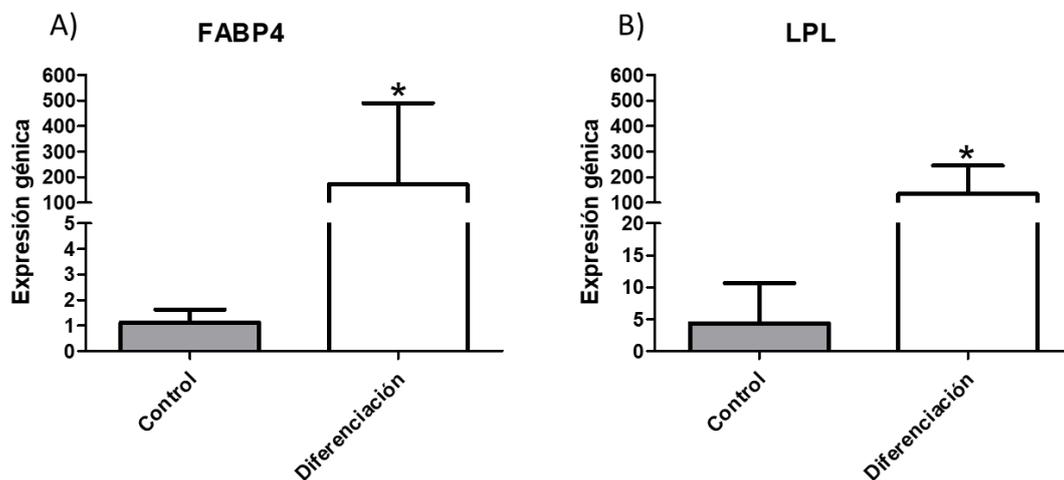


Figura 25. A) Representación de la media de expresión génica de las células diferenciadas del gen *FABP4* con respecto a la expresión génica obtenida con las células cultivadas en medio *DMEM* 20% SBF (células control); B) Representación de la media de expresión génica de las células diferenciadas del gen *LPL* con respecto a la expresión génica obtenida con las células cultivadas en medio *DMEM* 20% SBF. En las tablas se muestran los valores numéricos de la media de expresión génica obtenidos, tanto para los controles como para las diferenciaciones. * *p*-valor = 0,008

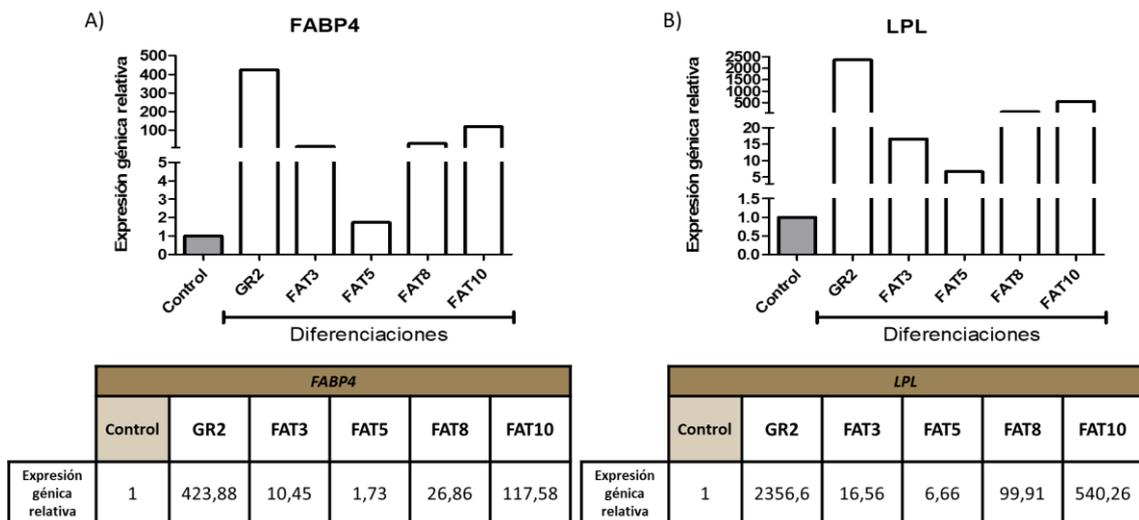


Figura 26. A) Representación de la expresión génica relativa del gen *FABP4* de cada una de las muestras con respecto al control; B) Representación de la expresión génica relativa de *LPL* de cada una de las muestras con respecto al control. En las tablas se muestran los valores numéricos de expresión relativa obtenidos para cada una de las muestras.

Estos resultados nos indican que las cinco muestras seleccionadas tenían capacidad de diferenciación hacia el linaje adipogénico.

2.2.2. Condrogénesis

Tinciones histológicas

A continuación, se muestran unas imágenes representativas de cada una de las tinciones realizadas a las cinco muestras utilizadas para la inyección intraarticular. Todas las imágenes se corresponden con una de las cinco muestras.

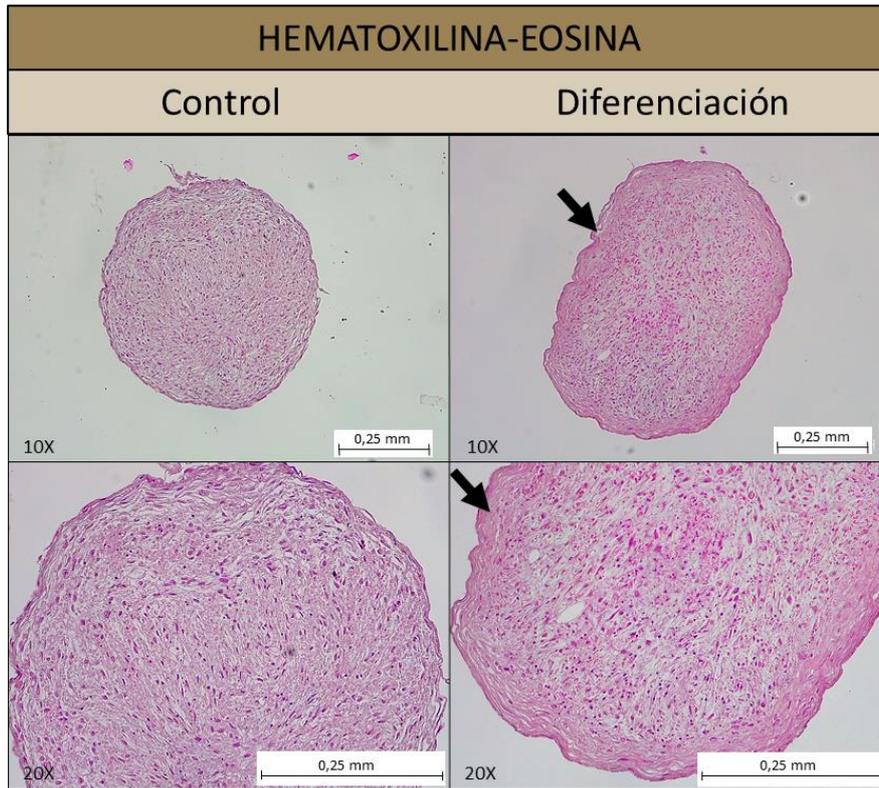


Figura 27. Tinción Hematoxilina-Eosina de la micromasa control y diferenciada. Las flechas indican la capa exterior de la micromasa con células con una morfología más aplanada que las células que se encuentran en el interior de la micromasa. Aumentos: imágenes superiores 10X, imágenes inferiores 20X.

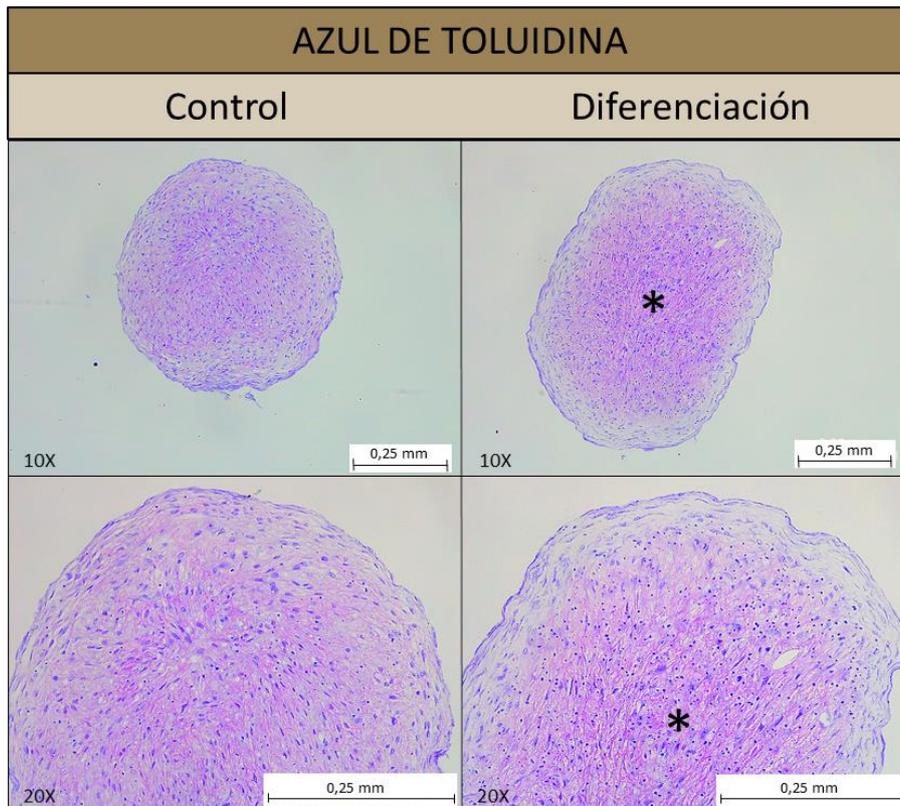


Figura 28. Tinción Azul de Toluidina de la micromasa control y diferenciada. * zonas donde se acumulan los proteoglicanos que los podemos observar de un color rojizo. Aumentos: imágenes superiores 10X, imágenes inferiores 20X.

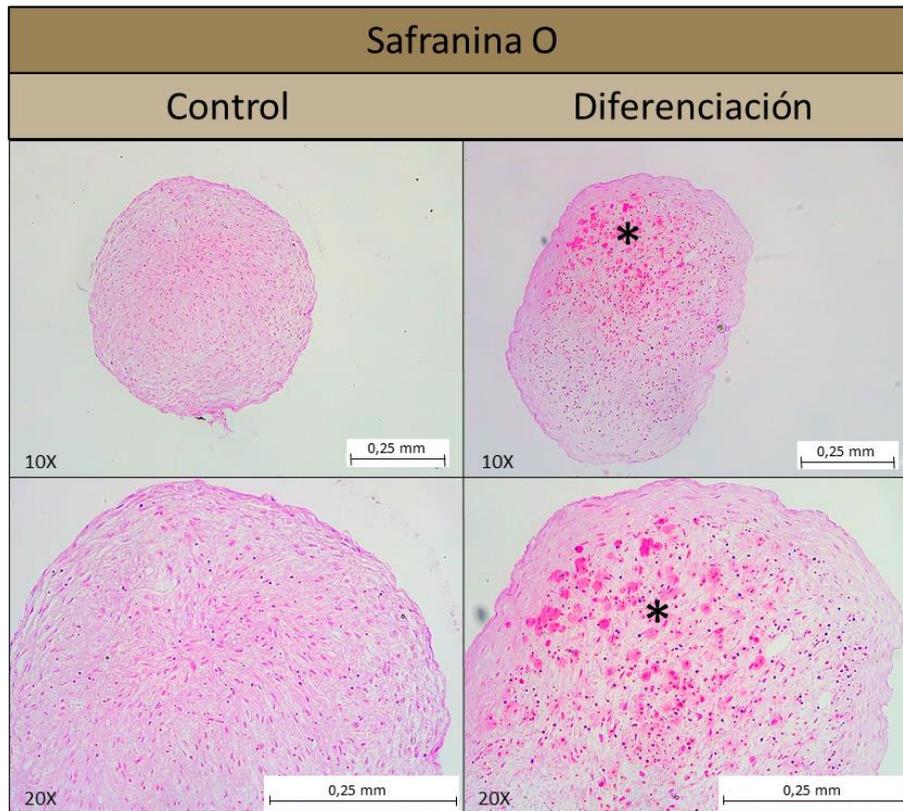


Figura 29. Tinción Safranina O de la micromasa control y diferenciada. * muestran las zonas donde se concentran los proteoglicanos teñidos de un color rojizo-anaranjado. Aumentos: imágenes superiores 10X, imágenes inferiores 20X.

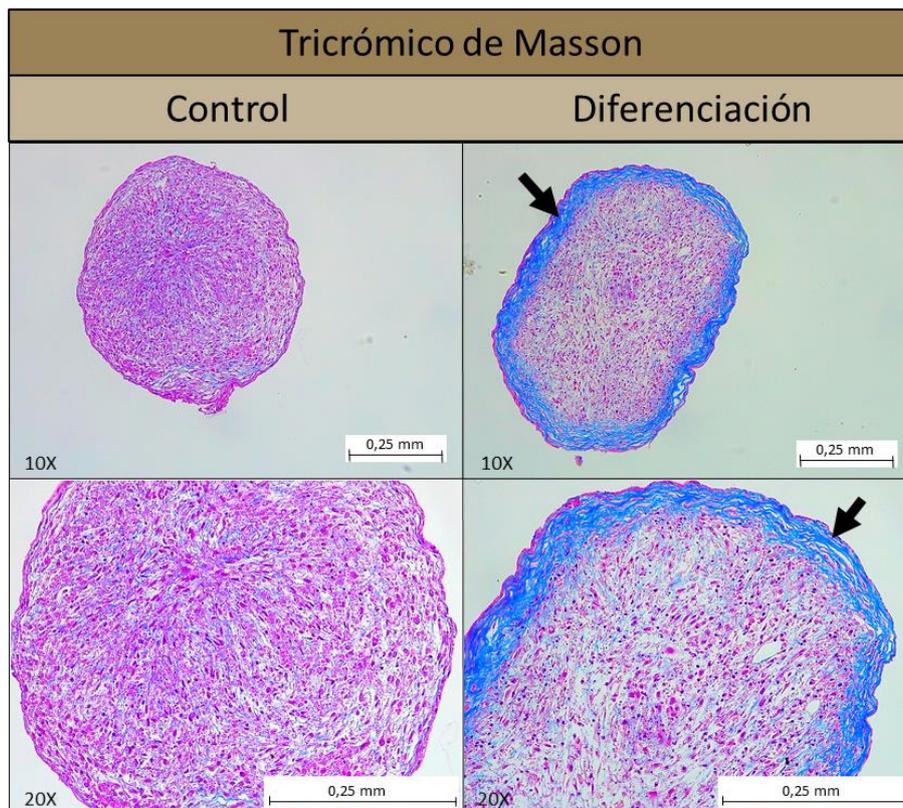


Figura 30. Tinción Tricrómico de Masson de la micromasas control y diferenciada. Las flechas indican la capa externa de la micromasa con una tinción azul muy intensa que nos indica la presencia de colágenos. Aumentos: imágenes superiores 10X, imágenes inferiores 20X.

Con la tinción de Hematoxilina-Eosina, podemos observar cómo cambia la morfología de la micromasa diferenciada, con respecto a la control. En la micromasa diferenciada se puede observar que las células que se encuentran hacia los bordes tienen una morfología más aplanada que las células que se encuentran en el interior (figura 27 flecha). Esto parece emular la disposición de las células dentro del cartílago hialino, en el cual, las células que se encuentran dispuestas en la capa más exterior del cartílago presentan una morfología más aplanada y en las siguientes aparecen los condrocitos con una forma más redondeada apreciándose las lagunas (ver "[Cartílago articular hialino](#)").

La tinción de Azul Toluidina nos evidencia la presencia de proteoglicanos, que se observan en un tono rojizo. En la micromasa diferenciada, éstos parecen concentrarse en la parte interior de la micromasa, mientras que, en la parte más externa, donde las células se encuentran con una forma más aplanada, no se evidencia su presencia (figura 28 *).

En cuanto a la tinción Safranina O nos indica, al igual que en el caso del Azul Toluidina, la presencia de proteoglicanos. En este caso se observa un tono rojizo-anaranjado también situado más en el centro de la micromasa que en la zona más superficial, coincidiendo con la tinción de Azul Alcían (figura 29 *).

Estas dos tinciones, Azul de Toluidina y Safranina O, nos evidenció la presencia de proteoglicanos en el interior de la micromasa. Esto podría compararse con la zona II del cartílago hialino, capa que abarca entre un 40% y un 60% del cartílago, en la que se encuentra la mayor concentración de proteoglicanos ("[Cartílago articular hialino](#)").

Por último, la tinción de Tricrómico de Masson nos muestra una tinción azul intensa en la parte externa de la micromasa, evidenciando la presencia de colágenos (figura 30 flecha). Esto podría coincidir con la *lamina splendens*, que es la capa más externa del cartílago hialino y que está compuesta únicamente de fibras de colágeno.

Expresión génica

En cuanto a la expresión génica de los genes seleccionados para determinar si existe diferenciación condrogénica, en uno de ellos, *ACAN*, se ha visto diferencia de expresión de las muestras diferenciadas relativas al control en tres de las cinco muestras analizadas: GR2 2,448; FAT3 12,028; FAT10 7,745 (figura 31). En cambio, *SOX9* no se ha expresado, y *COL2A* sólo se expresó en una de las muestras analizadas, FAT3, mostrando una expresión génica relativa de 3,13 con respecto a su control (datos no mostrados).

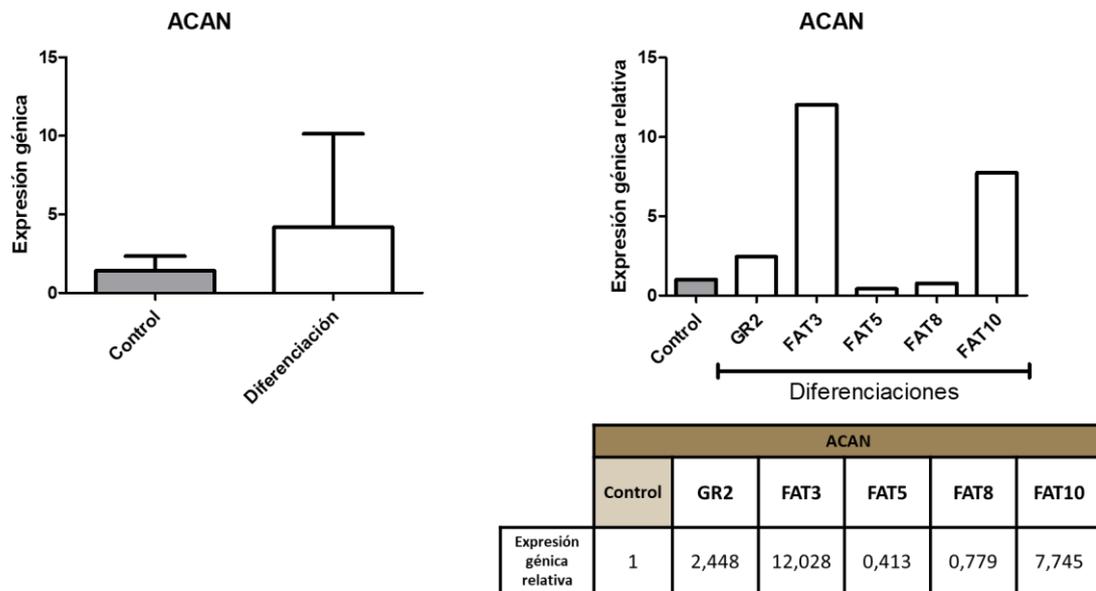


Figura 31. A) Representación gráfica de la media de expresión génica del gen *ACAN* de las células diferenciadas con respecto a la expresión génica obtenida con las células cultivadas en medio *DMEM* 20% SBF (células control); B) Representación gráfica de la expresión génica relativa de *ACAN* de cada una de las muestras con respecto al control. C) Datos numéricos de la media de la expresión génica de *ACAN* obtenida en los controles y diferenciaciones con sus desviaciones estándar; D) Datos numéricos de la expresión de *ACAN* para cada una de las muestras con respecto al control.

Observando estos datos, podemos decir que tres de nuestras muestras expresaron agregano cuando fueron sometidas a diferenciación condrogénica.

Al ser muestras de donantes distintos se aprecia variabilidad en los datos, pero parece que *FAT3* sería una de la muestra con mejores resultados en cuanto a la diferenciación condrogénica porque expresa más agregano y además colágeno II con respecto a su control.

2.2.3. Osteogénesis

Tras 7 días en cultivo, en el cultivo celular de las células de los cinco donantes seleccionados que se estimularon a diferenciación osteogénica se observó que cuatro de ellas cambiaban su morfología y perdían adherencia al plástico de cultivo llevándolas a la muerte (figura 32 B). Sólo en uno de los cultivos las células siguieron vivas y se pudo finalizar la diferenciación y realizar la tinción Rojo Alizarina (figura 32 A), en la que se observó la presencia de depósitos cálcicos extracelulares, típicos de los osteocitos, de un color rojo anaranjado intenso en aquellas células estimuladas con medio de diferenciación osteogénico.

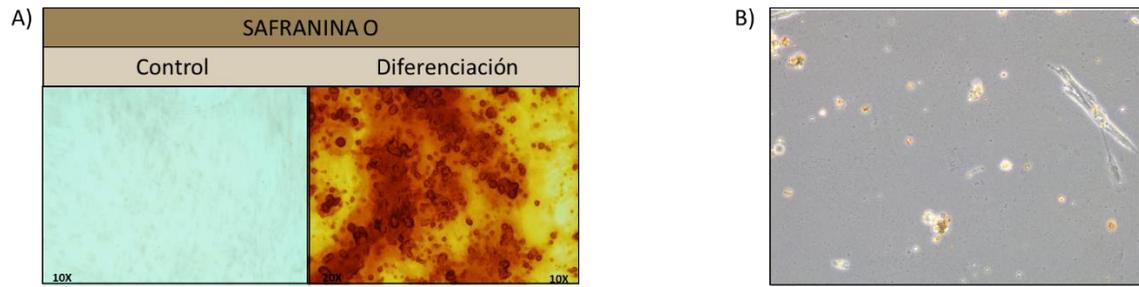


Figura 32. Imágenes de diferenciación osteogénica. A) Muestra que llegó a diferenciarse, a la izquierda el control sin estimular y a la derecha las células estimuladas para la diferenciación osteogénica; B) Células en cultivo muertas al utilizar el medio de diferenciación osteogénico (Aumentos: 20X).



Resultados

Evaluación clínica del tratamiento

1. Población perros GI

Una vez realizado el análisis de los criterios de inclusión/exclusión en todos los perros presentados ($n = 19$) para entrar a formar parte de este estudio, nos quedamos con una $n = 9$ perros. De estos 9 fueron 7 los que completaron todas las visitas repartidas a lo largo de 12 meses (figura 33).

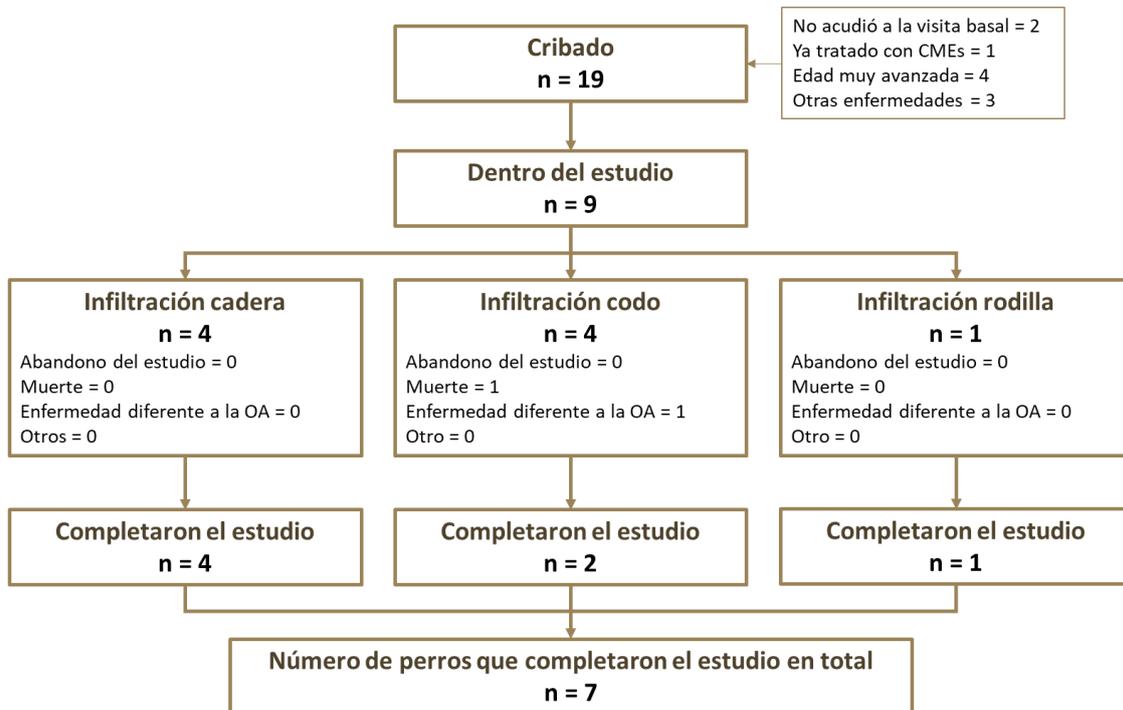


Figura 33. Flujo del número de perros a lo largo del estudio.

Los datos de raza, sexo, edad y peso de los 7 perros que completaron el estudio, además de la evaluación radiográfica de la articulación y el valor medio de EVA obtenido de los cuestionarios realizados a los dueños aparecen recogidos en la tabla 15.

El número de articulaciones evaluadas en este grupo fue igual a 11.

Tabla 19. Datos obtenidos en la visita basal (VB) tanto para el grupo de inyección intraarticular (GI), como para el grupo control tratado con Meloxicam (GC).

Datos generales en VB		GI (n = 7)	GC (n = 9)
Sexo, n (%)	Macho	1 (14,3)	6 (66,7)
	Hembra	6 (85,7)	3 (33,3)
Edad, años	Media (SD) Rango	6,21 ± 2,41 3 – 10,5	8,7 ± 1,41 7-11
Raza, n (%)	Mestizo	2 (28,6)	3 (33,3)
	Golden Retriever		2 (22,2)
	Bulldog Francés		1 (11,1)
	Chow-Chow		1 (11,1)
	Labrador		2 (22,2)
	Pastor Alemán	3 (42,9)	
	Pastor Belga Border Collie	1 (14,3) 1 (14,3)	
Peso, kg	Media (SD) Rango	31,25 ± 8,54 16 – 42,5	24,9 ± 7,37 12,8 – 32,7
Escala Bioarth, n articulaciones (% articulaciones)	Sin artrosis	0	0
	Artrosis leve	7 (46,7)	1 (9,09)
	Artrosis moderada	8 (53,3)	8 (72,7)
	Artrosis severa	0	2 (18,1)
EVA	Media (SD)	5,29 ± 2,06	6,11 ± 1,05

En la VB también recogimos los datos del GI de la evaluación veterinaria y los cedidos por los dueños (tablas 16 y 17), así como conseguimos datos del GC sobre la evaluación veterinaria (tabla 16), con el fin de poder comparar estos datos con los obtenidos a lo largo de las diversas visitas realizadas.

Tabla 20. Datos veterinarios de la visita basal (VB) para el grupo de inyección intraarticular tratado por nosotros (GI) y para el grupo control tratado con Meloxicam (GC).

Datos veterinarios en VB		GI (n = 11)	GC (n = 15)
FUNCIONALIDAD	Cambios en los apoyos n (%)	3 (27,3) normal 8 (72,7) desplaza carga	9 (60) desplaza carga 6 (40) solo apoya dedos
	Cambios de postura al levantarse n (%)	1 (9,1) correctamente 10 (90,9) modifica posición	10 (66,7) modifica posición 5 (33,3) dificultad levantarse
	Cojera en frío n (%)	1 (9,1) no cojea 6 (54,5) cojera leve 4 (36,4) cojera intensa	
	Cojera en caliente n (%)	1(9,1) no cojea 8 (72,7) cojera leve 2 (18,2) cojera intensa	12 (80) cojera leve 3 (20) cojera intensa
MOVILIDAD ARTICULAR	Movilización articular manual pasiva n (%)	3 (27,3) dolor leve 8 (72,7) dolor elevado	9 (60) dolor leve 5 (33,3) dolor elevado 1 (6,7) dolor inhabilitante
	Limitación flexión n (%)	9 (81,8) flexión total 1 (9,1) ligera limitación 1 (9,1) limitación severa	13 (86,7) ligera limitación 2 (13,3) limitación severa
	Limitación extensión n (%)	9 (81,8) ligera limitación 2 (18,2) limitación severa	5 (33,3) extensión total 10 (66,7) ligera limitación
ATROFIA MUSCULAR	Atrofia muscular n (%)	2 (18,2) sin atrofia 8 (72,7) atrofia leve 1 (9,1) atrofia severa	9 (60) sin atrofia 6 (40) atrofia leve

Tabla 21. Datos del grupo inyección intraarticular (GI) obtenidos a partir de la información cedida por los dueños.

Datos dueños en la VB	GI (n = 7)				
	Ninguno	Un poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
Grado dificultad para subir escaleras n (%)		3 (42,9)	1 (14,3)	3 (42,9)	
Grado dificultad para bajar escaleras n (%)	1 (14,3)	2 (28,6)	2 (28,6)		2 (28,6)
Grado dificultad para levantarse n (%)	1 (14,3)		5 (71,4)	1 (14,3)	
Grado dificultad para estar de pie n (%)	3 (42,9)	2 (28,6)	2 (28,6)		
Grado dificultad para estar sentado n (%)	2 (28,6)	4 (57,1)	1 (14,3)		
Grado dificultad para andar en terreno llano n (%)	2 (28,6)	3 (42,9)	2 (28,6)		
Resistencia a la carrera y juego n (%)	2 (28,6)	3 (42,9)	2 (28,6)		
Resistencia a dar saltos (40-50 cm) n (%)	3 (42,9)	3 (42,9)		1 (14,3)	

2. Seguridad del tratamiento con CMEs alogénicas

2.1. Seguridad local

A aquellos perros a los que se les han infiltrado las CMEs en las articulaciones (GI) que padecían OA se le realizó una evaluación de la inflamación presente una semana después de haber infiltrado con las células (V1_{GI}), palpando la zona (tabla 18 A). Además, también se recogieron signos vitales como la temperatura, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria, para observar si aparecían diferencias entre la VB_{GI} y la V1_{GI}, y si los animales presentaban fiebre en la V1_{GI}, uno de los signos que nos indicarían rechazo (tabla 18 B).

Tabla 18. Datos de seguridad de la administración de CMEs. A) Signos de inflamación para cada uno de los siete perros dentro del estudio; B) Signos vitales (temperatura, frecuencia cardíaca) de cada uno de los siete perros dentro del estudio en la VBGI (visita basal) y V1GI (visita 1 semana después de la infiltración).

A)		Pacientes	Hinchazón	Enrojecimiento	Dolor a la palpación	
		P03	No	No	No	
		P04	No	No	No	
		P05	No	No	No	
		P06	Leve	No	Leve	
		P07	No	No	No	
		P08	No	No	No	
B)		P09	No	No	Leve	

	P03		P04		P05		P06		P07		P08		P09	
	VB _{GI}	V1 _{GI}												
Temperatura (°C)		38,2	37,4	36,5	38,6	38	38,6	38,7		38,9	39	39,2	38,2	37,8
Frecuencia cardíaca (lat/min)	80	100	70	68	90	100	80	110		100	120	50	100	100
Frecuencia respiratoria (resp/min)	120	60	40	32	50	50	jadeo	50		jadeo	jadeo	jadeo	jadeo	50

Como se puede observar, solo uno de los siete perros mostraba una leve hinchazón y un dolor leve al ser manipulada la articulación tratada a los 7 días tras el tratamiento con las CMEs, lo cual nos indica que la inyección intraarticular de CMEs parece no producir una inflamación observable, más que la producida por el pinchazo dentro de la cápsula articular. Además, ningún perro presentó fiebre tras la infiltración de las CMEs.

2.2. Seguridad sistémica

Con los perros del GA hemos podido determinar los valores de la proteína C reactiva en sangre (siendo unos valores normales entre 0,1 y 6 mg/L). Para todos los perros tratados con células alogénicas éstas procedieron del mismo donante. Hemos observado que la proteína C reactiva aumentaba a valores anormales (PA02 12 mg/L; PA04 11 mg/L; PA06 6,3 mg/L; PA07 6,2 mg/L) en el caso de aquellos perros que antes de infiltrar intraarticularmente las CMEs tenían valores normales (PA02 5,3 mg/L; PA04 5,1 mg/L; PA06 4,1 mg/L; PA07 4,4 mg/L) (tabla 19). Por otro lado, aquellos perros que presentaban unos valores de proteína C reactiva por encima de los normales (PA01 14 mg/L; PA03 13 mg/L; PA08 72 mg/L), les bajó una semana después, incluso en dos de los casos llegando a establecerse en valores normales (PA01 5,1 mg/L; PA03 5,2 mg/L; PA08 13 mg/L) (tabla 19).

Tabla 229. Datos de la proteína C reactiva antes y 1 semana después de la inyección intraarticular de CMEs en perros que padecían OA. AUT: CMEs autólogas; ALO: CMEs alogénicas.

Perro	AUT/ALO	Proteína C reactiva antes infiltración	Proteína C reactiva 1 semana después
PA01	AUT	14 mg/L	5,1 mg/L
PA02	ALO	5,3 mg/L	12 mg/L
PA03	ALO	13 mg/L	5,2 mg/L
PA04	ALO	5,1 mg/L	11 mg/L
PA05	ALO	3 mg/L	12 mg/L
PA06	ALO	4,1 mg/L	6,3 mg/L
PA07	AUT	4,4 mg/L	6,2 mg/L
PA08	ALO	72 mg/L	13 mg/L

Como se puede observar, ocurre lo mismo tanto en los perros tratados con CMEs autólogas (n = 2) como en aquellos tratados con las CMEs alogénicas (n = 6) (tabla 19).

2.3. Seguridad general

De los 9 perros que entraron a formar parte del estudio 2 de ellos salieron tras haber sido tratados con las CMEs.

Uno de esos dos perros que salió del estudio falleció a causa de varios tumores en las mamas, de los cuales ya había sido operado anteriormente, y uno metastásico en el pulmón (en los informes veterinarios previos a ser incluido en el estudio no se había indicado el que había sido operada de tumores con anterioridad).

El otro perro sólo realizó las visitas correspondientes a los tres primeros meses tras la inyección intraarticular debido a que se le detectó una insuficiencia renal crónica (IRC) (figura 33).

3. Evaluación de las articulaciones tratadas con CMEs

3.1. Evaluación radiológica

La mayoría de las articulaciones tratadas se encuadraban dentro de una OA moderada según la escala *Bioarth*. Tras la aplicación de las CMEs, solamente una de ellas pasó de OA moderada a OA leve (figura 34 y tabla 20).

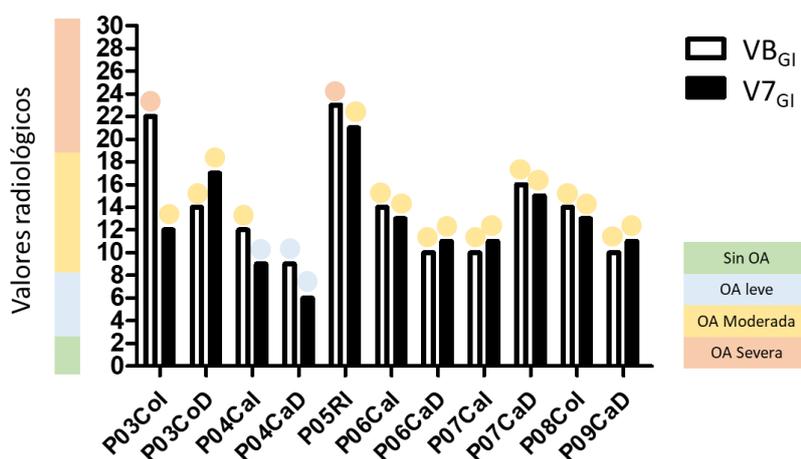


Figura 34. Datos de los análisis de las radiografías antes de la infiltración intraarticular con CMEs (VB_{GI}) y un año después (V7_{GI}). Se muestran los datos para cada una de las articulaciones tratadas. P: perro; Col: codo izquierdo; CoD: codo derecho; Cal: cadera izquierda; CaD: cadera derecha; RI: rodilla izquierda.

Tabla 20. Número y porcentaje de articulaciones distribuidas según el nivel de OA que presentaban, según la *Escala Bioarth*, antes del tratamiento con CMEs (VB) y un año después del tratamiento (V7).

Escala Bioarth	VB n (%)	V7 n (%)
Sin artrosis	0	0
Artrosis leve	1 (9,1)	2 (18,2)
Artrosis moderada	8 (72,7)	8 (72,7)
Artrosis severa	2 (18,2)	1 (9,1)

En general, todas las articulaciones se mantuvieron a lo largo del año de estudio a excepción de un codo derecho (P03), una cadera derecha (P06) y una cadera izquierda (P07), los cuales empeoraron un poco su puntuación pero que continúan siendo valoradas como una OA moderada (figura 34; ANEXO “Radiografías”).

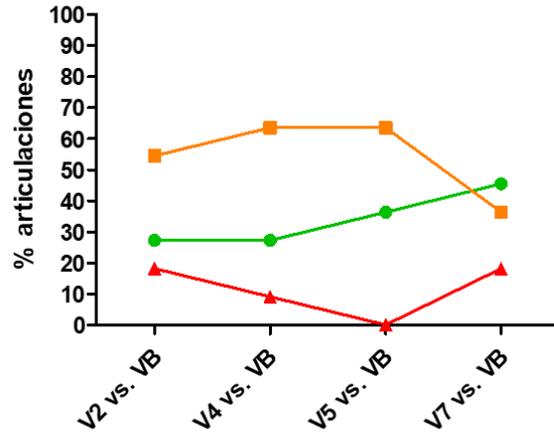
3.2. Evaluación de la evolución de los parámetros veterinarios

El análisis descriptivo de cada uno de los parámetros evaluados (funcionalidad articular, movilidad articular y atrofia muscular) nos mostraron si las articulaciones de los perros tratados mejoraron, se mantuvieron o empeoraron en cada una de las visitas realizadas a lo largo del año de estudio.

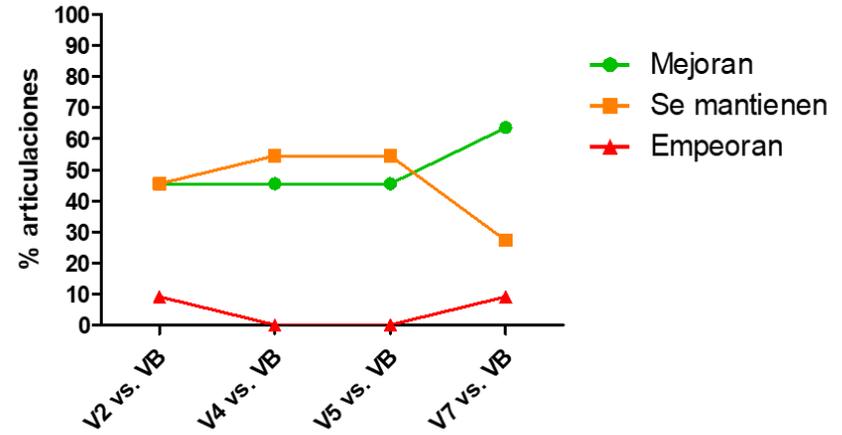
Como se puede observar en los gráficos (figura 35), la mayoría de las articulaciones para todas las variables estudiadas a lo largo de las visitas en comparación con la VB_{GI} mejoraron o se mantuvieron estables, mientras que el porcentaje de aquellas que empeoraron fue menor.

FUNCIONALIDAD

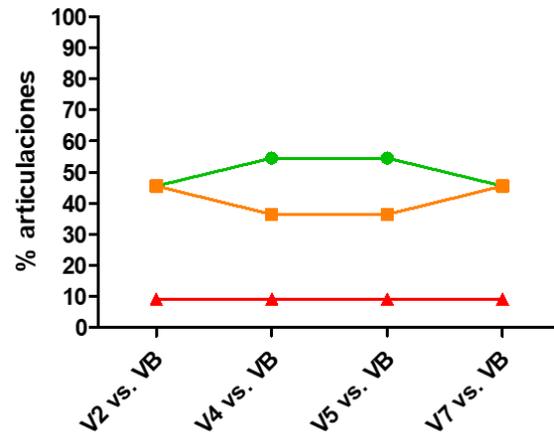
Cambios de apoyos en la estación GI



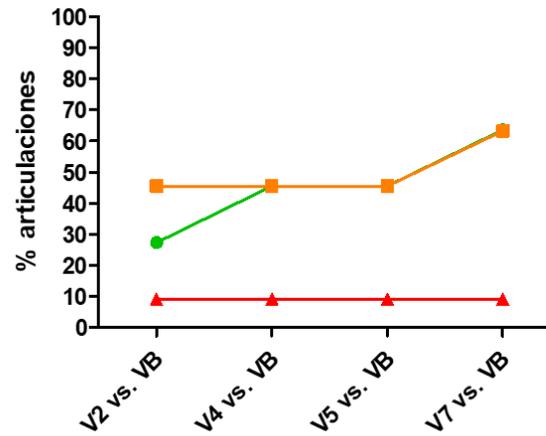
Cambios de postura al levantarse GI



Cojera en frío GI

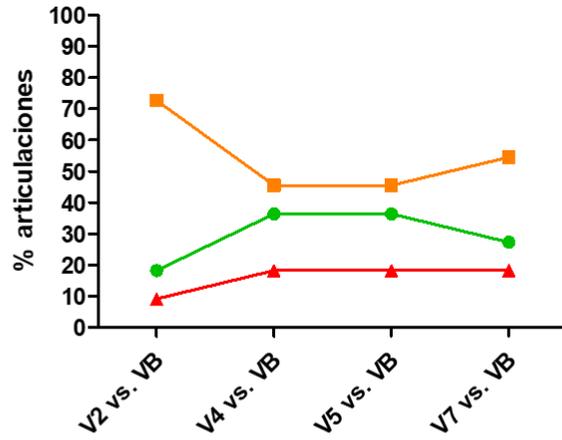


Cojera en caliente GI

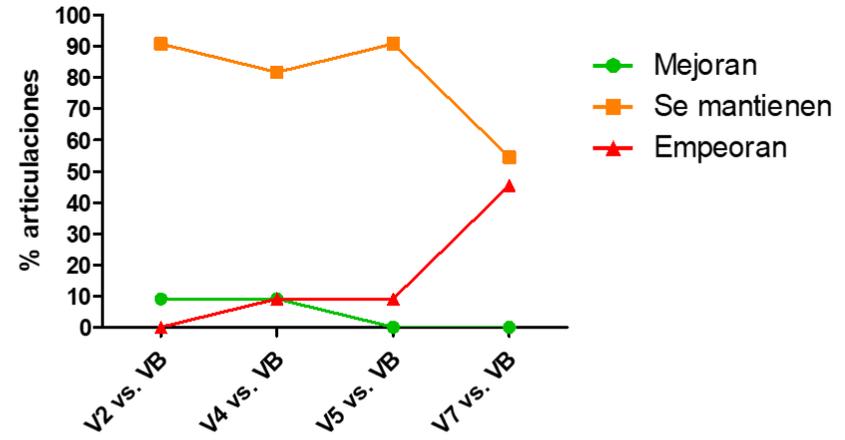


MOVILIDAD ARTICULAR

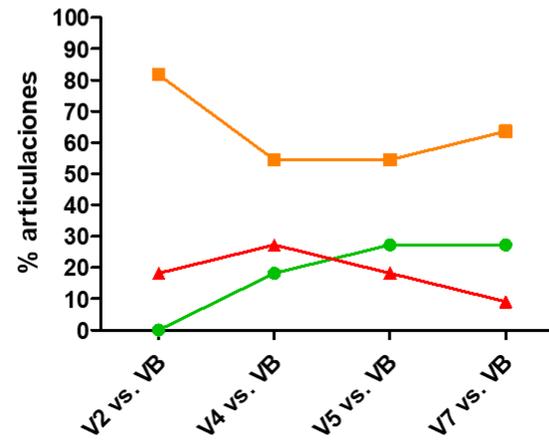
Movilidad articular manual pasiva GI



Limitación movimiento de flexión GI



Limitación movimiento de extensión GI



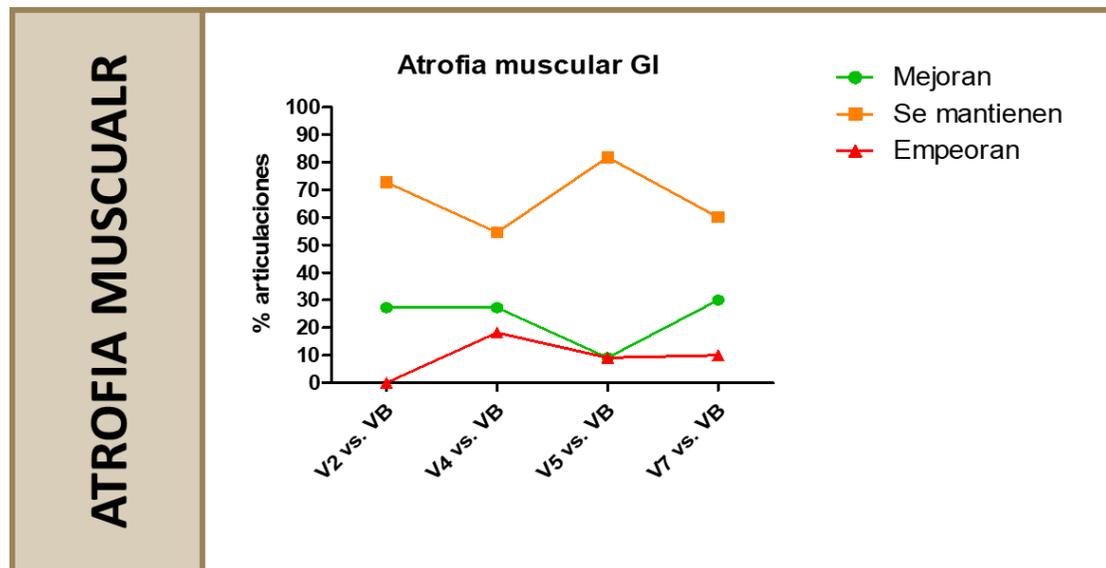


Figura 35. Gráficos en los que se puede apreciar la comparación del porcentaje de articulaciones que mejoran, se mantienen o empeoran entre la visita basal (VB_{GI}) y el resto de visitas (visita 1 mes después de la inyección de CMEs (V2_{GI}); visita 3 meses después de la inyección de CMEs (V4_{GI}); visita 6 meses después de la inyección de CMEs (V5_{GI}); visita 12 meses después de la inyección de CMEs (V7_{GI})) para cada una de los parámetros estudiados (funcionalidad articular, movilidad articular y atrofia muscular).

Se puede observar también que son las variables relacionadas con la funcionalidad articular (cambios de los apoyos en la estación, cambios de postura al levantarse, cojera en frío y cojera en caliente) las que presentan un mayor porcentaje de articulaciones que mejoran con respecto al parámetro de movilidad articular y atrofia muscular (figura 35; ANEXO “Tablas – Tabla 40”). Un ejemplo de esto es en la V5_{GI} (seis meses después del tratamiento) frente a la VB_{GI}, los porcentajes de mejora para cada una de las variables nombradas anteriormente son 36,4%, 45,5%, 54,5% y 45,5% respectivamente (ANEXO “Tablas – Tabla 40”). Para aquellas variables relacionadas con la movilidad articular (movilidad articular manual pasiva, limitación movimiento de flexión y limitación movimiento de extensión) los porcentajes son menores (36,4%, 0% y 27,3% respectivamente) (ANEXO “Tablas – Tabla 40”). Esto nos indica que las CMEs parecen estar teniendo un efecto sobre el dolor que sienten esos animales en la articulación, es decir, las CMEs pueden estar teniendo un efecto inmunomodulador, pues las articulaciones se vuelven más funcionales, observándose un incremento en el porcentaje de articulaciones que mejoran a lo largo de las visitas.

3.3. Evaluación de la evolución de las variables observadas por los dueños

El dolor de los perros fue analizado gracias a que los dueños marcaron en una escala EVA cuál era la cantidad de dolor que pensaban que sufría su mascota. Como se puede observar en la tabla, el dolor disminuyó a lo largo de las visitas a pesar de que las diferencias no sean significativas (tabla 21). Concretamente la media de las puntuaciones de la EVA para todos los perros en la VB_{GI} fue igual a $5,29 \pm 2,06$, mientras que ya en la V2_{GI} bajó hasta situarse en $4,43 \pm 2,57$, a los seis meses bajó a $4,29 \pm 2,75$ y al año después del tratamiento se volvió a situar en $4,43 \pm 2,28$. Esto nos indica, que los dueños no detectaron los signos de dolor que detectaban antes de que los perros recibieran el tratamiento con las CMEs, por lo que, al igual que en el caso de las variables veterinarias, parece que estas células están ejerciendo un efecto inmunomodulador en las articulaciones tratadas.

Tabla 21. Puntuación media de la EVA en la VB_{GI} (antes de recibir el tratamiento con CMEs), la V2_{GI} (1 mes después de recibir el tratamiento con CMEs), V5_{GI} (6 meses después de recibir el tratamiento con CMEs) y V7_{GI} (1 año después de recibir el tratamiento con CMEs). * Prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

	VB _{GI}	V2 _{GI}	V5 _{GI}	V7 _{GI}
Puntuación EVA (media ± dt)	5,29 ± 2,06	4,43 ± 2,57	4,29 ± 2,75	4,43 ± 2,28
p-valor (vs. visita basal)*		0,131	0,141	0,173

Para observar los cambios de comportamiento de los perros, seleccionamos las preguntas del cuestionario que cubrieron los dueños en cada visita que más información nos podrían aportar,

y observamos cual era el porcentaje de perros que mejoraban, se mantenían o empeoraban en cada una de ellas con respecto a la VB_{GI} (figura 36; ANEXO “Tablas – Tabla 43, 44 y 45”). Los ítems seleccionados fueron: subir escaleras, bajar escaleras, levantarse, estar de pie, estar sentado, andar por terreno llano, resistencia a correr y jugar, saltos de unos 40-50 cm.

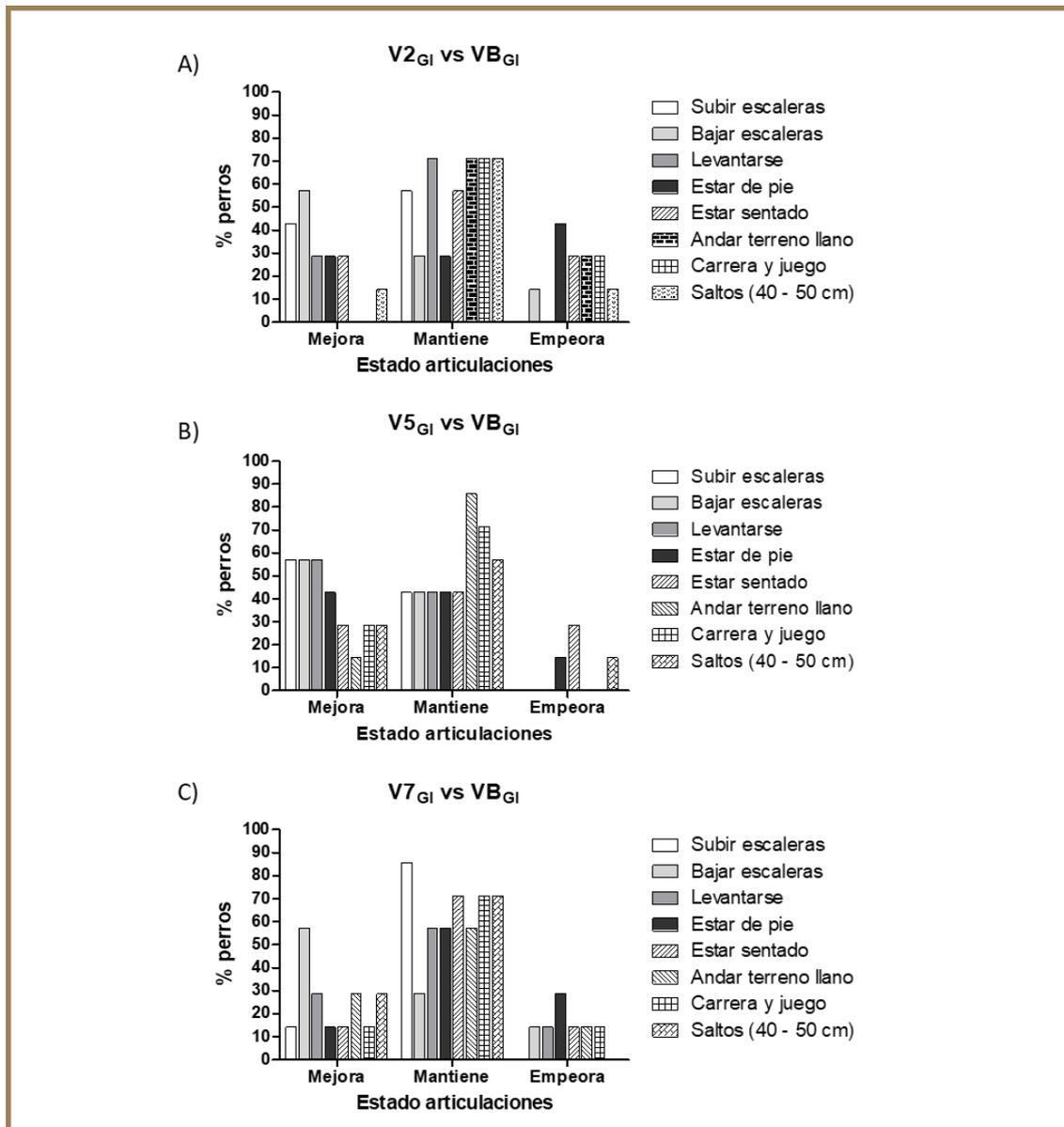


Figura 36. Gráficos en los que se muestran los porcentajes de perros que mejoraron, se mantuvieron o empeoraron en algunas de las variables de las que obtuvimos información por parte de los dueños, evaluando así los cambios de comportamiento de los perros tratados en sus hogares. A) Gráfica en la que se muestra el porcentaje de perros que mejoran, se mantienen o empeoran en la visita de 1 mes después de la inyección intraarticular (V2_{GI}) frente a la visita basal (VB_{GI}); B) Gráfica en la que se muestra el porcentaje de perros que mejoran, se mantienen o empeoran en la visita de 6 meses después de la inyección intraarticular (V2_{GI}) frente a la visita basal (VB_{GI}); C) Gráfica en la que se muestra el porcentaje de perros que mejoran, se mantienen o empeoran en la visita de 12 meses después de la inyección intraarticular (V7_{GI}) frente a la visita basal (VB_{GI}).

Como se puede observar, en todas las visitas el porcentaje de perros se mantienen en su comportamiento de antes de infiltrar las CMEs. Pero se puede observar también que existe un aumento en el porcentaje de perros que mejoran su comportamiento en la V5_{GI} en todos los

ítems seleccionados con respecto a las demás visitas. Esto concuerda con que el valor de la media de la EVA de todos los perros también es menor en la V5_{GI}. Teniendo en cuenta estos resultados obtenidos de las observaciones de los dueños, podríamos indicar que, posiblemente, para una mejora aun mayor de estos perros, sería necesario inyectar una segunda dosis de estas células a los 6 meses, que es cuando se da el mayor porcentaje de perros que mejoran en prácticamente todas las variables con respecto a la VB_{GI}.

4. Comparativa de GI vs. GC

4.1. Articulaciones tratadas

Como se puede observar en la tabla 22, el porcentaje de articulaciones de cadera y codo es similar entre los dos grupos. La única diferencia es que en el GI tratamos una rodilla, mientras que en el GC ninguna. Además, también se puede observar que el mayor número de articulaciones tratadas pertenecen a caderas (63,7% en GI y 73,3% en GC) (tabla 22).

Tabla 22. Porcentaje de articulaciones, clasificadas por articulación, en cada uno de los dos grupos, grupo de inyección intraarticular de CMEs (GI) y grupo control (GC).

Articulaciones	% articulaciones GI	% articulaciones GC
Codo derecho	9,1	13,3
Codo izquierdo	18,2	13,3
Cadera derecha	36,4	40
Cadera izquierda	27,3	33,3
Rodilla izquierda	9,1	0

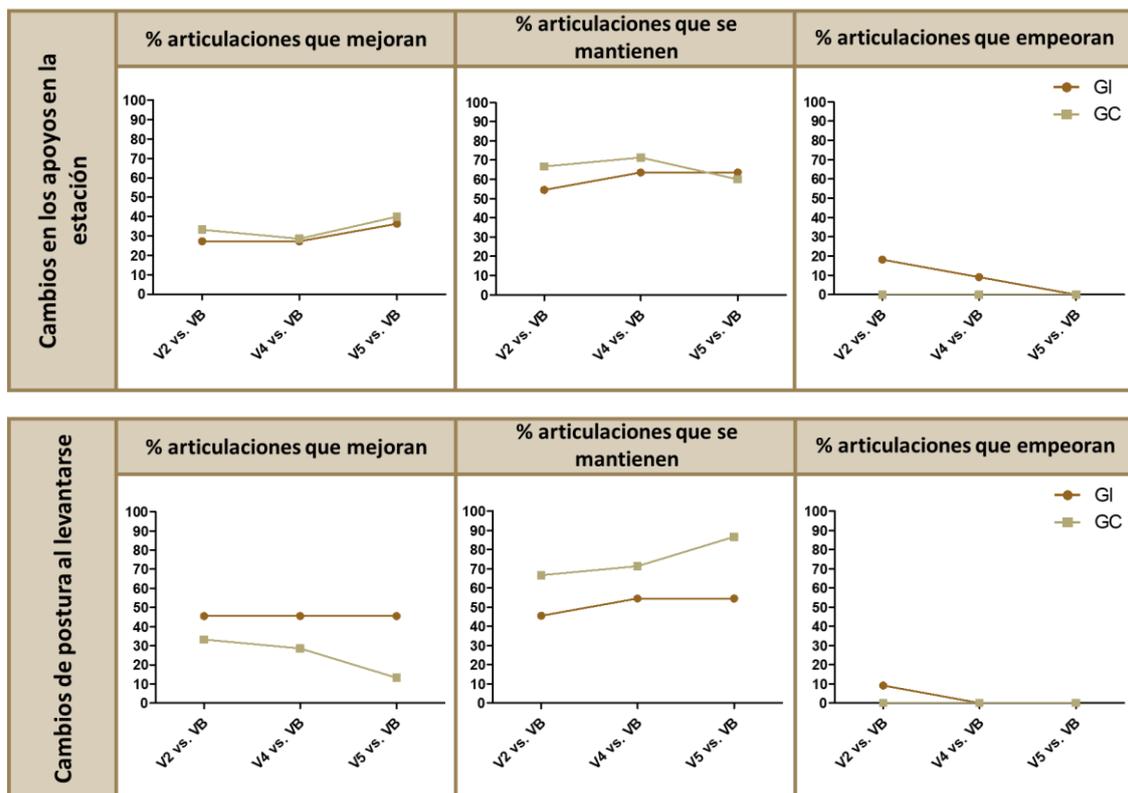
4.2. Valoración veterinaria

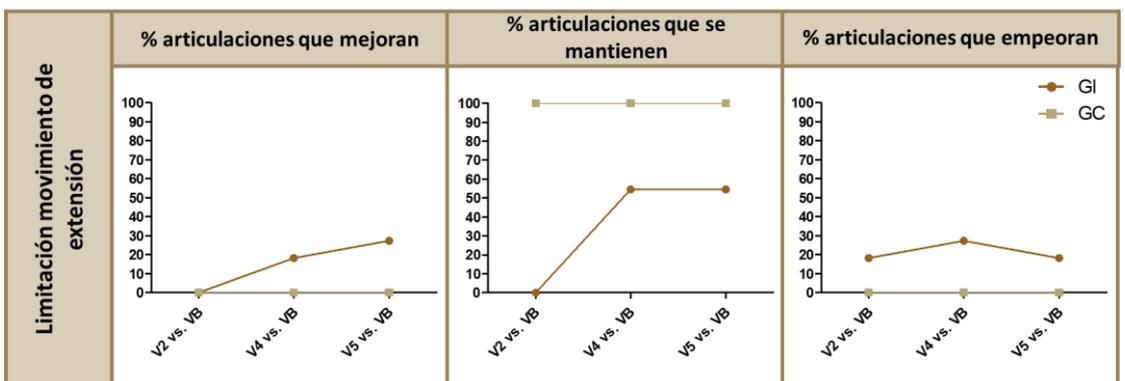
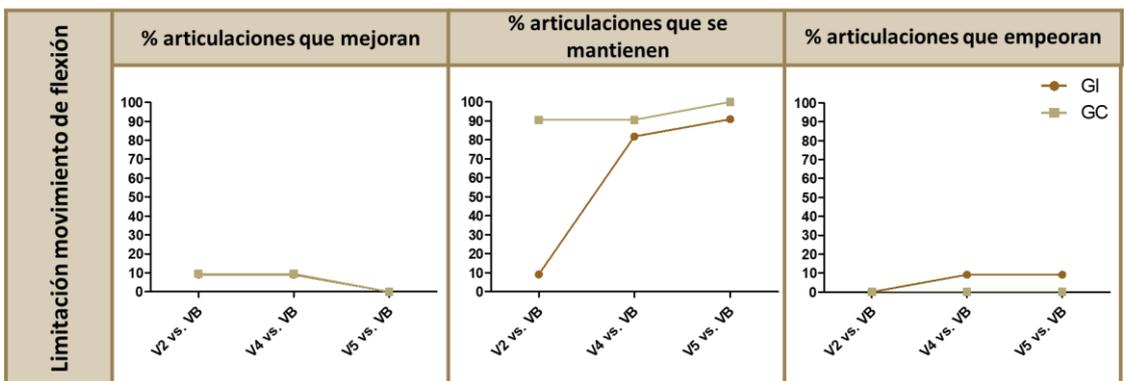
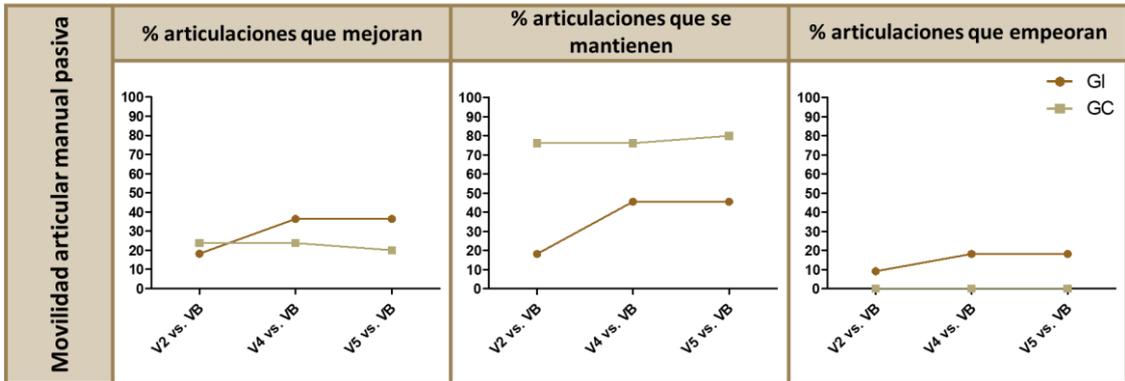
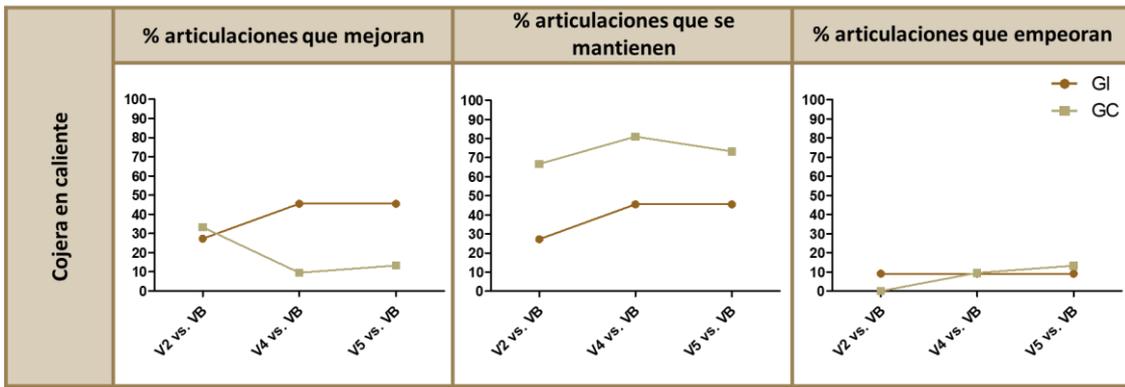
Los datos obtenidos muestran que hay un mayor número de articulaciones tratadas con CMEs (GI) que mejoran con respecto a aquellas de los perros tratados con meloxicam (GC). Esta mejora se observa sobre todo en las variables “cambio de postura al levantarse” y “cojera en caliente” respectivamente, pertenecientes al parámetro funcionalidad articular, en las que para el GC los porcentajes de mejora en la V4 (tres meses después del tratamiento) con respecto a la VB son de 28,6 % en la “cambio de postura al levantarse” y 9,5 en la “cojera en caliente”, mientras que, en el caso de GI, el porcentaje de mejora en este caso es en “cambios de postura al levantarse” del 45,5% al igual que para la “cojera en caliente” del 27,3% (figura 37; ANEXO “Tablas – Tabla 46”). Y esto continúa ocurriendo en la comparación de VB frente a V5 (seis meses después del tratamiento), los valores para el GC de esas variables se mantienen en 13,3% y en el caso del GI se mantiene en un 45,5% (figura 37; ANEXO “Tablas – Tabla 46”).

Los porcentajes de articulaciones que se mantienen son muy elevados con ambos tratamientos, sobre todo en los perros del grupo GC, observándose variables en las que el 100% de las articulaciones no mostraron cambios con respecto a la VB, como por ejemplo en las variables “limitación movimiento de flexión” y “atrofia muscular”, relacionadas con la movilidad articular, mientras que en el grupo GI, aunque también es un porcentaje elevado, en ningún caso llega al 100% de las articulaciones (figura 37; ANEXO “Tablas – Tabla 47”).

Por último, el porcentaje de articulaciones que empeoran, es mucho menor que el de las que mejoran o se mantienen en el caso de ambos tratamientos. La gran mayoría de las variables para los perros tratados con Meloxicam nos muestran que los perros no empeoran, exceptuando la variable “cojera en caliente” en la que en la VB frente a la V4 hay un 9,5% de articulaciones que empeoran y en la VB frente a la V5, un 13,3% (figura 37; ANEXO “Tablas – Tabla 48”). En el caso del GI sí existe un porcentaje de articulaciones que empeoran, sobre todo en la V2 frente a la VB en aquellas variables relacionadas con la funcionalidad, o en la V5 frente a la VB, en las variables relacionadas con la movilidad articular (figura 37; ANEXO “Tablas – Tabla 48”).

Estos resultados nos indican que las CMEs podrían tener un efecto similar o incluso mejor que el AINE Meloxicam para tratar el dolor que sufren los perros que padecen OA. Además, esta mejoría se observa con una sola dosis de CMEs, mientras que el AINE Meloxicam se administra durante 15 días seguidos y, además, en algunos casos, fue necesario repetir la dosis dos e incluso tres veces.





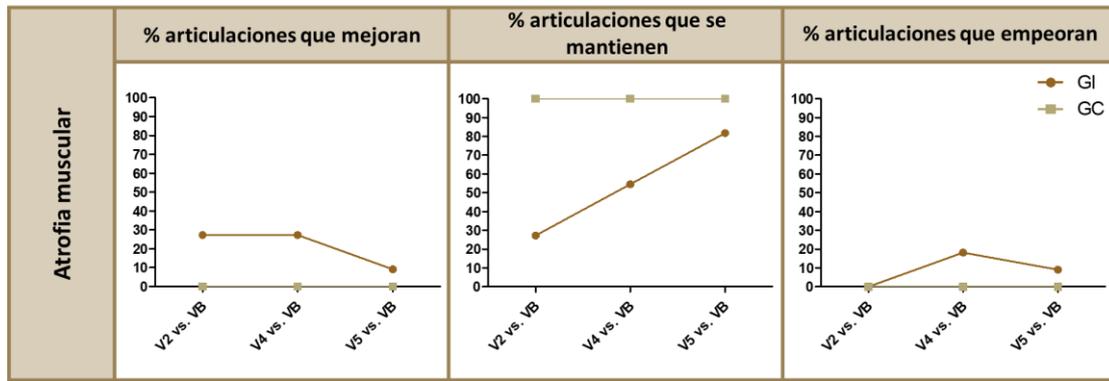


Figura 37. Gráficos que muestran la comparación entre el grupo de perros que hemos tratado con CMEs (GI) y el grupo de perros tratados con Meloxicam (GC) para cada una de las variables evaluadas por el veterinario. Se muestra por separado el porcentaje de articulaciones que mejoran, que se mantienen y que empeoran.

4.3. Valoración EVA por parte de los dueños

Al igual que en el caso del GI, el dolor de los perros del grupo GC fue analizado gracias a que los dueños marcaron en una escala EVA cuál era la cantidad de dolor que pensaban que sufría su mascota. Como se puede observar en la tabla 23, y de forma similar a lo que ocurrió en el GI, el dolor disminuyó a lo largo de las visitas a pesar de que las diferencias no sean significativas (tabla 23). Concretamente la media de las puntuaciones de la EVA para todos los perros en la VB_{GC} fue igual a $6,11 \pm 1,05$, mientras que ya en la V2_{GC} bajó hasta situarse en $5,44 \pm 1,23$. A los tres meses aumentó un poco con respecto al mes, pasando a tener un valor igual a $5,56 \pm 1,13$ y seis meses después del tratamiento siguió situándose en el mismo valor que después de tres meses con un valor de $5,56 \pm 1,13$. Al tratarse de un AINE era de esperar que los dueños no detectaran los mismos signos de dolor que detectaban antes del tratamiento, y estos datos nos lo cercioran.

Tabla 23. Puntuación media de la EVA en la VB_{GC} (antes de recibir el tratamiento con Meloxicam), la V2_{GC} (1 mes después de recibir el tratamiento), V4_{GC} (3 meses después de recibir el tratamiento) y V5_{GC} (6 meses después de recibir el tratamiento). * Prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

	VB _{GC}	V2 _{GC}	V4 _{GC}	V5 _{GC}
Puntuación EVA (media ± dt)	6,11 ± 1,05	5,44 ± 1,23	5,56 ± 1,13	5,56 ± 1,13
p-valor (vs. visita basal)*		0,084	0,102	0,102

Comparando los datos del EVA del GI con los del GC, observamos que no existen diferencias significativas entre la disminución de la EVA en relación a la VB para cada una de las visitas entre el grupo GC y el GI, puesto que el test de Mann-Whitney nos muestra unos p-valores mayores a 0.05 (tabla 24). A pesar de que no existan diferencias significativas, se puede apreciar que la disminución del EVA en cada una de las visitas con respecto a la VB, es mayor en el caso del GI, pero en ambos casos los dueños notaron mejoría en sus perros.

Tabla 24. Valores de disminución en cada una de las visitas con respecto a la VB de cada uno de los dos grupos y las diferencias entre los dos grupos. *Prueba de Mann-Whitney.

	V2 _{GC}	V2 _{GI}	V4 _{GC}	V4 _{GI}	V5 _{GC}	V5 _{GI}
Disminución (media ± dt)	0,467 ± 0,91	0,909 ± 1,37	0,4 ± 0,737	0,818 ± 1,146	0,4 ± 0,737	0,909 ± 1,513
p-valor*	0,403		0,192		0,561	

En conjunto, comparando los datos veterinarios con los datos de las valoraciones realizadas por los dueños, podemos decir que el AINE Meloxicam y el tratamiento con CMEs es similar en cuanto a que mejoran la funcionalidad y dolor de las articulaciones de los perros que presentan OA.



Discusión

Obtención y caracterización de las
células

Esta tesis se ha centrado en evaluar si la aplicación intraarticular de CMEs de origen heterólogo en las articulaciones de perros que padecían de OA, tenía un efecto beneficioso en estos animales, además de determinar la seguridad del procedimiento.

1. Obtención y caracterización de las células extraídas de tejido adiposo

En la literatura existe poca información acerca de las CMEs de perro y la información que se encuentra no tiene mucha similitud entre artículos. Por ello, una gran parte del estudio estuvo centrada en buscar los mejores parámetros para poder determinar que las células que habíamos obtenido de las muestras de tejido adiposo tenían características similares a las establecidas para las CMEs de humanos por la ISCT (Domenici *et al.*, 2006).

1.1. Obtención de células

En la revisión bibliográfica previa a la experimentación llevada a cabo en esta tesis doctoral, observamos una gran controversia en cuanto a los protocolos de aislamiento de CMEs derivadas de tejido adiposo.

En el año 2007, en uno de los primeros estudios sobre este tema, Black y colaboradores indicaron, como su método de obtención de estas células, la realización de una digestión química con una mezcla de colagenasa (sin indicar qué tipo) y hialuronidasa durante 50 minutos y a una temperatura de 37°C (Black *et al.*, 2007). En cambio, tres años después, en el año 2010, Vieira y colaboradores expresaron que su método de obtención de las células a partir de tejido adiposo constaba de una digestión química con colagenasa (una vez más sin indicar de qué tipo) durante solamente 15 minutos (Vieira *et al.*, 2010). Y esto son solo dos ejemplos, pero nos encontramos con protocolos en los que indican que digieren el tejido adiposo *overnight* o durante 3-4 horas a 37 °C con colagenasa tipo IA (Neupane *et al.*, 2008; Guercio *et al.*, 2013), o utilizan colágenasa tipo II al 0,1% durante 90 minutos (Villatoro *et al.*, 2015) o, acercándonos más a la actualidad, digiriendo el tejido adiposo con colagenasa tipo I a 37°C durante 45 minutos o 1 hora, pero sin indicar cuál es la concentración a la que utilizan la enzima (Teshima *et al.*, 2017; Zhan *et al.*, 2019).

El protocolo que hemos puesto en práctica en esta tesis es el que se lleva aplicando en la empresa Integral Vetter S.L. desde el año 2015, donde se realizaron diferentes estudios sobre las células aisladas basándose en diferentes estudios (REFERENCIA). En concreto, como ya se ha comentado en el apartado de material y métodos, se utilizó la colagenasa tipo I (*Sigma-Aldrich*) en una concentración de 0,4 mg/mL, dejándola actuar durante 30 minutos a 37°C y a 200 U/min de agitación. Utilizamos la colagenasa tipo I porque está indicada para la digestión de tejidos como pulmón, tejido adiposo o tejido adrenal, mientras que la colagenasa tipo II está indicada para tejidos como el riñón, hueso, tiroides, corazón o glándulas salivares, y la colagenasa IV está

recomendada para el aislamiento de los islotes de Langerhans (<https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>).

Con el protocolo que se ha llevado a cabo en esta tesis se obtuvieron células con una morfología similar a la de los fibroblastos, al igual que se observa en otros estudios que nos muestran imágenes de cultivo de sus células (Neupane *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2010; Guercio *et al.*, 2013; Villatoro *et al.*, 2015; Zhan *et al.*, 2019), siendo esta una de las premisas de la *ISCT*, con una buena tasa de crecimiento (del S0 a S1 una media de $6 \pm 1,87$ días y de S1 a S2 una media de $5,25 \pm 0.83$ días) y con un corto tiempo de digestión.

La existencia de un protocolo común para el aislamiento de estas células habría hecho más sencillas el poder comparar nuestros resultados con los de los demás estudios publicados en relación a estas células.

1.2. Marcadores de superficie

Una de las condiciones para que unas células sean reconocidas como CMEs que establece la *ISCT* en humanos, además de la morfología fibroblástica y la adherencia al plástico de cultivo, es la presencia de los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 y la ausencia de los marcadores de superficie CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR (Dominici *et al.*, 2006). Puesto que no existe ningún panel de marcadores de superficie establecido para la especie canina, nos hemos centrado en estos marcadores de superficie indicados para la caracterización de las células mesenquimales humanas, incluyendo al panel alguno más.

Para llevar a cabo el análisis de estos marcadores a través de citometría de flujo se realizó una búsqueda bibliográfica en la que se utilizaban anticuerpos específicos para la especie canina (Ivanovska *et al.*, 2017; Teshima *et al.*, 2017). A partir de lo que indicaban en los diferentes estudios y lo que indicaban las casas comerciales, se fueron titulando los anticuerpos para así poder proceder a la caracterización de los marcadores de superficie de las células que fuimos aislando a lo largo del trabajo.

Los datos que obtuvimos para los marcadores de superficie del CD29, CD34, CD44, CD45 y CD90, son similares a los que nos podemos encontrar en la bibliografía (Takemitsu *et al.*, 2012; Ivanovska *et al.*, 2017; Kriston-Pál *et al.*, 2017; Teshima *et al.*, 2017) con pocas variaciones (tabla 23).

En el caso del marcador CD73, los datos que se obtienen tanto en la bibliografía como en nuestro propio estudio tienen una gran variabilidad. El dato que obtuvimos nosotros fue de $29,1 \pm 19,97$. En el caso de Ivanovska y colaboradores obtuvieron un resultado de $14 \pm 12,3$ (Ivanovska *et al.*, 2017) y en el estudio realizado por Russell y colaboradores, el resultado que obtuvieron fue de $63,2 \pm 5,7$ (Russell *et al.*, 2016), mientras que en Takemitsu y colaboradores el resultado obtenido fue de $0.038 \pm 0,038$. Éste último es uno de los pocos estudios con CMEs de perro en

el que analizan en marcador CD105 por citometría de flujo y el resultado que obtuvieron fue negativo $0,023 \pm 0,018$ (Takemitsu *et al.*, 2012), mientras que en nuestro trabajo hemos obtenido un resultado positivo $46,55 \pm 27,56$.

Las diferencias observadas en estos dos marcadores de superficie (CD73 y CD105) pueden ser debidas a que los anticuerpos utilizados no son de la misma casa comercial como es el caso del CD105 que en Takemitsu y colaboradores utilizan uno de la marca *Bioss antibodies* (no indican el clon que utilizan), mientras que en nuestro estudio utilizamos uno de *Abcam* clon 8A1. Podemos observar en la tabla 25 que Ivanovska y colaboradores utilizan el mismo anticuerpo para el CD73 que nosotros, y obtuvimos un resultado muy similar, pero en el caso de Takemitsu y colaboradores, que también utilizaron el mismo anticuerpo obtuvieron un resultado muy diferente al nuestro. En este caso, no se podría justificar estas diferencias con el hecho de que sea otro clon u otra casa comercial.

En el caso del CD105 quizá se puede deber al protocolo utilizado, pues la casa comercial te indicaba la necesidad de aplicar un protocolo especial con este anticuerpo (explicado en "[citometría de flujo](#)") que Takemitsu y colaboradores no indican que hayan utilizado, y esto puede ser por lo que no hayan obtenido resultados similares a los nuestros.

Tabla 25. Resultados obtenidos de los marcadores de superficie celular por citometría de flujo en este trabajo y resultados del mismo análisis en varios estudios con células derivadas de tejido adiposo de perro encontrados en bibliografía.

Referencia	Marcador de superficie	Casa comercial	Clon	% Positividad \pm DS
Esta tesis	CD29	BioLegend	TS2/16	$92,16 \pm 11,1$
	CD34	eBioscience	1H6	$2,27 \pm 2,24$
	CD44	BD Pharmigen	IM7	$94,85 \pm 5,05$
	CD45	Invitrogen	YKIX716.13	$1,13 \pm 0,77$
	CD73	Bioss antibodies	Policlonal	$29,1 \pm 19,97$
	CD90	Invitrogen	YKIX337.217	$86,6 \pm 15,56$
	CD105	Abcam	8A1	$46,55 \pm 27,56$
	MHC II	LsBioLifeSpan Biosciences, Inc.	CVS20	$0,51 \pm 0,35$
Takemitsu <i>et al.</i> , 2012	CD29	BioLegend	-	$97,85 \pm 0,94$
	CD34	R&D Systems	-	$0,25 \pm 0,06$
	CD44	eBioscience	-	$97,85 \pm 0,25$
	CD45	Abcam	-	$0,24 \pm 0,02$
	CD73	Bioss antibodies	-	$0,038 \pm 0,038$
	CD90	BD Biosciences	-	$22,55 \pm 2,8$
	CD105	Bioss antibodies	-	$0,023 \pm 0,018$
Russell <i>et al.</i> , 2016	CD4	eBioscience	YKIX302.9	$48 \pm 3,5$
	CD8	AbD Serotec	YCATE55.9	$55,3 \pm 11,5$
	CD14	ThermoFisher	TÜK.4	$7,1 \pm 2,9$
	CD29	ThermoFisher	MEM-101A	$81,8 \pm 12,2$
	CD34	AbD Serotec	1H6	$18,6 \pm 3,4$

	CD44	AbD Serotec	YKIX337.8.7	100 ± 0
	CD45	AbD Serotec	YKIX716.13	1,5 ± 0,3
	CD73	ThermoFisher	7G2	63,2 ± 5,7
	CD90	eBioscience	YKIX337.217	99,6 ± 0,3
	MHC I	Kingfisher Biotech	H5BA	97,6 ± 1,8
	MHC II	AbD Serotec	YKIX334.2	4,7 ± 1,7
Ivanovska et al., 2017	CD29	BioLegend	TS2/16	99,5 ± 0,6
	CD34	eBioscience	1H6	0,5 ± 1
	CD44	eBioscience	YKIX337.8.7	78 ± 17
	CD45	eBioscience	YKIX716.13	0,25 ± 0,5
	CD73	Bioss antibodies	Policlonal	14 ± 12,3
	CD90	eBioscience	YKIX337.217	89 ± 6,7
	MHC II	eBioscience	YKIX337.8	4,5 ± 6,3
Kriston- Pál et al., 2017	CD34	R&D Systems	-	7
	CD45	eBioscience	-	5
	CD44	BioLegend	-	99
	CD90	eBioscience	-	97
Teshima et al., 2017	CD14	BD Pharmigen	M5E2	1,18 ± 0,07
	CD29	BioLegend	TS2/16	98,18 ± 1,03
	CD34	R&D Systems	1H6	0,71 ± 0,07
	CD44	BioLegend	IM7	99,48 ± 0,28
	CD45	eBioscience	YKIX716.13	1,02 ± 0,09
	CD90	eBioscience	YKIX337.217	94,03 ± 0,77

Si comparamos nuestros datos con los obtenidos en estudios de caracterización de CMEs derivadas de tejido adiposo en humanos, observamos que los datos obtenidos son similares, pero una vez más con excepción de los marcadores CD73 y CD105. En nuestro estudio hemos obtenido resultados de positividad para estos dos marcadores ($29,1 \pm 19,97$ y $46,55 \pm 27,56$ respectivamente), pero en el caso de las células humanas los resultados son mucho más positivos como por ejemplo en el caso de Baglioni y colaboradores en el que realizan una comparación de las CMEs obtenidas de grasa subcutánea o visceral y en las que el CD73 mostró una positividad de $99,7 \pm 0,2$ en las derivadas de grasa subcutánea y $96,5 \pm 3,2$ en las de grasa visceral y, en el caso del CD105, $85,8 \pm 7,8$ en las CMEs de grasa subcutánea y $93,3 \pm 5,9$ en las de grasa visceral (Baglioni *et al.*, 2009). Otro ejemplo en Heo y colaboradores en el que obtienen un resultado de $90,9 \pm 0,3$ para el CD73 y de $75,0 \pm 14,1$ en el caso del CD105 (Heo *et al.*, 2016). Observando los marcadores CD73 y CD105 en estudios de células caninas y en estudios de células humanas, se ve la necesidad de establecer un perfil de marcadores específico para la especie canina, al igual que existe uno establecido para la especie humana. Esto ayudaría mucho a los investigadores centrados en estudios con perros, y la caracterización de las células sería un poco más precisa de lo que es a día de hoy. Esto facilitaría la comparación entre estudios de los

resultados obtenidos con el uso de las CMEs, aumentando así también la reproducibilidad de los estudios.

2. Diferenciación a tres linajes distintos

En la bibliografía está descrito que para decir que una célula es una CME, además de las características comentadas anteriormente, es necesario que tengan la capacidad de diferenciación a diferentes linajes celulares, y en concreto tres: adipogénico, osteogénico y condrogénico (Domeneci *et al.*, 2006), independientemente del tejido del que provengan.

Nosotros hemos estudiado la capacidad de diferenciación de nuestras muestras celulares a esos tres linajes. Los resultados que obtuvimos no fueron los esperados, puesto que en la diferenciación osteogénica no pudimos realizar las técnicas de tinciones o qPCR puesto que el número de células que sobrevivieron tras la inducción era demasiado bajo. Revisando la literatura para obtener algo de información de qué podría estar ocurriendo, una vez más, vemos las disparidades existentes en cuanto a la diferenciación y, por otro lado, también las técnicas de diferenciación difieren mucho entre los diferentes estudios. En algunos casos se realizan tinciones citológicas e histológicas (Bunnell *et al.*, 2008; Teshima *et al.*, 2017; Zhan *et al.*, 2019), mientras que, en un menor número de casos, se realizan tanto tinciones como pruebas de expresión génica (Russell *et al.*, 2016), como hemos realizado en nuestro estudio.

Sin embargo, en la literatura observamos que las CMEs derivadas de tejido adiposo sí tienen la capacidad de diferenciarse al linaje osteogénico, observado tanto por tinciones citológicas como por expresión génica (Russell *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2019). Por ello, esto nos llevó a pensar que nuestras células podrían haber perdido la capacidad de diferenciación osteogénica por haber sido criopreservadas, pero existen evidencias de que la criopreservación celular no provoca que las CMEs pierdan su habilidad de diferenciación (Martinello *et al.*, 2011). Por tanto, esto nos indica que pudo haber un problema con el medio de inducción utilizado en estos experimentos o que la cantidad de células en cultivo fueran insuficientes para que se produjera la diferenciación osteogénica. No hemos podido realizar más ensayos de diferenciación osteogénica por la limitación de células criopreservadas, por lo que sería interesante para un futuro investigar si cambiando algunos de los parámetros utilizados las células derivadas de tejido adiposo de perro efectivamente tienen la capacidad de diferenciación osteogénica.

Todas las diferencias descritas entre los diversos estudios que nos encontramos en la literatura, una vez más, hace que el caracterizar las CMEs caninas sea un trabajo muy tedioso debido a la inexistencia de protocolos concreto. Es necesario llegar a un acuerdo, al igual que en su momento se llegó para la caracterización de las células humanas puesto que, sin un consenso es muy complicado llegar a determinar si las células que se obtienen de los tejidos de perro son o no células mesenquimales estromales.



Discusión

Evaluación clínica del tratamiento

1. Seguridad inyección intraarticular con CMEs

1.1. Seguridad local

En nuestro estudio realizamos, a los 7 días de la inyección intraarticular, una evaluación del estado de las articulaciones tratadas y de los signos vitales de los animales (temperatura, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria). Observamos que, salvo uno de los perros en el que a los 7 días presentaba una leve inflamación de la zona, ninguno de los otros perros presentó inflamación. Además, ninguno de los perros presentó diferencias en la temperatura corporal a los 7 días del tratamiento. Estos datos nos indican que los perros de nuestro estudio no presentaron rechazo de las células que utilizamos en la infiltración intraarticular. Algunos autores defienden que el uso de este tipo de células es seguro, como es el caso de Escalhão y colaboradores (Escalhão *et al.*, 2017) en el que tratan intraespinalmente a perros con problemas crónicos de daño en la espina dorsal con células mesenquimales alogénicas derivadas de tejido adiposo. En este estudio analizaron marcadores de funcionalidad del hígado y de los riñones y no observaron alteraciones después de una y dos semanas del tratamiento. Tampoco observaron diferencias en los análisis de sangre que realizaron antes y después de la inyección intraespinal de estas células. Otros autores que apoyan la seguridad de este tipo de tratamiento que, trataron 22 articulaciones de perros que presentaban dolor y cojera debido a OA (de moderada a severa) con CMEs neonatales (derivadas de los tejidos anexos neonatales que se recogieron de cesáreas) (Cabon *et al.*, 2019). Observaron que solamente 5 de las 22 articulaciones tratadas presentaron inflamación e incremento de la temperatura local el día después de la administración de las células. También evaluaron los mismos síntomas seis meses después, sin observar ningún tipo de evento adverso.

Estos dos estudios (Escalhão *et al.*, 2017; Cabon *et al.*, 2019) son un ejemplo que apoya nuestros resultados con respecto a la seguridad local del tratamiento con CMEs alogénicas.

Existe algún estudio que indica que el aparece rechazo si se realiza una segunda dosis del tratamiento celular, como es el caso de Joswig y colaboradores (Joswig *et al.*, 2017), en el que observan que aquellos caballos a los que se les trata una segunda vez con CMEs alogénicas derivadas de médula ósea, presentaban respuestas adversas como un elevado conteo de células nucleadas en el líquido sinovial. En cambio, en el estudio realizado por Cabon y colaboradores no observaron ningún tipo de rechazo cuando seis meses después inyectaron una segunda dosis de CMEs intraarticular en algunas de las articulaciones (Cabon *et al.*, 2019).

1.2. Seguridad sistémica

Además de observar la inflamación y evaluar los signos vitales de los perros que entraron a formar parte del estudio, se realizó un estudio paralelo, con otro grupo de perros (GA) en el que evaluamos la concentración de la proteína C reactiva en 5 perros a los que se trataron con CMEs

de origen alogénico (todos con la misma muestra de células) y a 2 con CMEs autólogas. Los niveles normales de concentración de proteína C reactiva en el suero de los perros se encuentra entre los valores de 0,1 y 6 mg/L. El hecho de que nuestros datos con respecto a este parámetro variaran conforme si un perro presentaba valores fuera de los niveles normales la proteína C reactiva o se encontraba dentro de los normales, nos ha hecho pensar que probablemente las CMEs estén actuando en un caso (el primero de ellos) como células pro-inflamatorias, mientras que en el otro (el segundo de ellos) parecen estar actuando como células antiinflamatorias. Está descrito que las CMEs tienen la capacidad de comportarse de manera distinta dependiendo del ambiente inflamatorio que se encuentren en el medio, es decir, pueden presentar un fenotipo pro-inflamatorio cuando la concentración de citoquinas pro-inflamatorias no es elevada, o un fenotipo antiinflamatorio en aquellos casos en el aparece una alta concentración de citoquinas pro-inflamatorias (Ren *et al.*, 2011; Jiang y Xu, 2020) (figura 38). Las CMEs son capaces de detectar señales de peligro gracias a los receptores *toll-like* (*Toll like receptor, TLR*), observándose que cuando se activa el *TLR3* las CMEs presentan un fenotipo antiinflamatorio, mientras que cuando se activan los *TLR4*, entonces las CMEs muestran un fenotipo pro-inflamatorio (Jiang y Xu, 2020). Se ha observado que las CMEs tienen funciones pro-inflamatorias en los inicios de la inflamación a través del reclutamiento de los neutrófilos. Además, las CMEs son capaces de activar las células T secretando diversas citoquinas como *MIP-1* (proteína inflamatoria macrofágica-1), *CCL5* (C-C motivo ligando 5), *CXCL9* o *CXCL10* (C-X-C motivo ligando 9 y 10 respectivamente) (Jiang y Xu, 2020).

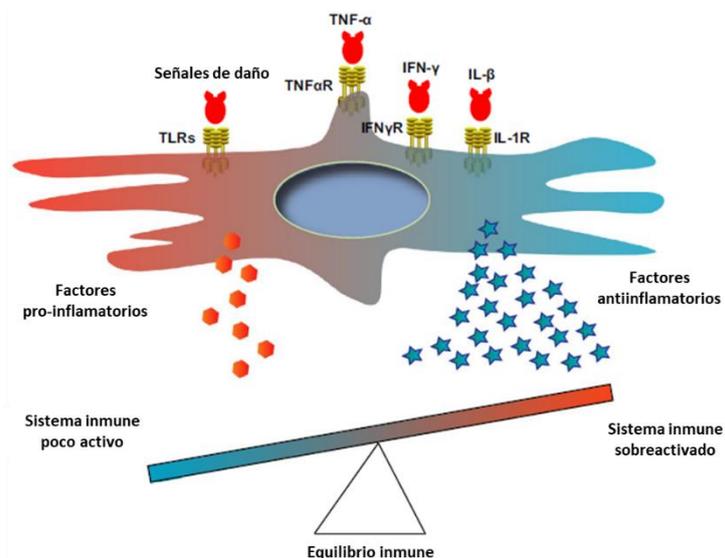


Figura 38. Fenotipos de las CMEs dependiendo del medio en el que se encuentren, con el fin de mantener un equilibrio inmune. IFN- γ (interferón- γ); IFN γ R (receptor de IFN- γ); IL-1R (receptor de interleuquina 1); TLR (receptor toll-like); TNF- α (factor de necrosis tumoral α); TNF α R (receptor del TNF- α). Imagen modificada de Jiang y Xu, 2020.

El hecho de que las CMEs puedan pasar al torrente sanguíneo desde las articulaciones se encuentra descrito en bibliografía como es el caso del estudio realizado por Wood y

colaboradores, en el que observan que las CMEs marcadas con óxido de hierro se quedan en el lugar donde se inyectaron hasta 4 semanas después del tratamiento (en este caso en rodillas de perro) pero que un porcentaje de ellas se dispersan por el torrente sanguíneo apareciendo en otros órganos como el timo, en el estómago o en el duodeno (Wood *et al.*, 2012). Por ello, otro de los motivos que barajamos para esta subida de la concentración de proteína C reactiva, es que las CMEs que hayan pasado al torrente circulatorio alcanzaran otros tejidos donde podrían estar teniendo lugar otras interacciones no detectadas. Este es un tema poco estudiado, pero es imprescindible conocer qué acciones pueden estar llevando a cabo las CMEs en esos otros tejidos, para determinar que este tipo de terapia es totalmente seguro.

Por la falta de estudios relacionados con la proteína C reactiva en aquellos casos de OA en los tratados con CMEs, debería realizarse un estudio más profundo para llegar a determinar por qué ocurre esta variación de concentración de esta proteína indicadora de inflamación.

1.3. Seguridad general

De los 9 perros que entraron a formar parte del estudio, 2 de ellos salieron por dos causas distintas. Uno de ellos murió a causa de varios tumores en las mamas y uno metastásico de pulmón. Como se puede observar en la tabla... en los criterios de exclusión se incluye “neoplasia maligna pasada o actual” pues, aunque se ha observado que estas células parecen tener un efecto dual sobre las células tumorales es predominante la función de promover la propagación del tumor (Lin *et al.*, 2019; Galland y Stamenkovic, 2019). Es por ello, que este perro no debería haber entrado a formar parte del estudio, pero en los informes veterinarios previos no se había indicado que este perro había sido operado de tumores con anterioridad.

En cuanto al otro perro que salió del estudio, fue por desarrollar insuficiencia renal crónica, una de las enfermedades que pueden ser tratadas con CMEs, por lo que no se ha relacionado con el tratamiento.

2. Evaluación clínica tras la aplicación de las CME

2.1. Análisis radiológico del GI

En esta tesis se ha realizado una valoración radiológica inicial (antes de realizar la infiltración intraarticular de las CMEs) y una al finalizar el estudio (un año después del tratamiento) siguiendo la escala Bioarth (Sánchez-Carmona *et al.*, 2006; <https://be-vet.com/servicios/escalabioarth>). Como se ha podido observar en los resultados, no existen diferencias significativas entre las puntuaciones de la VB_{GI} y las de la V7_{GI}, pero lo que sí podemos observar es que parece que a lo largo de ese año tras el tratamiento con las CMEs las articulaciones se mantuvieron sin empeorar, es decir, parece que la inyección de estas células no empeoran la progresión de la OA.

2.2. Evaluación de la evolución del GI

Con los datos que hemos obtenido después de realizar el estudio de las articulaciones de los perros con OA tratadas a lo largo de 1 año, podemos determinar que parece que aquellas variables relacionadas con la funcionalidad de la articulación se han mantenido e incluso mejorado en comparación con las variables que se encuentran relacionadas con la movilidad articular y la atrofia.

En el estudio realizado por Shah y colaboradores en el que utilizaron CMEs alogénicas derivadas de tejido adiposo en una n igual a 203 perros que padecía OA, observando que después de 10 semanas del tratamiento sólo el 12% de los perros no exhibieron cambios en los síntomas y sólo uno empeoró (Shah *et al.*, 2018). La mayoría de los perros mejoraron su actividad y funcionalidad, e incluso los dueños indicaron que observaban una mejora en el dolor que sentían los animales. A pesar de que nuestro estudio tiene la limitación de tener una n baja (n = 7 perros y 11 articulaciones), los resultados que encuentran Shah y colaboradores son similares a los que nosotros encontramos en nuestro estudio. Además, nosotros pudimos determinar que la mejora apreciada continuó al menos durante un año.

En este estudio se observó que el dolor que sufrían los perros fue disminuyendo una vez inyectadas las CMEs conforme pasaba el tiempo según los datos que nos indicaron los dueños cubriendo la escala EVA. Esta disminución del dolor puede estar asociada al efecto antiinflamatorio de las CMEs, puesto que existen estudios que demuestran que cuando estas células se encuentran en un ambiente pro-inflamatorio son capaces de secretar factores solubles inmunomoduladores como la *IDO*, la *PGE₂*, *TGF-β* o el *HGF* (Gao *et al.*, 2016; Zachar *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2018; Jian y Xu, 2020).

Si bien es cierto, los datos obtenidos por los dueños nos indican que el momento en el que observaron una mayor mejora en sus perros fue a los 6 meses del tratamiento. En el caso de los datos veterinarios se puede apreciar, entre la *V5_{GI}* y la *V7_{GI}*, un ligero aumento de aquellas articulaciones que empeoran en prácticamente todas las variables analizadas. Esta observación nos puede dar pie a que sea necesaria una segunda dosis a los 6 meses después del tratamiento, para así mantener los efectos beneficiosos para las articulaciones de los perros.

El someter a los perros a una segunda dosis de CMEs alogénicas trae consigo las incógnitas de si al inyectar intraarticularmente una segunda dosis de estas células el sistema inmune del animal rechaza o no las células. Existen algunos artículos en los que se indica que una segunda dosis de CMEs alogénicas no provocan rechazo, como es el caso del estudio realizado por Ardanaz y colaboradores, en el que observan si la aplicación de dos dosis intraarticulares de CMEs derivadas de médula ósea en caballos producía rechazo observando que no existía una

respuesta de hipersensibilidad al realizar la segunda inyección de estas células (Ardanaz *et al.*, 2016). Además, datos que obtenidos de veterinarios colaboradores de la empresa Integral Vetter que trataron perros con dos o más dosis de CMEs mostraron que ninguno de ellos mostró signos de rechazo reflejados como aumento de la temperatura corporal, reacción alérgica, náuseas o vómitos, hipotensión o inflamación.

En esta tesis no hemos podido determinar si las células pudieron ejercer un papel regenerativo dentro de la articulación, puesto que no tuvimos la oportunidad de realizar una artroscopia antes y después de la inyección intraarticular. Este es un tema donde existe mucha controversia. Hay diversos estudios que apoyan el hecho de que las CMEs sí tienen un efecto regenerativo. Dos ejemplos son los llevados a cabo por Harada y colaboradores y por Wang y colaboradores. En ambos estudios utilizaron al conejo como animal modelo. Harada y colaboradores observaron que al utilizar CMEs (en este caso derivadas de médula ósea y autólogas) y además añadir movimientos de separación de 1,5 mm, la regeneración de los defectos osteocondrales que tenían los conejos, detectando colágeno II en el tejido cartilaginoso creado (Harada *et al.*, 2015). En el caso del estudio realizado por Wang y colaboradores utilizaron CMEs derivadas de tejido adiposo humanas, que inyectaron intraarticularmente en un modelo de conejo de OA. Los defectos de las articulaciones de los conejos tratados con CMEs humanas, mostraban un tejido de reparación cartilaginoso, de superficie lisa, con elevadas cantidades de proteoglicanos, un buen grosor y además una buena expresión de colágeno II. También detectaron que las CMEs se encontraban injertadas en el cartílago regenerado concluyendo que este tratamiento es beneficioso y capaz de regenerar el tejido dañado en la OA (Wang *et al.*, 2015).

3. Comparativa GC vs. GI

Estos resultados nos dejan entrever que a la hora de elegir un tratamiento para los perros que sufren dolor a causa de la OA, quizá es mejor un tratamiento con CMEs que un AINE que presenta unos posibles efectos secundarios como pérdida de apetito, vómitos, diarrea, sangre en las heces, apatía e insuficiencia renal (*European Medicines Agency*, https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/metacam-epar-summary-public_es.pdf). Además, los efectos que hemos visto son de animales a los que les han tenido que repetir el tratamiento con Meloxicam dos o tres veces a lo largo de los seis meses de estudio, lo que no ocurre con las CMEs, ya que solo se les han inyectado una vez.

Estos datos, apoyan el hecho de que la comparación de la aplicación de CMEs frente al uso de AINEs para el tratamiento de la OA podría traer consigo más beneficios, además de carecer de efectos secundarios y ser seguras.

Pero, también nos encontramos con limitaciones a la hora de utilizar las CMEs como tratamiento. Una de estas desventajas es el coste económico de la infiltración de CMEs, ya que es mucho mayor que el coste de los AINEs. Además, como he comentado en apartados anteriores, probablemente sería necesario realizar una segunda dosis después de seis meses para que el efecto beneficioso se mantuviese mejor a lo largo del tiempo, por lo que sería un coste a mayores.



Conclusiones

Las conclusiones obtenidas después de haber realizado este trabajo de investigación en referencia a la caracterización de las células obtenidas de tejido adiposo de perros sanos son las siguientes:

Conclusión 1. Las células aisladas presentan un perfil de marcadores de superficie analizados mediante citometría de flujo que coincide con células mesenquimales estromales.

Conclusión 2. Las células aisladas presentan diferenciación hacia el linaje adipogénico tanto por expresión génica como por tinción citológica. No presentaron diferenciación hacia el linaje osteogénico. Presentaron algunas características relacionadas con la diferenciación condrogénica como el cambio de morfología de las células de las micromasas, la tinción azul del Tricrómico de Masson en la capa más superficial de las micromasas, o la expresión del gen *agrecano*.

Las conclusiones derivadas del trabajo de investigación con respecto a la valoración de la seguridad y la evaluación sintomática y funcionalidad de las articulaciones tratadas, son las que aparecen a continuación:

Conclusión 3. El tratamiento con células mesenquimales estromales derivadas de tejido adiposo de perros es una técnica segura, no presenta efectos adversos, de rechazo, infección u otro tipo de complicaciones.

Conclusión 4. La administración intraarticular de células mesenquimales estromales en perros que presenta artrosis parece que tiene un efecto de mantenimiento de la enfermedad, sin que esas articulaciones lleguen a empeorar un año después de ser tratados. El tratamiento con células mesenquimales estromales parece tener un efecto analgésico similar al observado en perros tratados con el antiinflamatorio no esteroideo Meloxicam.



Bibliografía

1. Aigner T., Cook J.L., Gerwin N., Glasson S.S., Laverty S., Little C.B., McIlwraith W. y Kraus V.B. (2010) Histopathology atlas of animal model systems – overview of guiding principles. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18; S2 – S6 DOI: 10.1016/j.joca.2010.07.013
2. Altman R.D. (2010) Early Management of Osteoarthritis. *The American Journal of Managed Care*, 16(2); S41-S47
3. Ankrum J.A., Ong J.F. y Karp J.M. (2014) Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*, 32(3); 252-260 DOI: 10.1038/nbt.2816
4. Ardanaz N., Vázquez F.J., Romero A., Remacha A.R., Barrachina L., Sanz A., Ranera B., Vitoria A., Albareda J., Prades M., Zaragoza P., Martín-Burriel I. y Rodellar C. (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*, 31 DOI: 10.1186/s12917-016-0692-x
5. Ayers D., Clements D.N., Salway F. y Day P.J.R. (2007) Expression stability of commonly used reference genes in canine articular connective tissues. *BMC Veterinary Research*, 2007; 3:7 DOI: 10.1186/1746-6148-3-7
6. Baglioni S., Francalanci M., Squecco R., Lombardi A., Cantini G., Angeli R., Gelmini S., Guasti D., Benvenuti S., Annuziato F., Bani D., Liotta F., Francini F., Perigli G., Serio M. y Luconi M. (2009) Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *The FASEB Journal*, 23(10); 3494-3505 DOI: 10.1096/fj.08-126946
7. Bajada S., Mazakova I., Ashton B.A., Richardson J.B. y Ashammakhi N. (2008) Stem Cells in Regenerative Medicine. *Topics in Tissue Engineering*, Vol.4 - Capítulo 3
8. Baksh D., Song L. y Tuan R.S. (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8; 301-316 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x
9. Bennett D., Eckersa P.D., Waterston M., Marchetti V., Rota A., McCulloch E. y Sbrana S. (2013) The effect of robenacoxib on the concentration of C-reactive protein in synovial fluid from dogs with osteoarthritis. *Veterinary Research* 2013, 9 DOI: 10.1186/1746-6148-9-42
10. Barrouin-Melo S.M., Anturaniemi J., Sankari S., Griinari M., Atroshi F., Ounjaijean S. y Hielm-Björkman A.K. (2016) Evaluating oxidative stress, serological- and haematological status of dogs suffering from osteoarthritis, after supplementing their diet with fish or corn oil. *Lipids in Health and Disease*, 15 DOI: 10.1186/s12944-016-0304-6

11. Benito P. (2002) Estructura y función del cartílago. En: Batlle-Gualda E., Benito R.P., Blanco García F.J., Martín E. (Eds). Manual S.E.R. de la Artrosis. Madrid: IMyC, 33-43
12. Bergamino C., Etienne A.-L. y Busoni V. (2015) Developing a technique for ultrasound-guided injection of the adult canine hip. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 45(4); 456-461 DOI: 10.1111/vru.12242
13. Black S., Kushner I. y Samols D. (2004) C-reactive Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279; 48487-48490 DOI: 10.1074/jbc.R400025200
14. Black L.L., Gaynor J., Gahring D., Adams C., Aron D., Harman S., Gingerich D.A. y Harman R. (2007) Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Lameness in Dogs with Chronic Osteoarthritis of the Coxofemoral Joints: A Randomized, Double-Blinded, Multicenter, Controlled Trial. *Veterinary Therapeutics*, 8(4); 272-284
15. Blanco F.J., Silva-Díaz M., Vila V.Q., Seoane-Mato D., Ruíz F.P., Juan-Mas A., Pego-Reigosa J.M., Narváez J., Quilis N., Cortés R., Pérez A.R., Canales D.F., Gayá T.F., Ferrer C.B., Sánchez-Piedra C., Díaz-González y Bustabad-Reyes S. (2020) Prevalencia de artrosis sintomática en España: Estudio EPISER2016. *Reumatología clínica* DOI: 10.1016/j.reuma.2020.01.008
16. Bland S.D. (2015) Canine osteoarthritis and treatments: a review. *Veterinary Science Development*; 5 DOI: 10.4081/vsd.2015.5931
17. Bonfield T.L., Lennon D., Ghosh S.K., DiMarino A.M., Weinberg A. y Caplan A.I (2013) Cell based therapy aides in infection and inflammation resolution in the murine model of cystic fibrosis lung disease. *Stem Cell Discovery*, 3; 139-153 DOI: 10.4236/scd.2013.32019
18. Brinkhof B., Spee B., Rothuizen J. y Penning L.C. (2006) Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Analytical Biochemistry*, 356; 36-43 DOI: 10.1016/j.ab.2006.06.001
19. Brittberg M., Lindahi A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O. y Peterson L. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 331(14); 889-895 DOI: 10.1059/NEJM199410063311401
20. Brown D.C. (2017) What can we learn from osteoarthritis pain in companion animals? *Clinical and Experimental Rheumatology*, 35; S-53-S58
21. Bunnell B.A., Flaatt M., Gagliardi C., Patel B. y Ripoll C. (2008) Adipose-derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation. *Methods*, 42(2); 115-120 DOI: 10.1013/j.ymeth.2008.03.006
22. Cabon Q., Febre M., Gomez N., Cachon T., Pillard P., Carozzo C., Saulnier N., Robert C.,

- Livet V., Rakic R., Plantier N., Saas P., Maddens S. y Viguier E. (2019) Long-Term Safety and Efficacy of Single or Repeated Intra-Articular Injection of Allogeneic Neonatal Mesenchymal Stromal Cells for Managing Pain and Lameness in Moderate to Severe Canine Osteoarthritis Without Anti-inflammatory Pharmacological Support: Pilot Clinical Study. *Frontiers in Veterinary Science*, 5 DOI: 10.3389/fvets.2019.00010
23. Caplan A.I. (1991) Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9; 641-650
 24. Caplan A.I. y Correa D. (2011) The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*, 9(1); 11-15 DOI: 10.1016/j.stem.2011.06.008
 25. Caplan A.I. (2017) Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Translational Medicine*, 6; 1445-1451 DOI: 10.1002/sctm.17-0051
 26. Castro A.R., Silva S.O. y Soares S.C. (2018) The use of high sensitivity C-Reactive Protein in cardiovascular disease detection. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences*, 21; 496 – 503 DOI: 10.18433/JPPS29872
 27. Chen C., Tambe D.T., Deng L. y Yang L. (2013) Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 149; C1202-C1208 DOI: 10.1152/ajpcell.00242.2013
 28. Clark J.M. (1990) The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *Journal of Anatomy*, 171; 117-130
 29. Constance R.Chu., Szczodry M. y Bruno S. (2010) Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair. *Tissue Engineering*, 16(1); 105-115 DOI: 10.1089/ten.teb.2009.0452
 30. Cook J.L., Kuroki K., Visco D., Pelletier J.-P., Schulz L. y Lafebber F.P.J.G. (2010) The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the dog. *Osteoarthritis and Cartilage* 18; S66-S79 DOI: 10.1016/j.joca.2010.04.017
 31. Cook J.L., Hung C.T., Kuroki K., Stoker A.M., Cook C.R., Pfelffer F.M., Sherman S.L. y J.P. Stannard (2014) Animal models of cartilage repair. *Bone & Joint Research* 3(4); 89-94 DOI: 10.1302/2046-3758.34.2000238
 32. Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V. y Uccelli A. (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107; 367-372 DOI: 10.1182/blood-2005-07-2657
 33. Cuervo B., Rubio M., Sopena J., Domínguez J.M., Vilar J., Morales M., Cugat R. y Carrillo J.M. (2014) Hip Osteoarthritis in Dogs: A Randomized Study Using Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Plasma Rich in Growth Factors. *International Journal of*

- Molecular Sciences*, 15; 13437-13460 DOI: 10.3390/ijms150813437
34. Denny H.R. y Butterworth S.J. (2006) A Guide to Canine and Feline Orthopaedic Surgery. Ed.: *Blackwell Science*, Fourth edition ISBN: 0-632-05103-5
 35. Desando G., Cavallo C., Sartoni F., Martini L., Parrilli A., Veronesi F., Fini M., Giardino R., Facchini A. y Grigolo B. (2013) Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Research & Therapy*, 15 DOI: 10.1186/ar4156
 36. de Toro F.J. (2010) Anatomía y biomecánica de la articulación humana. En: Madrid, Monfort J. E.D. *Panamericana*. Artrosis: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento, 73 - 80
 37. Diago C.A.A., García-Unzueta M.T., Fariñas M.C. y Amado J.A. (2016) Antibióticos humanos modulados por calcitriol: nuevos aspectos fisiopatológicos de la hipovitaminosis D. *Endocrinología y Nutrición*, 63(2); 87-94 DOI: 10.1016/j.endonu.2015.09.005
 38. Dieppe P.A. y Stefan L. (2005) Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet*, 365; 965-73 DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71086-2
 39. Dinarello C.A. (2000) Proinflammatory Cytokines. *CHEST*, 118(2); 503-508 DOI: 10.1378/chest.118.2.503
 40. Ding D-C. Shyu W-C y Lin S-Z (2011) Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation*, 20; 5-14 DOI: 10.3727//096368910X
 41. Domenici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J. y Horwitz E.M. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4); 315-317 DOI: 10.1080/14653240600855905
 42. Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. (2007) Anatomía veterinaria. 3ª Edición. Manual Moderno, Parte I Capítulos 1 y 2; Parte II Capítulos 16 y 17. ISBN: 978-970-729-253-6
 43. Escalhão C.C.M., Ramos I.P., Hochman-Mendez C., Brunswick T.H.K., Souza S.A.L., Gutfilen B., Goldenberg R.C.S. y Coelho-Sampaio T. (2017) Safety of Allogeneic Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Intraspinal Transplantation in Dogs with Chronic Spinal Cord Injury. *Stem Cells International*, 2017 DOI: 10.1155/2017/3053759
 44. Evans C.H., Ghivizzani S.C. y Robbins P.D. (2018) Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection. *Human Gene Therapy*, 29(1) DOI: 10.1089/hum.2017.181
 45. Eyre D. (2001) Articular cartilage and changes in Arthritis: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research & Therapy*, 4; 30-35 DOI: 10.1186/ar380
 46. Fortier L.A. (2005) Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications.

- Veterinary Surgery*, 34; 415-423 DOI: 10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x
47. Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Latsinik N.V., Panasyuk A.F. y Keiliss-Borok I. (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Transplantation*, 17IKJJ
 48. Galland S. y Stamenkovic I. (2020) Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *Journal of Pathology*, 250; 555 – 572 DOI: 10.1002/path.5357
 49. Gao F., Chiu S.M., Motan D.A.L., Zhang Z., Chen L., Ji H.-L., Tse H.-F., Fu Q.-L. y Lian Q. (2016) Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death and Disease*, 7 DOI: 10.1038/cddis.2015.327
 50. González A. y Valdés A.M. (2018) Big data boost for osteoarthritis genetics. *Osteoarthritis* DOI: 10.1038/s41584-018-0023-7
 51. Grande D.A., Singh I.J. y Pugh J. (1987) Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *The Anatomical Record*, 218(2) DOI: 10.1002/ar.1092180208
 52. Graves D.T. y Jiang Y. (1995) Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 6(2); 109-118 DOI: 10.1177/10454411950060020101
 53. Gregory M.H., Capito N., Kuroki K., Stoker A.M., Cook J.L. Y Sherman S.L. (2012) A Review of Translational Animal Models for Knee Osteoarthritis. *Arthritis*, 2012 DOI: 10.1155/2012/764621
 54. Guercio A., Di Bella S., Casella S., Di Marco P., Russo C. y Piccione G. (2013) Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biology International*, 37; 789-798 DOI: 10.1002/cbin.10090
 55. Gupta P.K., Das A.K., Chylikana A. y Majumdar A.S. (2012) Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy*, 3 DOI: 10.1186/scrt116
 56. Harada Y., Nakasa T., Mahmoud E.E., Kamei G., Adachi N., Deie M. y Ochi M. (2015) Combination Therapy With Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells and Articular Joint Distraction for Repair of a Chronic Osteochondral Defect in the Rabbit. *Journal of Orthopaedic Research*, 33(10); 1466-1473 DOI: 10.1002/jor.22922
 57. Heo J.S., Choi Y., Kim H-S y Kim H.O. (2016) Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *International Journal of Molecular Medicine*, 37; 115-125 DOI: 10.3892/ijmm.2015.2413
 58. Hillström A., Bylin J., Hagman R., Björhall K., Tvedten H., Königsson K., Fall T. y Kjelgaard-

- Hansen M. (2016) Measurement of serum C-reactive protein concentration for discriminating between suppurative arthritis and osteoarthritis in dogs. *BMC Veterinary Research*, 12 DOI: 10.1186/s12917-016-0868-4
59. Ivanovska A., Grolli S., Borghetti P., Ravanetti F., Conti V., De Angelis E., Macchi F., Ramoni R., Martelli P., Gazza F. y Cacchioli A. (2017) Immunophenotypical characterization of canine mesenchymal stem cells from perivisceral and subcutaneous adipose tissue by a species-specific panel of antibodies. *Research in Veterinary Science*, 114; 51-58 DOI: 10.1016/j.rvsc.2007.02.019
60. Jiang W. y Xu J. (2020) Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, 53 DOI: 10.1111/cpr.12712
61. Johnston S.A., McLaughlin R.M y Budsberg S.C. (2008) Nonsurgical Management of Osteoarthritis in Dogs. *Veterinary Clinics Small Animals*, 38; 1449-1470 DOI: 10.1016/j.cvsm.2008.08.001
62. Joswig A-J, Mitchell A., Cummings K.J, Levine G.J., Gregory C.A., Smith 3rd R. y 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*, 28 DOI: 10.1186/s13287-017-0503-8
63. Kang S.K., Lee D.H., Bae Y.C., Kim H.K., Baik S.Y. y Jung J.S. (2003) Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Experimental Neurology*, 183; 355-366 DOI: 10.1016/S0014-4886(03)00089-X
64. Kang B.-J., Ryu H.-H., Park S.S., Koyama Y., Kikuchi M., Woo H.-M., Kim W.H. y Kweon O.-K. (2012) Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of Veterinary Science*, 13(3); 299-310 DOI: 10.4142/jvs.2012.13.3.299
65. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H. y Bieback K. (2006) Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, 24; 1294-1301 DOI: 10.1634/stemcells.2005-0342
66. Knazovicky D., Tomas A., Motsinger-Reif A. y Lascelles B.D.X. (2015) Initial evaluation of nighttime restlessness in a naturally occurring canine model of osteoarthritis pain. *PeerJ*, 3 DOI: 10.7717/peerj.772
67. Kolasinski S.L., Neogi T., Hochberg M.C., Oatis C., Guyatt G., Block J., Callahan L., Copenhaver C., Dodge C., Felson D., Gellar K., Harvey W.F., Hawker G., Herzig E., Kwok C.K., Nelson A.E., Samuels J., Scanzello C., White D., Wise B., Altman R.D., DiRenzo D.,

- Fontanarosa J., Giradi G., Ishimori M., Misra D., Shah A.A., Shmagel A.K., Thoma L.M., Turgunbaev M., Turner A.S. y Reston J. (2020) 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care & Research*, 72; 149-162 DOI: 10.1002/acr.24131
68. Kolios G y Moodley Y (2013) Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, 85; 3-10 DOI: 10.1159/000345615
69. Krampera M., Franchini M., Pizzolo G y Aprilì G. (2007) Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfusion*, 5; 120-129 DOI: 10.2450/2007.0029-07
70. Krasnodembskaya A., Song Y., Fang X., Gupta N., Serikov V., Lee J-W y Matthay M.A. (2010) Antibacterial Effect of Human Mesenchymal Stem Cells Is Mediated in Part from Secretion of the Antimicrobial Peptide LL-37. *Stem Cells*, 28(12); 2229-2238 DOI: 10.1002/stem.544
71. Kraus V.B., Blanco F.J., Englund M., Karsdal M.A. y Lohmander L.S. (2015) Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23; 1233-1241 DOI: 10.1016/j.joca.2015.03.036
72. Kuroda T., Matsumoto T., Mifune Y., Fukui T., Kubo S., Matsuhita T., Asahara T., Kurosaka M. y Kuroda R. (2011) Therapeutic strategy of third-generation autologous chondrocyte implantation for osteoarthritis. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 116; 107-114 DOI: 10.3109/03009734.2011.552812
73. Kuyinu E.L., Narayanan G., Nair L.S. y Laurencin C.T. (2016) Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 11 DOI: 10.1186/s13018-016-0346-5
74. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E., Mourdjeva M., Oreshkova T., Belemezova K. y Kyurkchiev S. (2014) Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(5); 552-570 DOI: 10.4252/wjsc.v6.i5.552
75. Lee M.J., Kim J., Kim M.Y., Bae Y.-S., Ryu S.H., Lee T.G. y Kim J.H. (2010) Proteomic Analysis of Tumor Necrosis Factor- α -Induced Secretome of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Proteome Research*, 9; 1754-1762 DOI: 10.1021/pr900898n
76. Lee M.W., Ryu S., Kim D.S., Sung K.W., Koo H.H. y Yoo K.H. (2015) Strategies to improve the immunosuppressive properties of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 6 DOI: 10.1186/s13287-015-0178-y
77. Li X., Bai J., Ji X., Li R., Xuan Y. y Wang Y. (2014) Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *International Journal of Molecular*

- Medicine*, 34; 695-704 DOI: 10.3892/ijmm.2014.1821
78. Lin W., Huang L., Li Y., Fang B., Li G., Chen L. y Xu L. (2019) Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. *BioMed Research International*, 2019 DOI: 10.1155/2019/2820853
 79. López-Alcorocho J.M., Aboli L., Guillen-Vicente I., Rodríguez-Iñigo E., Guillen-Vicente M., Fernández-Jaén T.F., Arauz S., Abelow S. y Guillen-García P. (2018) Cartilage Defect Treatment Using High-Density Autologous Chondrocyte Implantation: Two-Year Follow-up. *Cartilage*, 9(4); 363-369 DOI: 10.1177/1947603517693045
 80. López Muñíos, E. (2010) La membrana amniótica humana: caracterización de las células madre y su aplicación en terapia celular para reparar lesiones de cartílago articular humano. *Tesis doctoral*. Universidade da Coruña (UDC); Departamento de Medicina, A Coruña
 81. Lotz M. y Loeser R.F. (2012) Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone*, 51(2); 241-248 DOI: 10.1016/j.bone.2012.03.023
 82. Maldonado M. y Nam J. (2013) The Role of Changes in Extracellular Matrix of Cartilage in the Presence of Inflammation on the Pathology of Osteoarthritis. *BioMed Research International*, 2013 DOI: 10.1155/2013/284873
 83. Man G.S. y Mologhianu G. (2014) Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint. *Journal of Medicine and Life*, 7; 37-41
 84. Martel-Pelletier J., Ban A.J., Cicuttini F.M., Conaghan P.G., Cooper C., Goldring M.B., Goldring S.R., Jones G., Teichtahl A.J. y Pelletier J.-P. (2016) Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2 DOI: 10.1038/nrdp.2016.72
 85. Martinello T., Bronzini I., Maccatrozzo L., Mollo A., Sampaolesi M., Mascarello F., Decaminada M. y Patruno M. (2011) Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Research in Veterinary Science*, 91; 18-24 DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.07.024
 86. Marx C., Silveira M.D., Selbach I., da Silva A.S., Braga L.M.G.de M., Camassola M. y Nardi N.B. (2014) Acupoint Injection of Autologous Stromal Vascular Fraction and Allogeneic Adipose-Derived Stem Cells to Treat Hip Dysplasia in Dogs. *Stem Cells International*, 2014 DOI: 10.1155/2014/391274
 87. Mazor M., Lespessailles E., Coursier R., Daniellou R., Best T.M. y Toumi H. (2014) Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: an update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18; 2340-2350 DOI: 10.1111/jcmm.12378
 88. McAlindon T.E., Bannuru R.R., Sullivan M.C., Arden N.K., Berenbaum F., Bierma-Zeinstra S.M., Hawker G.A., Henrotin Y., Hunter D.J., Kawaguchi H., Kwok K., Lohmander S.,

- Rannou F., Roos W.M. y Underwood M. (2014) OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22; 363-388 DOI: 10.1016/j.joca.2004.01.003
89. McCoy A.M. (2015) Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Veterinary Pathology*, 52(5); 803-818 DOI: 10.1177/0300985815588611
90. Meeson R.L., Todhunter R.J., Blunn G., Nuki G. y Pitsillides A.A. (2019) Spontaneous dog osteoarthritis – a One Medicine vision. *Nature Reviews Rheumatology* DOI: 10.1038/s41581-019-0202-1
91. Mistry H., Connock M., Pink J., Shyangdan D., Clar C., Royle P., Court R., Biant L.C., Metcalfe A. y Waugh N. (2017) Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*, 21(6) DOI: 10.3310/hta21060
92. Mongil E., Sánchez I., Torre F., Callejo A., Arizaga A. (2006) Fármacos de acción lenta (Sysadoa) en el tratamiento de la osteoartrosis. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 7; 485 – 496
93. Moore K.L. y Persaud T.V.N. (2008) Embriología Clínica. 8ªEd. Editorial Elsevier España. Barcelona
94. Nakamura M., Takahashi M., Ohno K., Koshino A., Nakashima K., Setoguchi A., Fujino Y. y Tsujimoto H. (2008) C-Reactive Protein concentration in dogs with various diseases. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 70(2); 127 – 131 DOI: 10.1292/jvms.70.127
95. Neogi T. y Zhang Y. (2013) Epidemiology of OA. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 39(1); 1-19 DOI: 10.1016/j.rdc.2012.10.004
96. Neupane M., Chang C-C, Kiupel M. y Yuzbasiyan-Gurkan V. (2008) Isolation and Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering*, 14(6); 1007-1015 DOI: 10.1089/tea.2007.0207
97. Oldershaw R.A. (2012) Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future. *International Journal of Experimental Pathology*, 93; 389-400 DOI: 10.1111/j.1365-2613.2012.00837.x
98. Olsen A., Johnson V., Webb T., Santangelo K.S., Dow S. y Duerr F.M. (2019) Evaluation of Intravenously Delivered Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Elbow Osteoarthritis in Dogs: A Pilot Study. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 32(3); 173-181 DOI: 10.1055/s-0039-1678547
99. Oryan A., Kamali A., Moshiri A. y Eslaminejad M.B. (2017) Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs*, 204; 59-83 DOI: 10.1159/000469704

100. Palazzo C., Nguyen C., Lefevre-Colau M.-M., Rannou F. y Poiraudau S. (2016) Risk factors and burden of osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 59; 134-138 DOI: 10.1016/j.rehab.2016.01.006
101. Panoutsopoulou K. y Zeggini E. (2013) Advances in osteoarthritis genetics. *Journal of Medical Genetics*, 50; 715-724 DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-101754
102. Peters I.R., Peeters D., Helps C.R. y Day M.J. (2007) Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Veterinary immunology and immunopathology*, 117; 55-56 DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.01.011
103. Pettitt R.A. y German A.J. (2015) Investigation and management of canine osteoarthritis. *Focus* DOI: 10.1136/inp.h5763
104. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S. y Marshak D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284; 143-147
105. Pond M.J. y Nuki G. (1973) Experimentally-induced Osteoarthritis in the Dog. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 32(4); 387-388 DOI: 10.1136/ard.32.4.387
106. Poole C.A. (1997) Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *Journal of Anatomy*, 191; 1-13 DOI: 10.1046/j.1469-7580.1997.19110001.x
107. Qiong J., Xia Z., Jing L. y Haibin W. (2020) Synovial mesenchymal stem cells effectively alleviate osteoarthritis through promoting the proliferation and differentiation of meniscus chondrocytes. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24; 1645-1655 DOI: 10.26355/eurrev_202002_20338
108. Ràfols M.E. (2014) Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y nutrición*, 61(2); 100-112 DOI: 10.1016/j.endonu.2013.03.011
109. Richardson S.M., Kalamegam G., Pushparaj P.N., Matta C., Memic A., Khademhosseini A., Mobasheri R., Poletti F.L., Hoyland J.A. y Mobasheri A. (2016) Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods*, 15; 69-80 DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.09.015
110. Ren G., Roberts A.I. y Shi Y. (2011) Adhesion molecules: Key players in Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Cell Adhesion & Migration*, 5; 20-22 DOI: 10.4161/cam.5.1.13491
111. Richler C. y Yaffe D. (1970) The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Developmental Biology*, 23(1):1-22 DOI: 10.1016/s0012-1606(70)80004-5

112. Roberts S., Genever P., McCaskie A. y De Bari C. (2011) Prospects of stem cell therapy in osteoarthritis. *Regenerative Medicine*, 6(3); 351-366 DOI: 10.2217/RME.11.21
113. Rodriguez-Merchan E.C. y Valentino L.A. (2019) The Role of Gene Therapy in Cartilage Repair. *The Archives of Bone and Joint Surgery*, 7(2); 79-90
114. Russell W.M.S. y Burch R.L. (1959) The Principles of Humane Experimental Technique. *London, Methuen*
115. Russell K.A., Chow N.H.C., Dukoff D., Gibson T.W.G., LaMarre J., Betts D.H. y Koch T.G. (2016) Characterization and Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS ONE*, 11(12) DOI: 10.1371/journal.pone.0167442
116. Safford K.M., Hicok K.C., Safford S.D., Halvorsen Y.-D.C., Wilkison W.O., Gimble J.M. y Rice H.E. (2002) Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294; 371-379 DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00469-2
117. Sánchez-Carmona A., Agut A., Chico A., Closa J.M., Rial J. y Velasco A. (2006) Desarrollo de una Escala de valoración radiológica del grado de Osteoartrosis para las articulaciones de la rodilla y el codo en el perro – ESCALA “BIOARTH”. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 26(3); 269-275 (<https://bevet.com/servicios/escalabioarth/cadera/Escala-BIOARTH-funcional-de-la-cadera/Calcular>)
118. Sasaki A., Mizuno M., Mochizuki M. y Sekiya I. (2019) Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in dogs. *World Journal of Stem Cells*, 11(5); 254-269 DOI: 10.4252/wjsc.v11.i5.254
119. Schäffler A. y Büchler C. (2007) Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells-Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells*, 25; 818-827 DOI: 10.1634/stemcells.2006-0589
120. Scott R.M., Evans R. y Conzemius M.G. (2017) Efficacy of an Oral Nutraceutical for the Treatment of Canine Osteoarthritis. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Prospective Clinical Trial. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 30(5); 318-323 DOI: 10.3415/VCOT-17-02-0020
121. Serrato B. (2015) Estudio Clínico Multicéntrico del Efecto de la Aplicación de Células Mesenquimales de Grasa (CMG), Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) y la Combinación de Ambos en el Tratamiento de la Enfermedad Degenerativa Articular

- en Perro. *Tesis Doctoral*. Universidad Cardenal Herrera-CEU; Departamento Medicina y Cirugía Animal, Valencia
122. Shah K, Drury T., Roic I., Hansen P., Malin M., Boyd R., Sumer H. y Ferguson R. (2018) Outcome of Allogeneic Adult Stem Cell Therapy in Dogs Suffering from Osteoarthritis and Other Joint Defects. *Stem Cells International*, 2018 DOI: 10.1155/2018/7309201
 123. Shepherd D.E.T. y Seedhom B.B. (1999) Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58(1); 27-34 DOI: 10.1136/ard.58.1.27
 124. Shi Y., Wang Y., Li Q., Liu K., Hou J., Shao C. y Wang Y. (2018) Immunoregulatory Mechanisms of Mesenchymal Stem and Stromal Cells in Inflammatory Diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 14; 493-507 DOI: 10.1038/s41581-018-0023-5
 125. Sinusas K. (2012) Osteoarthritis: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician*, 85(1); 49-56
 126. Smith G.N., Myers S.L., Brandt K.D. y Mickler E.A. (1998) Effect of Intraarticular Hyaluronan Injection in Experimental Canine Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 41(6); 976-985 DOI: 10.1002/1529-0131(199806)41:6<976::AID-ART4>3.0.CO;2-R
 127. Talavera J. Chinchilla-Gil J.I., García D., Castellanos G., López-Lucas M.D., Atucha N.M. y Moraleda J.M. (2017) Terapia con células madre en medicina veterinaria: conceptos generales y evidencias clínicas. *Revista AVEPA*, 37(2); 87-101
 128. Teshima T., Matsumoto H., Michishita M., Matsuoka A., Shiba M., Nagashima T. y Koyama H. (2017) Allogenic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stema Cells Ameliorate Acute Hepatic Injury in Dogs. *Stem Cells International*, 2017 DOI: 10.1155/2017/3892514
 129. Tsai S-Y, Huang Y-C, Chueh L-L, Yeh L-S y Lin C-S (2014) Intra-articular transplantation of porcine adipose-derived stem cells for the treatment of canine osteoarthritis: A pilot study. *World J Transplant*, 4; 196 – 205 DOI: 10.5500/wjt.v4i3.196
 130. Umlauf D., Frank S., Pap T. y Bertraand J. (2010) Cartilage biology, pathology, and repair. *Cellular and Molecular Life Science*, 67; 4197-4211 DOI: 10.1007/s00018-010-0498-0
 131. Vieira N.M., Brandalise V., Zucconi E., Secco M., Strauss B.E. y Zatz M. (2010) Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. *Cell Transplantation*, 19; 279-289 DOI: 10.3727/096368909X481764
 132. Vijarnsorn M., Kwananocha I., Kashemsant N., Jarudecha T., Lekcharoensuk C., Beale B., Peirone B. y Lascelles B.D.X. (2019) The effectiveness of marine based fatty acid

- compound (PCSO-524) and firocoxib in the treatment of canine osteoarthritis. *BMC Veterinary Research*, 15 DOI: 10.1186/s12917-019-2110-7
133. Vilar J.M., Batista M., Morales M., Santana A., Cuervo B., Rubio M., Cugat R., Sopena J. y Carrillo J.M. (2014) Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Veterinary Research*, 10 DOI: 10.1186/1746-6148-10-143
134. Villatoro A.J., Fernández V., Claros S., Rico-Llanos G.A., Becerra J. y Andrades J.A. (2015) Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. *BioMed Research International*, 2015 DOI: 10.1155/2015/527926
135. Vina E.R. y Kwok C.K. (2018) Epidemiology of Osteoarthritis: Literature Update. *Current Opinion in Rheumatology*, 30(2); 160-167 DOI: 10.1097/BOR.0000000000000479
136. Wang L., Zhao Y. y Shi S. (2012) Interplay between Mesenchymal Stem Cells and Lymphocytes: Implications for Immunotherapy and Tissue Regeneration. *Journal of Dental Research*, 91(11); 1003-1010 DOI: 10.1177/0022034512460404
137. Wang W., He N., Feng C., Liu V., Zhang L., Wang F., He J., Zhu T., Wang S., Qiao W., Li S., Zhou G., Zhang L., Dai C. y Cao W. (2015) Human Adipose-Derived Mesenchymal Progenitor Cells Engraft into Rabbit Articular Cartilage. *International Journal of Molecular Sciences*, 16; 12076-12091 DOI: 10.3390/ijms160612076
138. Wankhade U.D., Shen M., Kolhe R. y Fulzele S. (2016) Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering. *Stem Cells International*, 2016 DOI: 10.1155/2016/3206807
139. Wu J.P., Kirk T.B. y Zheng M.H. (2008) Study of collagen structure in the superficial zone and physiological state of articular cartilage using a 3D confocal imaging technique. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 3 DOI: 10.1186/1749-799X-3-29
140. Wood J.A., Chung D-J, Park S.A., Zwingernberger A.L., Reilly C.M., Ly I., Walker N.J., Vernau W., Hayashi K., Wisner E.R., Cannon M.S., Kass P.H., Cherry S.R., Borjesson D.L., Russell P. y Murphy C.J. (2012) Periocular and Intra-Articular Injection of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: An *In Vivo* Imaging and Migration Study. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, 28(3) DOI: 10.1089/jop.2011.0166
141. Yaneselli K.M., Kuhl C.P., Terraciano P.B., de Oliveira F.S., Pizzato S.B., Pazza K., Magrisso A.B., Torman V., Rial A., Moreno M., Llambí S., Cirne-Lima E. y Maisonnave J. (2018) Comparison of the characteristics of canine adipose tissue-derived mesenchymal

- stem cells extracted from different sites and at different passage numbers. *Journal of Veterinary Science*, 19(1); 13-20 DOI: 10.4142/jvs.2018.19.1.13
142. Yao Z., Zhang Y. y Wu H. (2019) Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation. *Inflammation Research*, 68(10); 815-823 DOI: 10.1007/s00011-019-01269-1
 143. Zachar L., Bačenkova D. y Rosocha J. (2016) Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *Journal of Inflammation Research*, 9; 231-240 DOI: 10.2147/JIR.S121994
 144. Zakrzewski W., Dobrzyński M., Szymonowicz M. y Rybak Z. (2019) Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10 DOI: 10.1186/s13287-019-1165-5
 145. Zhan X-S, El-Ashram S., Luo D-Z, Luo H-N, Wang B-Y, Chen S-F, Bai Y-S, Chen Z-S, Liu C-Y y Ji H-Q (2019) A Comparative Study of Biological Characteristics and Transcriptome Profiles of Mesenchymal Stem Cells from Different Canine Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019 DOI: 10.3390/ijms20061485
 146. Zhang J. (2018) Meta-analysis of serum C-reactive protein and cartilage oligomeric matrix protein levels as biomarkers for clinical knee osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 19 DOI: 10.1189/s12891-018-1932-y
 147. Zhang Y. y Jordan J.M. (2010) Epidemiology of Osteoarthritis. *Clinics in Geriatric Medicine*, 26(3); 355-369 DOI: 10.1016/j.cger.2010.03.001
 148. Zheng Y., Huagn C., Liu F., Lin H., Yang X. y Zhang Z. (2017) Comparison of the neuronal differentiation abilities of bone marrow-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 16; 3877-3886 DOI: 10.3892/mmr.2017.7069
 149. Zorzi A.R., Amstalden E.M.I., Plepis A.M.G., Martins V.C.A., Ferretti M., Antonioli E., Duarte A.S.S., Luzo A.C.M. y Miranda J.B. (2015) Effect of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells on the Regeneration of Ovine Articular Cartilage. *International Journal of Molecular Sciences*, 16; 26813-26831 DOI: 10.3390/ijms161125989
 150. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P. y Hedrick M.H. (2001) Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, 7; 211-228 DOI: 10.1089/107632701300062859



ANEXO

Cuestionarios y consentimiento
informado

VETERINARIOS

Perro:

CUESTIONARIO ANÁLISIS FUNCIONAL PARA CADERA

LIMITACIÓN FUNCIONAL

1. Cambios en los apoyos en la estación (extremidad posterior)

- El perro apoya normal en la estación
- Desplaza la carga a un lado
- Apoya sólo los dedos
- No apoya

2. Cambio de postura al levantarse

- El perro se levanta correctamente
- Modifica la posición al levantarse
- Presenta muchas dificultades al levantarse
- No se levanta

3. Cojera en frío

- No cojea al iniciar el andar
- Cojea inicialmente pero desaparece durante los primeros 10 minutos de marcha
- Cojea inicialmente pero desaparece tras 10-20 minutos de marcha
- La cojera no desaparece

4. Grado de cojera durante la marcha (tras más de 10 minutos de marcha)

- No cojea
- Cojera leve
- Cojera intensa
- No apoya la extremidad afectada

MOVILIDAD ARTICULAR

5. La movilización articular manual pasiva en la cadera es

- Libre de dolor y crepitación

- Se produce dolor leve en los últimos grados de flexión y extensión
- Se produce dolor y/o crepitación durante el recorrido
- No se puede realizar debido al elevado dolor y/o crepitación

6. ROM (Rango de movimiento)- Limitación de movimiento en flexión, el grado de flexión de la cadera es...

- Flexión total 50-60°
- Ligera limitación < 80°
- Limitación severa > 80°

7. ROM- Limitación de movimiento en extensión, el grado de extensión de la cadera es...

- Extensión total 160-170°
- Ligera limitación 150-160°
- Limitación severa < 150°

ATROFIA MUSCULAR

8. Atrofia muscular

- No hay signos de atrofia muscular
- Atrofia leve
- Atrofia severa

VETERINARIOS

Perro:

CUESTIONARIO ANÁLISIS FUNCIONAL PARA CODO

LIMITACIÓN FUNCIONAL

9. Cambios en los apoyos en la estación (extremidad anterior)

- El perro apoya normal en la estación
- Desplaza la carga a un lado
- Apoya sólo los dedos
- No apoya

10. Cambio de postura al levantarse

- El perro se levanta correctamente
- Modifica la posición al levantarse
- Presenta muchas dificultades al levantarse
- No se levanta

11. Cojera en frío

- No cojea al iniciar el andar
- Cojea inicialmente pero desaparece durante los primeros 10 minutos de marcha
- Cojea inicialmente pero desaparece tras 10-20 minutos de marcha
- La cojera no desaparece

12. Grado de cojera durante la marcha (tras más de 10 minutos de marcha)

- No cojea
- Cojera leve
- Cojera intensa
- No apoya la extremidad afectada

MOVILIDAD ARTICULAR

13. La movilización articular manual pasiva en el codo es

- Libre de dolor y crepitación
- Se produce dolor leve en los últimos grados de flexión y extensión
- Se produce dolor y/o crepitación durante el recorrido

No se puede realizar debido al elevado dolor y/o crepitación

14. ROM (Rango de movimiento)- Limitación de movimiento en flexión, el grado de flexión del codo es...

Flexión total 20°- 50°

Ligera limitación < 60°

Limitación severa > 60°

15. ROM-Limitación de movimiento en extensión, el grado de extensión del codo es...

Extensión total 160°-170°

Ligera limitación > 150°

Limitación severa < 150°

ATROFIA MUSCULAR

16. Atrofia muscular

No hay signos de atrofia muscular

Atrofia muscular leve

Atrofia severa

VETERINARIOS

Perro:

CUESTIONARIO ANÁLISIS FUNCIONAL PARA RODILLA

LIMITACIÓN FUNCIONAL

17. Cambios en los apoyos en la estación (extremidad posterior)

- El perro apoya normal en la estación
- Desplaza la carga a un lado
- Apoya sólo los dedos
- No apoya

18. Cambio de postura al levantarse

- El perro se levanta correctamente
- Modifica la posición al levantarse
- Presenta muchas dificultades al levantarse
- No se levanta

19. Cojera en frío

- No cojea al iniciar el andar
- Cojea inicialmente pero desaparece durante los primeros 10 minutos de marcha
- Cojea inicialmente pero desaparece tras 10-20 minutos de marcha
- La cojera no desaparece

20. Grado de cojera durante la marcha (tras más de 10 minutos de marcha)

- No cojea
- Cojera leve
- Cojera intensa
- No apoya la extremidad afectada

MOVILIDAD ARTICULAR

21. La movilización articular manual pasiva en la rodilla es

- Libre de dolor y crepitación

- Se produce dolor leve en los últimos grados de flexión y extensión
- Se produce dolor y/o crepitación durante el recorrido
- No se puede realizar debido al elevado dolor y/o crepitación

22. ROM (Rango de movimiento)- Limitación de movimiento en flexión, el grado de flexión de la rodilla es...

- Flexión total 40°- 50°
- Ligera limitación < 70°
- Limitación severa > 70°

23. ROM-Limitación de movimiento en extensión, el grado de extensión de la rodilla es...

- Extensión total 160°-170°
- Ligera limitación > 150°
- Limitación severa < 150°

ATROFIA MUSCULAR

24. Atrofia muscular

- No hay signos de atrofia muscular
- Atrofia muscular leve
- Atrofia severa

No corre ni juega bajo ningún estímulo

3. Bajar escaleras

Baja largos tramos de escaleras sin dificultad

Baja bien tramos cortos pero muestra dificultad en tramos de 16 escalones o más

Baja con dificultad tramos de 1 a 3 escalones o incluso bordillos

Se resiste a bajar cualquier escalón

4. Limitaciones de pequeños saltos (40 -50 cm)

Baja sin problemas del sofá o del coche

Baja con dificultad del sofá o del coche

No baja del sofá o del coche

EN GENERAL, ¿CÓMO PUNTUARÍA EL DOLOR DE SU MASCOTA EN EL DÍA A DÍA?



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre y Apellidos del propietario:

Nombre mascota:

Nombre y Apellidos de quién ha informado:

- Acepto de forma voluntaria que mi mascota participe en el estudio: “Estudio clínico para el uso alogénico de células madre mesenquimales expandidas de tejido adiposo en perros con artrosis”
- He leído la Hoja de Información al Paciente, comprendo los riesgos y los beneficios que comporta, que el que mi mascota participe es voluntario y que la puedo retirar o solicitar que retiren sus datos siempre que quiera
- Comprendo que la participación de mi mascota en el estudio consiste en: asistir a las visitas programadas y seguir las pautas indicadas por los veterinarios
- Comprendo que mi mascota recibirá un beneficio directo por la participación en este estudio y que no recibiré ningún beneficio económico en el futuro en caso de que se desarrolle un nuevo tratamiento
- Comprendo que la información del estudio será confidencial y que ninguna persona no autorizada tendrá acceso a los datos o a las muestras
- Sé cómo ponerme en contacto con los investigadores si lo necesito

FIRMA PROPIETARIO

FIRMA DE QUIÉN HA INFORMADO

Fecha (día/mes/año):

Puede contactar con los investigadores del estudio llamando al teléfono.



ANEXO

Análisis de sangre

Tabla 26. Resultados analítica de sangre perro P03 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después.

P03	Antes infiltración	12 meses tras infiltración	Valores normales
HEMATOLOGÍA			
SERIE ROJA			
Hematíes	7,56 mill/mm ³	6,72 mill/mm ³	5,5 - 8,5 mill/mm ³
Hemoglobina	16,8 g/dL	15,5 g/dL	12 - 18 g/dL
Hematocrito	51,5 %	44,1 %	37 - 55 %
V.C.M.	68,1 fL	65,6 fL	60 - 77 fL
H.C.M.	22,2 pgr	23,1 pgr	19,5 - 24,5 pgr
C.H.C.M.	32,6 g/dL	35,1 g/dL	30 - 36 g/dL
R.D.W.	16,6 %	15 %	13 - 19 %
Reticulocitos	0,2 %	0,47 %	0 - 1,5 %
SERIE BLANCA			
Leucocitos	10,38 x10 ³ /mm ³	9,74 x10 ³ /mm ³	6 - 17 x10 ³ /mm ³
Segmentados	75,2 %	73,4 %	60 - 77 %
Linfocitos	16,7 %	15,2 %	15 - 35 %
Monocitos	4,1 %	7 %	2 - 7 %
Eosinófilos	2,3 %	4 %	2 - 7 %
Basófilos	0,6 %	0,1 %	0 - 1 %
Cayados	1,1 %	0,3 %	0 - 3 %
SERIE PLAQUELAR			
Plaquetas	127 x10 ³ /mm ³	208 x10 ³ /mm ³	120 - 500 x10 ³ /mm ³
V.P.M.	8,9 fL	12,8 fL	8 - 14 fL
Frotis sanguíneo	Frotis normal	Frotis normal	
BIOQUÍMICA			
Glucosa	63 mg/dL	98 mg/dL	60 - 120 mg/dL
Urea	33 mg/dL	37 mg/dL	10 - 70 mg/dL
Creatinina	0,8 mg/dL	0,78 mg/dL	0,4 - 1,5 mg/dL
Colesterol total	247,7 mg/dL	232 mg/dL	100 - 280 mg/dL
Triglicéridos	44,1 mg/dL	38 mg/dL	20 - 200 mg/dL
Proteínas totales	72,1 g/L	71 g/L	55 - 75 g/L
Albúmina	32,30 g/L	29,75 g/L	23 - 45 g/L
Globulinas totales	39,80 g/L	41,25 g/L	22 - 42 g/L
ALT (GPT)	31 UI/L	28 UI/L	10 - 80 UI/L
AST (GOT)	41,5 UI/L	30 UI/L	10 - 70 UI/L
Fosfatasa alcalina	11 UI/L	15 UI/L	10 - 180 UI/L
Bilirrubina total	0,04 mg/dL	<0,1 mg/dL	0 - 0,6 mg/dL
Lipasa	11 U/L	11 U/L	10 - 240 U/L
Amilasa	633 UI/L	571 UI/L	290 - 1400 UI/L
Creatina fosfoquinasa	227 UI/L	137 UI/L	30 - 460 UI/L

Tabla 23. Resultados analítica de sangre perro P04 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después.

P04	Antes infiltración	12 meses tras infiltración	Valores normales
HEMATOLOGÍA			
SERIE ROJA			
Hematíes	6,73 mill/mm ³	6,48 mill/mm ³	5,5 - 8,5 mill/mm ³
Hemoglobina	15,6 g/dL	15,3 g/dL	12 - 18 g/dL
Hematocrito	43,2 %	43,8 %	37 - 55 %
V.C.M.	64,2 fL	67,6 fL	60 - 77 fL
H.C.M.	23,2 pgr	23,6 pgr	19,5 - 24,5 pgr
C.H.C.M.	36,1 g/dL	34,9 g/dL	30 - 36 g/dL
R.D.W.	13,4 %	12,7 %	13 - 19 %
Reticulocitos	0,19 %	0,24 %	0 - 1,5 %
SERIE BLANCA			
Leucocitos	6,57 x10 ³ /mm ³	4,5 x10 ³ /mm ³	6 - 17 x10 ³ /mm ³
Segmentados	71,1 %	48 %	60 - 77 %
Linfocitos	17,3 %	40,1 %	15 - 35 %
Monocitos	4,1 %	5,7 %	2 - 7 %
Eosinófilos	5,2 %	4,6 %	2 - 7 %
Basófilos	0,2 %	0 %	0 - 1 %
Cayados	2,1 %	1,6 %	0 - 3 %
SERIE PLAQUELAR			
Plaquetas	176 x10 ³ /mm ³	244 x10 ³ /mm ³	120 - 500 x10 ³ /mm ³
V.P.M.	10,3 fL	9,5 fL	8 - 14 fL
Frotis sanguíneo	Frotis normal	Leucopenia con neutropenia	
BIOQUÍMICA			
Glucosa	84 mg/dL	80 mg/dL	60 - 120 mg/dL
Urea	19 mg/dL	35 mg/dL	10 - 70 mg/dL
Creatinina	1,1 mg/dL	1,02 mg/dL	0,4 - 1,5 mg/dL
Colesterol total	282 mg/dL	412 mg/dL	100 - 280 mg/dL
Triglicéridos	58 mg/dL	114 mg/dL	20 - 200 mg/dL
Proteínas totales	65,7 g/L	67 g/L	55 - 75 g/L
Albúmina	32,73 g/L	31,45 g/L	23 - 45 g/L
Globulinas totales	32,97 g/L	35,55 g/L	22 - 42 g/L
ALT (GPT)	33 UI/L	113 UI/L	10 - 80 UI/L
AST (GOT)	35,3 UI/L	33 UI/L	10 - 70 UI/L
Fosfatasa alcalina	29 UI/L	32 UI/L	10 - 180 UI/L
Bilirrubina total	0,147 mg/dL	0,1 mg/dL	0 - 0,6 mg/dL
Lipasa	58 U/L	53 U/L	10 - 240 U/L
Amilasa	360 UI/L	253 UI/L	290 - 1400 UI/L
Creatina fosfoquinasa	138 UI/L	218 UI/L	30 - 460 UI/L

Tabla 28. Resultados analítica de sangre perro P05 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después.

P05	Antes infiltración	12 meses tras infiltración	Valores normales
HEMATOLOGÍA			
SERIE ROJA			
Hematíes	8,26 mill/mm ³	6,95 mill/mm ³	5,5 - 8,5 mill/mm ³
Hemoglobina	18,4 g/dL	15,9 g/dL	12 - 18 g/dL
Hematocrito	53,6 %	46,3 %	37 - 55 %
V.C.M.	64,9 fL	66,6 fL	60 - 77 fL
H.C.M.	22,3 pgr	22,9 pgr	19,5 - 24,5 pgr
C.H.C.M.	34,3 g/dL	34,3 g/dL	30 - 36 g/dL
R.D.W.	17,9 %	15,9 %	13 - 19 %
Reticulocitos	1,32 %	0,77 %	0 - 1,5 %
SERIE BLANCA			
Leucocitos	6,08 x10 ³ /mm ³	6 x10 ³ /mm ³	6 - 17 x10 ³ /mm ³
Segmentados	62,4 %	72,8 %	60 - 77 %
Linfocitos	24,3 %	14 %	15 - 35 %
Monocitos	6,6 %	6,4 %	2 - 7 %
Eosinófilos	6,3 %	4 %	2 - 7 %
Basófilos	0 %	0 %	0 - 1 %
Cayados	0,4 %	2,8 %	0 - 3 %
SERIE PLAQUELAR			
Plaquetas	527 x10 ³ /mm ³	233 x10 ³ /mm ³	120 -500 x10 ³ /mm ³
V.P.M.	10,5 fL	10,6 fL	8 - 14 fL
Frotis sanguíneo			
Frotis sanguíneo	Frotis normal	Frotis normal	
BIOQUÍMICA			
Glucosa	71 mg/dL	80 mg/dL	60 - 120 mg/dL
Urea	49 mg/dL	39 mg/dL	10 - 70 mg/dL
Creatinina	1,1 mg/dL	0,78 mg/dL	0,4 - 1,5 mg/dL
Colesterol total	225,7 mg/dL	206 mg/dL	100 - 280 mg/dL
Triglicéridos	131,6 mg/dL	42 mg/dL	20 - 200 mg/dL
Proteínas totales	72,7 g/L	63 g/L	55 - 75 g/L
Albúmina	32,81 g/L	32,30 g/L	23 - 45 g/L
Globulinas totales	39,89 g/L	30,7 g/L	22 - 42 g/L
ALT (GPT)	36 UI/L	30 UI/L	10 - 80 UI/L
AST (GOT)	27,7 UI/L	17 UI/L	10 - 70 UI/L
Fosfatasa alcalina	15 UI/L	32 UI/L	10 - 180 UI/L
Bilirrubina total	0,04 mg/dL	0,1 mg/dL	0 - 0,6 mg/dL
Lipasa	47 U/L	41 U/L	10 - 240 U/L
Amilasa	774 UI/L	719 UI/L	290 - 1400 UI/L
Creatina fosfoquinasa	149 UI/L	335 UI/L	30 - 460 UI/L

Tabla 29. Resultados analítica de sangre perro P06 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después.

P06	Antes infiltración	12 meses tras infiltración	Valores normales
HEMATOLOGÍA			
SERIE ROJA			
Hematíes	mill/mm ³	7,51 mill/mm ³	5,5 - 8,5 mill/mm ³
Hemoglobina	16 g/dL	17 g/dL	12 - 18 g/dL
Hematocrito	46,59 %	47.9 %	37 - 55 %
V.C.M.	61 fL	63,8 fL	60 - 77 fL
H.C.M.	20,9 pgr	22,6 pgr	19,5 - 24,5 pgr
C.H.C.M.	34,3 g/dL	35,5 g/dL	30 - 36 g/dL
R.D.W.	16 %	13,7 %	13 - 19 %
Reticulocitos	%	0,43 %	0 - 1,5 %
SERIE BLANCA			
Leucocitos	x10 ³ /mm ³	8,61 x10 ³ /mm ³	6 - 17 x10 ³ /mm ³
Segmentados	%	47,5 %	60 - 77 %
Linfocitos	37,4 %	35 %	15 - 35 %
Monocitos	2,1 %	7,8 %	2 - 7 %
Eosinófilos	0,22 %	9,6 %	2 - 7 %
Basófilos	0,03 %	0,1 %	0 - 1 %
Cayados	%	0,0 %	0 - 3 %
SERIE PLAQUELAR			
Plaquetas	x10 ³ /mm ³	209 x10 ³ /mm ³	120 -500 x10 ³ /mm ³
V.P.M.	12,8 fL	12,2 fL	8 - 14 fL
Frotis sanguíneo		Frotis normal	
BIOQUÍMICA			
Glucosa	93 mg/dL	91 mg/dL	60 - 120 mg/dL
Urea	mg/dL	44 mg/dL	10 - 70 mg/dL
Creatinina	0,8 mg/dL	1,05 mg/dL	0,4 - 1,5 mg/dL
Colesterol total	mg/dL	134 mg/dL	100 - 280 mg/dL
Triglicéridos	mg/dL	39 mg/dL	20 - 200 mg/dL
Proteínas totales	g/L	58 g/L	55 - 75 g/L
Albúmina	g/L	29,75 g/L	23 - 45 g/L
Globulinas totales	g/L	28,25 g/L	22 - 42 g/L
ALT (GPT)	20 UI/L	26 UI/L	10 - 80 UI/L
AST (GOT)	UI/L	33 UI/L	10 - 70 UI/L
Fosfatasa alcalina	UI/L	49 UI/L	10 - 180 UI/L
Bilirrubina total	0,3 mg/dL	0,1 mg/dL	0 - 0,6 mg/dL
Lipasa	47 U/L	86 U/L	10 - 240 U/L
Amilasa	774 UI/L	702 UI/L	290 - 1400 UI/L
Creatina fosfoquinasa	UI/L	110 UI/L	30 - 460 UI/L

Tabla 30. Resultados analítica de sangre perro P07 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después.

P07	Antes infiltración	12 meses tras infiltración	Valores normales
HEMATOLOGÍA			
SERIE ROJA			
Hematíes	10,02 mill/mm ³	8,8 mill/mm ³	5,5 - 8,5 mill/mm ³
Hemoglobina	18,3 g/dL	18,5 g/dL	12 - 18 g/dL
Hematocrito	65,4 %	55 %	37 - 55 %
V.C.M.	65,3 fL	62,2 fL	60 - 77 fL
H.C.M.	18,2 pgr	21 pgr	19,5 - 24,5 pgr
C.H.C.M.	27,9 g/dL	33,6 g/dL	30 - 36 g/dL
R.D.W.	16,6 %	0,31 %	13 - 19 %
Reticulocitos	1 %	0,0273 %	0 - 1,5 %
SERIE BLANCA			
Leucocitos	6,75 x10 ³ /mm ³	6,62 x10 ³ /mm ³	6 - 17 x10 ³ /mm ³
Segmentados	59,1 %	58,6 %	60 - 77 %
Linfocitos	26 %	23,9 %	15 - 35 %
Monocitos	13,1 %	6,2 %	2 - 7 %
Eosinófilos	1,6 %	11,3 %	2 - 7 %
Basófilos	0,2 %	0 %	0 - 1 %
Cayados	%	0 %	0 - 3 %
SERIE PLAQUELAR			
Plaquetas	324 x10 ³ /mm ³	255 x10 ³ /mm ³	120 -500 x10 ³ /mm ³
V.P.M.	11,6 fL	10,4 fL	8 - 14 fL
Frotis sanguíneo		Frotis normal	
BIOQUÍMICA			
Glucosa	140 mg/dL	67 mg/dL	60 - 120 mg/dL
Urea	mg/dL	28 mg/dL	10 - 70 mg/dL
Creatinina	1 mg/dL	0,92 mg/dL	0,4 - 1,5 mg/dL
Colesterol total	mg/dL	mg/dL	100 - 280 mg/dL
Triglicéridos	mg/dL	mg/dL	20 - 200 mg/dL
Proteínas totales	g/L	63 g/L	55 - 75 g/L
Albúmina	g/L	30,60 g/L	23 - 45 g/L
Globulinas totales	g/L	21 g/L	22 - 42 g/L
ALT (GPT)	50 UI/L	UI/L	10 - 80 UI/L
AST (GOT)	UI/L	UI/L	10 - 70 UI/L
Fosfatasa alcalina	UI/L	UI/L	10 - 180 UI/L
Bilirrubina total	0,7 mg/dL	mg/dL	0 - 0,6 mg/dL
Lipasa	U/L	U/L	10 - 240 U/L
Amilasa	UI/L	UI/L	290 - 1400 UI/L
Creatina fosfoquinasa	UI/L	UI/L	30 - 460 UI/L

Tabla 31. Resultados analítica de sangre perro P08 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después.

P08	Antes infiltración	12 meses tras infiltración	Valores normales
HEMATOLOGÍA			
SERIE ROJA			
Hematíes	7,87 mill/mm ³	6,94 mill/mm ³	5,5 - 8,5 mill/mm ³
Hemoglobina	18 g/dL	17 g/dL	12 - 18 g/dL
Hematocrito	53,8 %	49 %	37 - 55 %
V.C.M.	68,4 fL	70,6 fL	60 - 77 fL
H.C.M.	24,1 pgr	24,5 pgr	19,5 - 24,5 pgr
C.H.C.M.	35,3 g/dL	34,7 g/dL	30 - 36 g/dL
R.D.W.	16,4 %	14 %	13 - 19 %
Reticulocitos	%	0,47 %	0 - 1,5 %
SERIE BLANCA			
Leucocitos	7,7 x10 ³ /mm ³	8,7 x10 ³ /mm ³	6 - 17 x10 ³ /mm ³
Segmentados	%	67,7 %	60 - 77 %
Linfocitos	26,7 %	13,7 %	15 - 35 %
Monocitos	3,4 %	5,3 %	2 - 7 %
Eosinófilos	25,3 %	13,2 %	2 - 7 %
Basófilos	0,2 %	0,1 %	0 - 1 %
Cayados	1,54 %	0 %	0 - 3 %
SERIE PLAQUELAR			
Plaquetas	125 x10 ³ /mm ³	241 x10 ³ /mm ³	120 -500 x10 ³ /mm ³
V.P.M.	10,9 fL	10,4 fL	8 - 14 fL
Frotis sanguíneo		Frotis normal	
BIOQUÍMICA			
Glucosa	84 mg/dL	101 mg/dL	60 - 120 mg/dL
Urea	27 mg/dL	34 mg/dL	10 - 70 mg/dL
Creatinina	1,03 mg/dL	1,21 mg/dL	0,4 - 1,5 mg/dL
Colesterol total	211 mg/dL	148 mg/dL	100 - 280 mg/dL
Triglicéridos	64 mg/dL	54 mg/dL	20 - 200 mg/dL
Proteínas totales	g/L	68 g/L	55 - 75 g/L
Albúmina	g/L	30,6 g/L	23 - 45 g/L
Globulinas totales	g/L	37,40 g/L	22 - 42 g/L
ALT (GPT)	43 UI/L	34 UI/L	10 - 80 UI/L
AST (GOT)	25 UI/L	26 UI/L	10 - 70 UI/L
Fosfatasa alcalina	25 UI/L	20 UI/L	10 - 180 UI/L
Bilirrubina total	0,1 mg/dL	0,1 mg/dL	0 - 0,6 mg/dL
Lipasa	25 U/L	58 U/L	10 - 240 U/L
Amilasa	576 UI/L	703 UI/L	290 - 1400 UI/L
Creatina fosfoquinasa	UI/L	96 UI/L	30 - 460 UI/L

Tabla 32. Resultados analítica de sangre perro P09 antes de la inyección intraarticular de las CMEs y un año después.

P09	Antes infiltración	12 meses tras infiltración	Valores normales
HEMATOLOGÍA			
SERIE ROJA			
Hematíes	mill/mm ³	6,62 mill/mm ³	5,5 - 8,5 mill/mm ³
Hemoglobina	15,8 g/dL	16,6 g/dL	12 - 18 g/dL
Hematocrito	46 %	47,4 %	37 - 55 %
V.C.M.	fL	71,6 fL	60 - 77 fL
H.C.M.	pgr	25,1 pgr	19,5 - 24,5 pgr
C.H.C.M.	34,3 g/dL	35 g/dL	30 - 36 g/dL
R.D.W.	%	13,1 %	13 - 19 %
Reticulocitos	%	1,45 %	0 - 1,5 %
SERIE BLANCA			
Leucocitos	12,8 x10 ³ /mm ³	10,88 x10 ³ /mm ³	6 - 17 x10 ³ /mm ³
Segmentados	%	64,3 %	60 - 77 %
Linfocitos	17 %	20,7 %	15 - 35 %
Monocitos	%	6,4 %	2 - 7 %
Eosinófilos	0 %	6,5 %	2 - 7 %
Basófilos	%	0,1 %	0 - 1 %
Cayados	%	2 %	0 - 3 %
SERIE PLAQUELAR			
Plaquetas	372 x10 ³ /mm ³	275 x10 ³ /mm ³	120 - 500 x10 ³ /mm ³
V.P.M.	fL	9,8 fL	8 - 14 fL
Frotis sanguíneo			
BIOQUÍMICA			
Glucosa	82 mg/dL	66 mg/dL	60 - 120 mg/dL
Urea	8 mg/dL	61 mg/dL	10 - 70 mg/dL
Creatinina	1 mg/dL	0,98 mg/dL	0,4 - 1,5 mg/dL
Colesterol total	226 mg/dL	286 mg/dL	100 - 280 mg/dL
Triglicéridos	mg/dL	257 mg/dL	20 - 200 mg/dL
Proteínas totales	61 g/L	62 g/L	55 - 75 g/L
Albúmina	30 g/L	30,60 g/L	23 - 45 g/L
Globulinas totales	31 g/L	31,40 g/L	22 - 42 g/L
ALT (GPT)	34 UI/L	15 UI/L	10 - 80 UI/L
AST (GOT)	UI/L	41 UI/L	10 - 70 UI/L
Fosfatasa alcalina	UI/L	22 UI/L	10 - 180 UI/L
Bilirrubina total	0,3 mg/dL	<0,1 mg/dL	0 - 0,6 mg/dL
Lipasa	U/L	110 U/L	10 - 240 U/L
Amilasa	521 UI/L	561 UI/L	290 - 1400 UI/L
Creatina fosfoquinasa	UI/L	305 UI/L	30 - 460 UI/L



ANEXO

Radiografías

Tabla 33. Radiografías del perro P03 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después.

P03		
	Antes inyección intraarticular CMEs	1 año después de inyección intraarticular de CMEs
Rodilla izquierda		
Rodilla derecha		

Tabla 34. Radiografías del perro P04 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después.

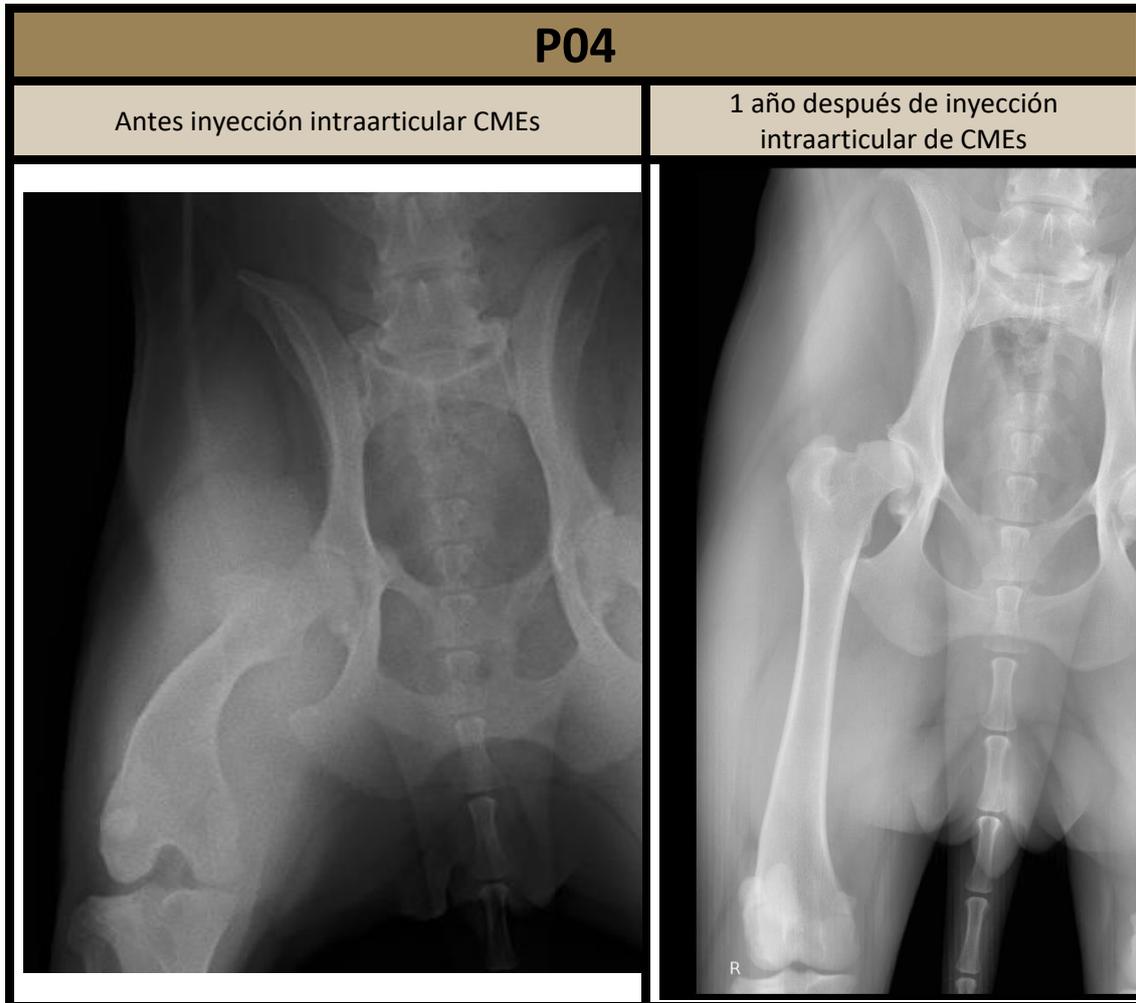


Tabla 35. Radiografías del perro P05 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después.

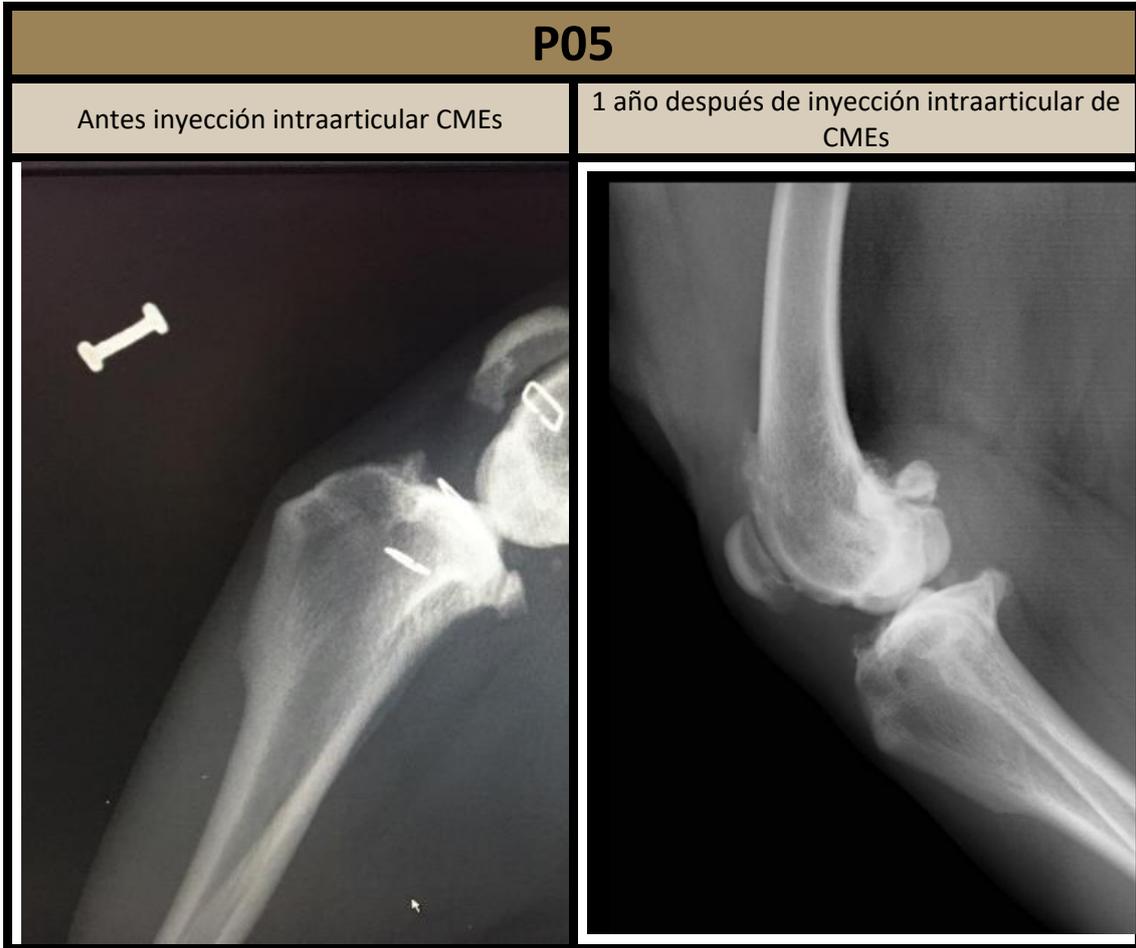


Tabla 36. Radiografías del perro P06 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después.

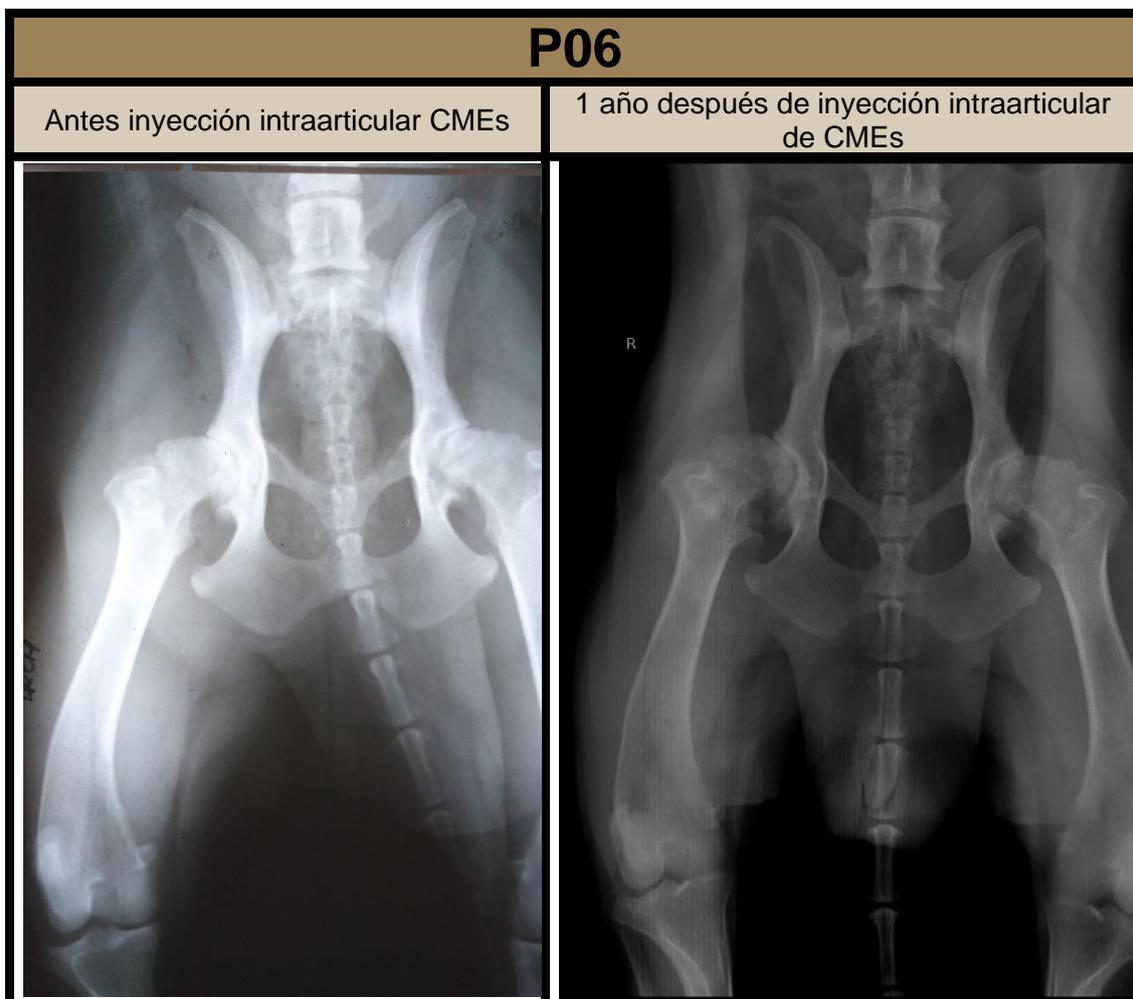


Tabla 37. Radiografías del perro P07 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después.

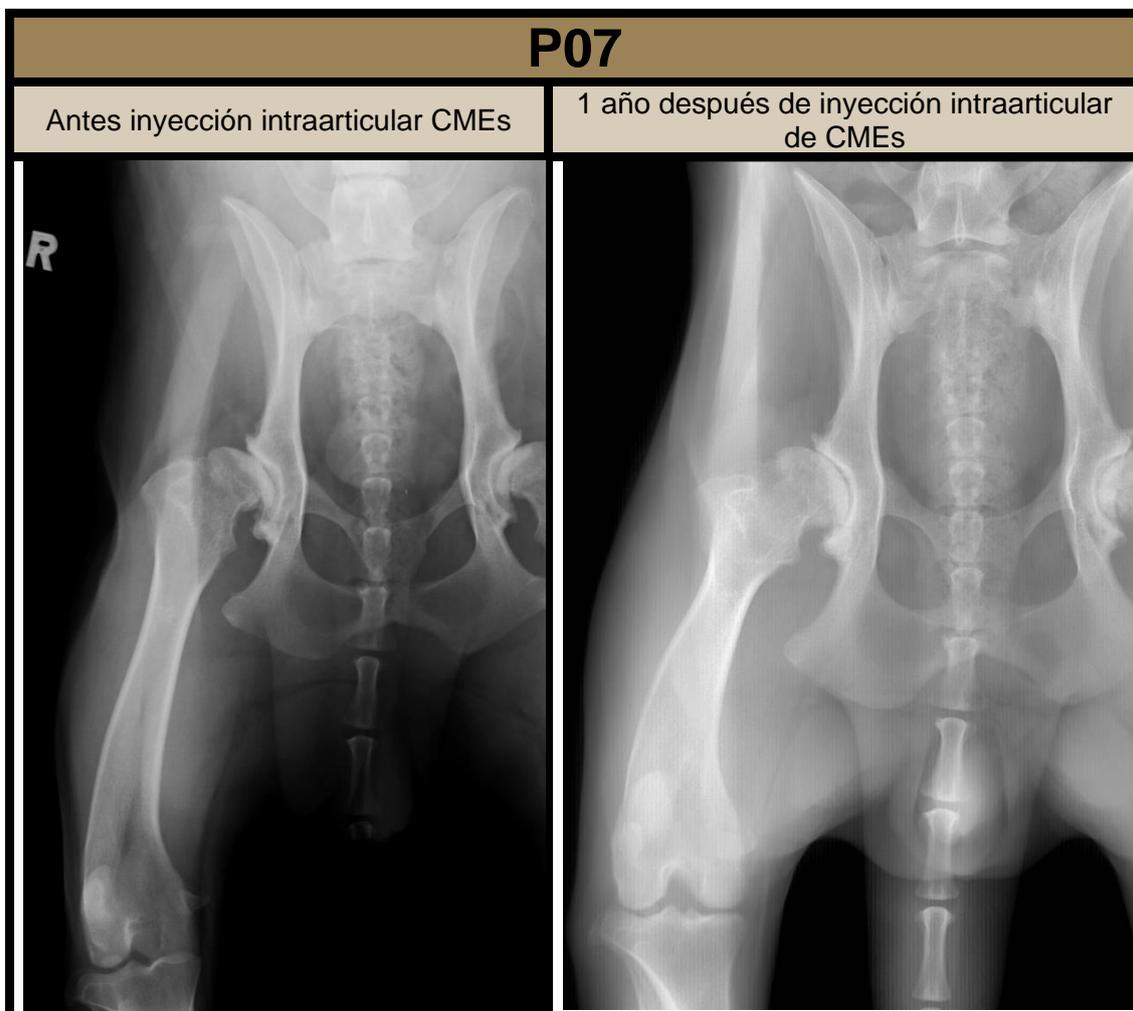
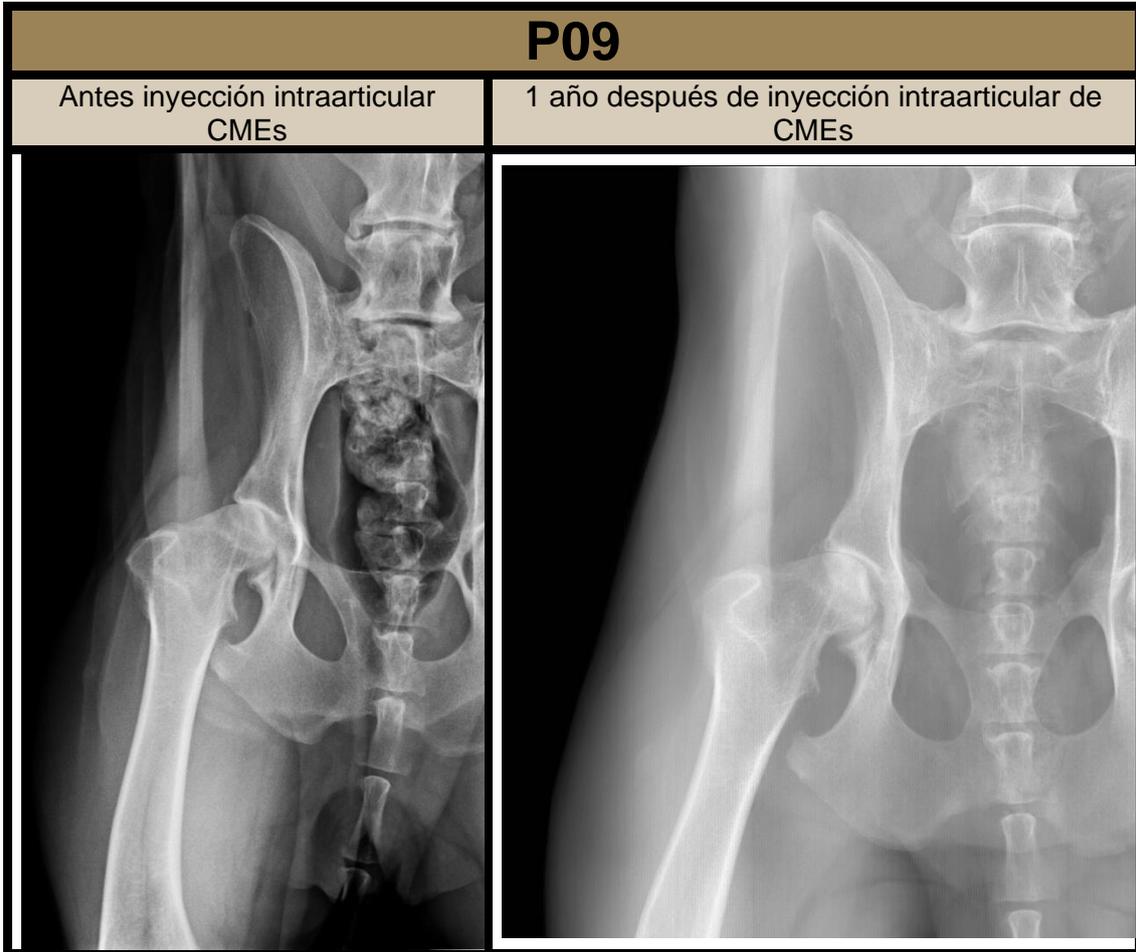


Tabla 38. Radiografías del perro P08 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después.

P08	
Antes inyección intraarticular CMEs	1 año después de inyección intraarticular de CMEs
	

Tabla 39. Radiografías del perro P09 antes de la inyección intraarticular de CMEs y un año después.





ANEXO

Tablas

Tabla 40. Resultados del porcentaje de articulaciones que mejoran con respecto a la VB_{GI} (Visita basal del grupo de animales con tratamiento de CMEs) frente a la V2_{GI}, V4_{GI}, V5_{GI} y V7_{GI} (visita un mes después del tratamiento, visita 3 meses después del tratamiento, visita 6 meses después del tratamiento y visita 1 año después del tratamiento, respectivamente).

	Variables	% articulaciones que mejoran			
		V2 _{GI} vs. VB _{GI}	V4 _{GI} vs. VB _{GI}	V5 _{GI} vs. VB _{GI}	V7 _{GI} vs. VB _{GI}
FUNCIONALIDAD	Cambios en los apoyos en la estación	27,3	27,3	36,4	45,5
	Cambios de postura al levantarse	45,5	45,5	45,5	63,6
	Cojera en frío	45,5	54,5	54,5	45,5
	Cojera en caliente	27,3	45,5	45,5	27,3
MOVILIDAD ARTICULAR	Movilización articular manual pasiva	18,2	36,4	36,4	27,3
	Limitación flexión	9,1	9,1	0	0
	Limitación extensión	0	18,2	27,3	27,3
ATROFIA	Atrofia muscular	27,3	27,3	9,1	30

Tabla 41. Resultados del porcentaje de articulaciones que se mantienen con respecto a la VB_{GI} (Visita basal del grupo de animales con tratamiento de CMEs) frente a la V2_{GI}, V4_{GI}, V5_{GI} y V7_{GI} (visita un mes después del tratamiento, visita 3 meses después del tratamiento, visita 6 meses después del tratamiento y visita 1 año después del tratamiento, respectivamente).

	Variables	% articulaciones que se mantienen			
		V2 _{GI} vs. VB _{GI}	V4 _{GI} vs. VB _{GI}	V5 _{GI} vs. VB _{GI}	V7 _{GI} vs. VB _{GI}
FUNCIONALIDAD	Cambios en los apoyos en la estación	54,5	63,6	63,6	36,4
	Cambios de postura al levantarse	45,5	54,5	54,5	27,3
	Cojera en frío	45,5	36,4	36,4	45,5
	Cojera en caliente	45,5	45,5	45,5	63,3
MOVILIDAD ARTICULAR	Movilización articular manual pasiva	72,7	45,5	45,5	54,5
	Limitación flexión	90,9	81,8	90,9	54,5
	Limitación extensión	81,8	54,5	54,5	63,6
ATROFIA	Atrofia muscular	72,7	54,5	81,8	60

Tabla 42. Resultados del porcentaje de articulaciones que empeoran con respecto a la VB_{GI} (Visita basal del grupo de animales con tratamiento de CMEs) frente a la V2_{GI}, V4_{GI}, V5_{GI} y V7_{GI} (visita un mes después del tratamiento, visita 3 meses después del tratamiento, visita 6 meses después del tratamiento y visita 1 año después del tratamiento, respectivamente).

	Variables	% articulaciones que empeoran			
		V2 _{GI} vs. VB _{GI}	V4 _{GI} vs. VB _{GI}	V5 _{GI} vs. VB _{GI}	V7 _{GI} vs. VB _{GI}
FUNCIONALIDAD	Cambios en los apoyos en la estación	18,2	9,1	0	18,2
	Cambios de postura al levantarse	9,1	0	0	9,1
	Cojera en frío	9,1	9,1	9,1	9,1
	Cojera en caliente	9,1	9,1	9,1	9,1
MOVILIDAD ARTICULAR	Movilización articular manual pasiva	9,1	18,2	18,2	18,2
	Limitación flexión	0	9,1	9,1	45,5
	Limitación extensión	18,2	27,3	18,2	9,1
ATROFIA	Atrofia muscular	0	18,2	9,1	10

Tabla 43. Resultado del porcentaje de perros que mejoran en diferentes variables observadas por los dueños de los perros comparando la VB_{GI} (visita antes del tratamiento con CMEs) con respecto a la V2_{GI}, V5_{GI} y V7_{GI} (visita un mes después, 6 meses después y 1 año después del tratamiento respectivamente).

	Variables	% perros que mejoran		
		V2 _{GI} vs. VB _{GI}	V5 _{GI} vs. VB _{GI}	V7 _{GI} vs. VB _{GI}
Grado de dificultad de la mascota a...	Subir escaleras	42,9	57,1	14,3
	Bajar escaleras	57,1	57,1	57,1
	Levantarse después de estar sentada	28,6	57,1	28,6
	Estar de pie	28,6	42,9	14,3
	Estar sentada	28,6	28,6	14,3
Resistencia de la mascota a...	Andar durante el paseo	0	14,3	28,6
	La carrera y el juego	0	28,6	14,3
	Limitaciones saltos (40 – 50 cm)	14,3	28,6	28,6

Tabla 44. Resultado del porcentaje de perros que se mantienen en diferentes variables observadas por los dueños de los perros comparando la VB_{G1} (visita antes del tratamiento con CMEs) con respecto a la V2_{G1}, V5_{G1} y V7_{G1} (visita un mes después, 6 meses después y 1 año después del tratamiento respectivamente).

	Variables	% perros que se mantienen		
		V2 _{G1} vs. VB _{G1}	V5 _{G1} vs. VB _{G1}	V7 _{G1} vs. VB _{G1}
Grado de dificultad de la mascota a...	Subir escaleras	57,1	42,9	85,7
	Bajar escaleras	28,6	42,9	28,6
	Levantarse después de estar sentada	71,4	42,9	57,1
	Estar de pie	28,6	42,9	57,1
	Estar sentada	57,1	42,9	71,4
Resistencia de la mascota a...	Andar durante el paseo	71,4	85,7	57,1
	La carrera y el juego	71,4	71,4	71,4
	Limitaciones saltos (40 – 50 cm)	71,4	57,1	71,4

Tabla 45. Resultado del porcentaje de perros que empeoran en diferentes variables observadas por los dueños de los perros comparando la VB_{G1} (visita antes del tratamiento con CMEs) con respecto a la V2_{G1}, V5_{G1} y V7_{G1} (visita un mes después, 6 meses después y 1 año después del tratamiento respectivamente).

	Variables	% perros que empeoran		
		V2 _{G1} vs. VB _{G1}	V5 _{G1} vs. VB _{G1}	V7 _{G1} vs. VB _{G1}
Grado de dificultad de la mascota a...	Subir escaleras	0	0	0
	Bajar escaleras	14,3	0	14,3
	Levantarse después de estar sentada	0	0	14,3
	Estar de pie	42,9	14,3	28,6
	Estar sentada	28,6	28,6	14,3
Resistencia de la mascota a...	Andar durante el paseo	28,6	0	14,3
	La carrera y el juego	28,6	0	14,3
	Limitaciones saltos (40 – 50 cm)	14,3	14,3	0

Tabla 46. Comparativa del porcentaje de articulaciones que mejoran del GI (grupo de tratamiento con CMEs) y del GC (grupo control tratados con Meloxicam).

	Variables	Comparativa % articulaciones que mejoran GI vs. GC					
		V2 _{GI}	V2 _{GC}	V4 _{GI}	V4 _{GC}	V5 _{GI}	V5 _{GC}
FUNCIONALIDAD	Cambios en los apoyos en la estación	27,3	33,3	27,3	28,6	36,4	40
	Cambios de postura al levantarse	45,5	33,3	45,5	28,6	45,5	13,3
	Cojera en caliente	27,3	33,3	45,5	9,5	45,5	13,3
MOVILIDAD ARTICULAR	Movilización articular manual pasiva	18,2	23,8	36,4	23,8	36,4	20
	Limitación flexión	9,1	9,5	9,1	9,5	0	0
	Limitación extensión	0	0	18,2	0	27,3	0
ATROFIA	Atrofia muscular	27,3	0	27,3	0	9,1	0

Tabla 47. Comparativa del porcentaje de articulaciones que se mantienen del GI (grupo de tratamiento con CMEs) y del GC (grupo control tratados con Meloxicam).

	Variables	Comparativa % articulaciones se mantienen GI vs. GC					
		V2 _{GI}	V2 _{GC}	V4 _{GI}	V4 _{GC}	V5 _{GI}	V5 _{GC}
FUNCIONALIDAD	Cambios en los apoyos en la estación	54,5	66,7	63,6	71,4	63,6	60
	Cambios de postura al levantarse	45,5	66,7	54,5	71,4	54,5	86,7
	Cojera en caliente	27,3	66,7	45,5	81	45,5	73,3
MOVILIDAD ARTICULAR	Movilización articular manual pasiva	18,2	76,2	45,5	76,2	45,5	80
	Limitación flexión	9,1	90,5	81,8	90,5	90,9	100
	Limitación extensión	0	100	54,5	100	54,5	100
ATROFIA	Atrofia muscular	27,3	100	54,5	100	81,8	100

Tabla 48. Comparativa del porcentaje de articulaciones que empeoran del GI (grupo de tratamiento con CMEs) y del GC (grupo control tratados con Meloxicam).

	Variables	Comparativa % articulaciones empeoran GI vs. GC					
		V2 _{GI}	V2 _{GC}	V4 _{GI}	V4 _{GC}	V5 _{GI}	V5 _{GC}
FUNCIONALIDAD	Cambios en los apoyos en la estación	18,2	0	9,1	0	0	0
	Cambios de postura al levantarse	9,1	0	0	0	0	0
	Cojera en caliente	9,1	0	9,1	9,5	9,1	13,3
MOVILIDAD ARTICULAR	Movilización articular manual pasiva	9,1	0	18,2	0	18,2	0
	Limitación flexión	0	0	9,1	0	9,1	0
	Limitación extensión	18,2	0	27,3	0	18,2	0
ATROFIA	Atrofia muscular	0	0	18,2	0	9,1	0