

Universidad CEU Cardenal Herrera
CEINDO – CEU Escuela Internacional de
Doctorado

PROGRAMA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA SALUD



Estudio de la Administración Intraósea de Células
Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con
Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones
Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo
(*Oryctolagus cuniculus*)

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Marta Torres Torrillas

Dirigida por:

Joaquín Jesús Sopena Juncosa

Elena Damiá Giménez

VALENCIA

2023

JOAQUÍN JESÚS SOPENA JUNCOSA Y ELENA DAMIÁ GIMÉNEZ, DOCTORES EN VETERINARIA Y PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada **“Estudio de la administración intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el manejo de lesiones condrales agudas. Modelo experimental en conejo (*Oryctolagus cuniculus*)”** de la que es autora **Doña Marta Torres Torrillas**, Graduada en Veterinaria, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en la Escuela Internacional de Doctorado CEINDO en el marco del Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de la Salud, dentro de la Línea de Investigación de Patología y Sanidad Humana y Animal, y reúne las condiciones científicas y formales para ser presentada ante el tribunal correspondiente a fin de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste, firmamos el presente en Alfara del Patriarca, a 23 de marzo de 2023.



Fdo: Dr. Joaquín Jesús Sopena Juncosa



Dra. Dª. Elena Damiá Giménez

A Mamá y Papá

Agradecimientos

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Universidad CEU Cardenal Herrera por ofrecerme durante todos estos años la oportunidad de realizar el doctorado disfrutando de la ayuda predoctoral FPI CEU-UCH. Gracias también a todo el personal de la CEINDO que, de una forma u otra, me ha brindado su ayuda siempre que la he necesitado.

Millones de gracias a mi equipo, BIOMED SURGEY, porque sin el trabajo de cada uno de vosotros esto no hubiese sido posible. Gracias por acogerme siendo una alumna de tercero y enseñarme lo maravilloso de la cirugía, la traumatología y del mundo de la investigación. La pasión que transmitís por este trabajo hizo que al terminar la carrera tuviese muy claro en qué me quería convertir. Gracias por ofrecerme embarcarme en

este proyecto con vosotros, por confiar en mí. A mis directores de tesis, Joaquín y Elena, y a Mónica, por acompañarme en este camino, por los consejos, por buscar siempre un hueco para ayudarme y escucharme. Me siento muy afortunada de haber podido contar con todos vosotros.

Gracias a la Fundación García-Cugat por toda la ayuda prestada para la realización de esta tesis.

Gracias al personal de la Granja de Investigación y Docencia, en especial a Amparo, por cuidar con tanto cariño a todos y cada uno de tus animales, incluidas mis conejitas.

Gracias también al personal del laboratorio de anatomía patológica del Hospital Clínico Veterinario, por ayudarme en el procesado de las muestras.

Gracias a la Universidad de Utrecht y al Instituto Hubrecht, por acogerme durante dos meses, por compartir conmigo todos vuestros conocimientos sobre células madre e histología y hacerme sentir parte de vuestros proyectos en tan poquito tiempo.

Gracias a mis amigas de la “uni”, a Anita y Carla, por cada práctica y cada cerveza al salir, cada tarde de biblioteca y cada fiesta después de exámenes, cada mañana interminable de clases y cada viaje en las vacaciones, durante aquellos maravillosos cinco años. Gracias también por todo lo que ha venido después, por seguir estando.

Gracias a mis amigos del Erasmus, Marina, Christian y Ale. Porque viajar a vuestro lado, y no lo digo solo literalmente, es maravilloso. No puedo estar más agradecida de que os cruzaseis en mi camino y que, por suerte, hoy en día sigáis tan cerca.

Gracias a mis amigas del pueblo, las de toda la vida, porque estar con vosotras es sinónimo de sentirse en casa. Gracias por no decirme siempre lo que me gustaría escuchar, por los consejos y el apoyo constante, por las risas y por cada uno de los momentos compartidos. Con vosotras la vida es muy fácil y bonita.

Gracias a mi familia peluda. A Ulises, fuiste un sueño hecho realidad. Gracias por enseñarme lo bonito que es compartir la vida con un perro, por quererme sin condiciones. Probablemente no habría descubierto esta bonita profesión de no ser por ti. A Läder, porque tu ronroneo es suficiente para relajarme. A Eleven, por tus besos

incesables y ser así de cariñosa. A Nena, por ser mi sombra y dejarme que te toque la barriguita para hacerme feliz.

Gracias Vanessa, por estar a mi lado durante estos años y por hacerme feliz. Por consolarme cada vez que me desesperaba y no veía el final. Por celebrar cada uno de mis logros como si fuese tuyo. Por creer en que era capaz, por impulsarme y ayudarme a conseguir mis objetivos. Sin ti, estos años de esfuerzo y trabajo habrían sido muy muy difíciles.

Gracias a mi familia. Durante estos años, ante el estrés, una comida y sobremesa de las largas con vosotros ha sido de las mejores medicinas.

Gracias Fer, por ser el mejor hermano mayor. Gracias Mamá y Papá, por darme alas para volar, por hacerme sentir libre. Gracias por haberme regalado experiencias maravillosas, por poner siempre todo lo que ha estado en vuestra mano para que me convirtiese en la persona que soy hoy, tanto a nivel personal como a nivel laboral. Gracias a los tres por cuidar siempre de mí, por saber valorarme, por ser reflejo de generosidad y compromiso. Os quiero mucho.

Índices

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Índice de Contenido

<i>Agradecimientos</i>	<i>I</i>
<i>Índices</i>	<i>VII</i>
<i>Índice de Contenido</i>	<i>IX</i>
<i>Índice de Tablas</i>	<i>XIII</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>XIX</i>
<i>Listado Abreviaturas</i>	<i>XXIII</i>
<i>Introducción</i>	<i>1</i>
<i>Hipótesis y Objetivos</i>	<i>7</i>

Hipótesis de Trabajo	9
Objetivos.....	11
Revisión Bibliográfica	13
Cartílago Articular.....	15
Estructura y función del cartílago articular.....	15
Respuesta a la lesión.....	23
Definición de osteoartritis.....	25
Epidemiología	26
Patogénesis.....	29
Diagnóstico	36
Tratamiento de la Osteoartritis	47
Tratamientos no farmacológicos	48
Tratamientos farmacológicos	53
Tratamiento quirúrgico.....	56
Terapias regenerativas.....	67
Células Madre Mesenquimales.....	68
Plasma Rico en Factores de Crecimiento.....	77
Material y Métodos.....	85
Modelo animal.....	88
Instalaciones	90
Diseño experimental.....	90
Plasma Rico en Factores de Crecimiento.....	90
Células Mesenquimales derivadas de la Grasa	93
Preparación del paciente y procedimiento anestésico.....	93
Procedimiento quirúrgico	94
Análisis de biomarcadores séricos.....	97
Evaluación macroscópica.....	97
Evaluación microscópica.....	98
Análisis estadístico.....	102
Resultados.....	103
Estudio descriptivo de los animales	107
Criterios de inclusión y exclusión de los animales en el estudio	107
Dolor postquirúrgico.....	109

Estudio descriptivo y comparativo del análisis de biomarcadores	111
Ácido hialurónico	111
Neopéptido C2C del colágeno	114
Estudio descriptivo y comparativo de la evaluación macroscópica	119
Color del tejido de reparación	120
Presencia de vasos sanguíneos en el tejido de reparación	122
Superficie del tejido de reparación	125
Llenado del defecto	127
Degeneración del cartílago adyacente	130
Valoración global	132
Estudio descriptivo y comparativo de la evaluación histológica	137
Escala OARSI	137
Escala ICRS II	151
<i>Discusión</i>	185
Defectos condrales y osteoartritis	187
Evaluación del modelo experimental	189
Biomarcadores húmedos de OA	191
Uso del Plasma Rico en Factores de Crecimiento	195
Uso de las Células Madre Mesenquimales Derivadas de la Grasa	197
Asociación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento con Células Madre Mesenquimales Derivadas de la Grasa	200
Importancia del Hueso Subcondral en la Osteoartritis	203
Variables del estudio	205
<i>Conclusiones</i>	213
<i>Limitaciones</i>	217
<i>Resumen</i>	221
<i>Summary</i>	227
<i>Bibliografía</i>	233
<i>Anexos</i>	303
Anexo 1. Treating full depth cartilage defects with intraosseous infiltration of plasma rich in growth factors: An experimental study in rabbits	305

Anexo 2. Intra-osseous infiltration of adipose mesenchymal stromal cells and plasma rich in growth factors to treat acute full depth cartilage defects in a rabbit model: Serum osteoarthritis biomarkers and macroscopical assessment306

Anexo 3. Intra-Osseous Plasma Rich in Growth Factors Enhances Cartilage and Subchondral Bone Regeneration in Rabbits with Acute Full Depth Chondral Defect: Histological Assessment306

Anexo 4. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Promising Tool in the Treatment of Musculoskeletal Diseases306

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Escala Grimace para conejos.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabla 2. Escala semicuantitativa para la evaluación macroscópica de defectos condrales. ...</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 3. Sistema de evaluación ICRS II.</i>	<i>100</i>
<i>Tabla 4. Escala OARSI para la evaluación histológica del cartílago articular en conejos.</i>	<i>101</i>
<i>Tabla 5. Valores hematológicos de los conejos empleados durante la fase experimental. ...</i>	<i>108</i>
<i>Tabla 6. Valores bioquímicos de los conejos empleados durante la fase experimental.</i>	<i>108</i>
<i>Tabla 7. Evaluación de los niveles séricos de ácido hialurónico.</i>	<i>112</i>
<i>Tabla 8. Estudio comparativo de los niveles séricos de ácido hialurónico entre grupos de tratamiento.</i>	<i>112</i>

<i>Tabla 9. Estudio comparativo de los niveles séricos de ácido hialurónico considerando el factor tiempo.</i>	<i>113</i>
<i>Tabla 10. Evaluación de los niveles séricos del neoepítoto C2C del colágeno.....</i>	<i>115</i>
<i>Tabla 11. Estudio comparativo de los niveles séricos del neoepítoto C2C del colágeno entre grupos de tratamiento.</i>	<i>115</i>
<i>Tabla 12. Estudio comparativo de los niveles séricos de neoepítoto C2C del colágeno considerando el factor tiempo.</i>	<i>116</i>
<i>Tabla 13. Evaluación del color del tejido de reparación.....</i>	<i>120</i>
<i>Tabla 14. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable color del tejido de reparación.</i>	<i>120</i>
<i>Tabla 15. Estudio comparativo entre tiempos de la variable color del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>121</i>
<i>Tabla 16. Evaluación de la presencia de vasos sanguíneos en el tejido de reparación.....</i>	<i>122</i>
<i>Tabla 17. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable presencia de vasos sanguíneos en el tejido de reparación.....</i>	<i>123</i>
<i>Tabla 18. Estudio comparativo entre tiempos de la variable presencia de vasos sanguíneos en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>124</i>
<i>Tabla 19. Evaluación de la superficie de reparación.....</i>	<i>125</i>
<i>Tabla 20. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable superficie del tejido de reparación.</i>	<i>125</i>
<i>Tabla 21. Estudio comparativo entre tiempos de la variable superficie del defecto en los distintos grupos de tratamiento.....</i>	<i>126</i>
<i>Tabla 22. Evaluación del relleno del defecto.....</i>	<i>127</i>
<i>Tabla 23. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable llenado del defecto.....</i>	<i>128</i>
<i>Tabla 24. Estudio comparativo entre tiempos de la variable llenado del defecto en los distintos grupos de tratamiento.....</i>	<i>129</i>
<i>Tabla 25. Evaluación del nivel de degeneración del cartílago articular adyacente.</i>	<i>130</i>

<i>Tabla 26. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable degeneración del cartílago adyacente.....</i>	<i>130</i>
<i>Tabla 27. Estudio comparativo entre tiempos de la variable degeneración del cartílago adyacente en los distintos grupos de tratamiento.....</i>	<i>131</i>
<i>Tabla 28. Evaluación de la puntuación total.....</i>	<i>132</i>
<i>Tabla 29. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable puntuación total.</i>	<i>133</i>
<i>Tabla 30. Estudio comparativo entre tiempos de la variable puntuación total en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>135</i>
<i>Tabla 31. Evaluación de la tinción con safranina O- verde rápido.....</i>	<i>138</i>
<i>Tabla 32. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable tinción con safranina O- verde rápido.</i>	<i>139</i>
<i>Tabla 33. Estudio comparativo entre tiempos de la variable tinción con safranina O- verde rápido en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>140</i>
<i>Tabla 34. Evaluación de la estructura del tejido de reparación.....</i>	<i>141</i>
<i>Tabla 35. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable estructura del tejido de reparación.</i>	<i>141</i>
<i>Tabla 36. Estudio comparativo entre tiempos de la variable estructura del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento.....</i>	<i>142</i>
<i>Tabla 37. Evaluación de la densidad de condrocitos.....</i>	<i>143</i>
<i>Tabla 38. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable densidad de condrocitos.</i>	<i>144</i>
<i>Tabla 39. Estudio comparativo entre tiempos de la variable densidad de condrcitos en los distintos grupos de tratamiento.....</i>	<i>145</i>
<i>Tabla 40. Evaluación de la formación de agrupaciones de condrocitos.</i>	<i>146</i>
<i>Tabla 41. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable formación de agrupaciones de condrocitos.</i>	<i>146</i>
<i>Tabla 42. Estudio comparativo entre tiempos de la variable formación de agrupaciones de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento.....</i>	<i>147</i>

<i>Tabla 43. Evaluación global del tejido reparación de los distintos grupos de tratamiento y en los distintos tiempos siguiendo la escala OARSI.....</i>	<i>149</i>
<i>Tabla 44. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable valoración global del tejido de reparación.....</i>	<i>149</i>
<i>Tabla 45. Estudio comparativo entre tiempos de la variable valoración global en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>150</i>
<i>Tabla 46. Evaluación de la tinción de la matriz en el tejido de reparación.....</i>	<i>152</i>
<i>Tabla 47. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable tinción de la matriz del tejido de reparación.....</i>	<i>152</i>
<i>Tabla 48. Estudio comparativo entre tiempos de la variable tinción de la matriz en los distintos grupos de tratamiento.....</i>	<i>153</i>
<i>Tabla 49. Evaluación de la morfología celular en el tejido de reparación.</i>	<i>154</i>
<i>Tabla 50. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable morfología celular en el tejido de reparación.....</i>	<i>154</i>
<i>Tabla 51. Estudio comparativo entre tiempos de la variable morfología celular en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>155</i>
<i>Tabla 52. Evaluación de la agrupaciones de condrocitos en el tejido de reparación.....</i>	<i>156</i>
<i>Tabla 53. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable agrupaciones de condrocitos en el tejido de reparación</i>	<i>157</i>
<i>Tabla 54. Estudio comparativo entre tiempos de la variable agrupaciones de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>158</i>
<i>Tabla 55. Evaluación de la arquitectura de la superficie en el tejido de reparación.....</i>	<i>159</i>
<i>Tabla 56. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable arquitectura de la superficie del tejido de reparación</i>	<i>159</i>
<i>Tabla 57. Estudio comparativo entre tiempos de la variable arquitectura de la superficie en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>160</i>
<i>Tabla 58. Evaluación de la integración basal en el tejido de reparación.....</i>	<i>161</i>
<i>Tabla 59. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable integración basal del tejido de reparación.....</i>	<i>162</i>

<i>Tabla 60. Estudio comparativo entre tiempos de la variable integración basal en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>163</i>
<i>Tabla 61. Evaluación de la formación de tidemark en el tejido de reparación.</i>	<i>164</i>
<i>Tabla 62. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable formación de tidemark en el tejido de reparación.</i>	<i>164</i>
<i>Tabla 63. Estudio comparativo entre tiempos de la variable formación de tidemark en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>165</i>
<i>Tabla 64. Evaluación de las anomalías en el hueso subcondral.</i>	<i>166</i>
<i>Tabla 65. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable anomalías en el hueso subcondral.</i>	<i>167</i>
<i>Tabla 66. Estudio comparativo entre tiempos de la variable anomalías en el hueso subcondral en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>167</i>
<i>Tabla 67. Evaluación de la inflamación en el tejido de reparación.</i>	<i>169</i>
<i>Tabla 68. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable inflamación en el tejido de reparación.</i>	<i>169</i>
<i>Tabla 69. Estudio comparativo entre tiempos de la variable inflamación en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>170</i>
<i>Tabla 70. Evaluación de la calcificación en el tejido de reparación.</i>	<i>171</i>
<i>Tabla 71. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable calcificación en el tejido de reparación.</i>	<i>171</i>
<i>Tabla 72. Estudio comparativo entre tiempos de la variable calcificación en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>172</i>
<i>Tabla 73. Evaluación de la presencia de vascularización en el tejido de reparación.</i>	<i>173</i>
<i>Tabla 74. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable vascularización en el tejido de reparación.</i>	<i>173</i>
<i>Tabla 75. Estudio comparativo entre tiempos de la variable vascularización en el tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento.</i>	<i>174</i>
<i>Tabla 76. Evaluación de la superficie del tejido de reparación.</i>	<i>175</i>

Tabla 77. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable valoración de la superficie del tejido de reparación. 176

Tabla 78. Estudio comparativo entre tiempos de la variable valoración de la superficie del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento. 177

Tabla 79. Valoración de la zona media y profunda del tejido de reparación..... 178

Tabla 80. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable valoración de la zona media y profunda del tejido de reparación..... 178

Tabla 81. Estudio comparativo entre tiempos de la variable valoración de la zona media y profunda del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento..... 179

Tabla 82. Valoración global del tejido de reparación. 180

Tabla 83. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable valoración global del tejido de reparación..... 181

Tabla 84. Estudio comparativo entre tiempos de la variable valoración global del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento. 184

Índice de Figuras

<i>Imagen 1. Diagrama de un corte transversal del cartilago articular sano.</i>	<i>17</i>
<i>Imagen 2. Infografía de la osteoartritis</i>	<i>26</i>
<i>Imagen 3. Aumento de la prevalencia de OA en algunas potencias europeas desde 1990 hasta 2019 y millones de personas afectadas por la OA en el año 2019</i>	<i>27</i>
<i>Imagen 4. Primera etapa de la patogénesis de la osteoartrosis.....</i>	<i>31</i>
<i>Imagen 5. Diagrama de la unidad osteocondral.....</i>	<i>32</i>
<i>Imagen 6. Técnica de microfracturas.....</i>	<i>58</i>
<i>Imagen 7. Técnica de la mosaicoplastia.</i>	<i>60</i>
<i>Imagen 8. Trasplante de condrocitos autólogos.....</i>	<i>61</i>

<i>Imagen 9. Origen y diferenciación de las células madre mesenquimales.....</i>	<i>70</i>
<i>Imagen 10. Proceso de obtención y procesado del plasma rico en plaquetas.....</i>	<i>78</i>
<i>Imagen 11. Extracción sanguínea para la obtención del PRGF.....</i>	<i>91</i>
<i>Imagen 12. Procesado del Plasma Rico en Factores de Crecimiento</i>	<i>92</i>
<i>Imagen 13. A, creación del defecto condral de espesor completo en el cóndilo femoral medial. B, apariencia macroscópica del defecto.....</i>	<i>95</i>
<i>Imagen 14. Infiltración intraarticular e intraósea.....</i>	<i>96</i>
<i>Imagen 15. Evaluación de la concentración sérica de HA en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	<i>114</i>
<i>Imagen 16. Evaluación de la concentración sérica de C2C en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	<i>117</i>
<i>Imagen 17. Evaluación del color del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	<i>122</i>
<i>Imagen 18. Evaluación de la presencia de vasos sanguíneos en el tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.....</i>	<i>124</i>
<i>Imagen 19. Evaluación de la superficie del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	<i>127</i>
<i>Imagen 20. Evaluación del llenado del defecto en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	<i>129</i>
<i>Imagen 21. Evaluación del cartílago articular adyacente al defecto en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	<i>132</i>
<i>Imagen 22. Evaluación macroscópica de los defectos osteocondrales 56 y 84 días tras la cirugía.....</i>	<i>134</i>
<i>Imagen 23. Evaluación global del defecto a nivel macroscópico en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	<i>135</i>
<i>Imagen 24. Evaluación de la tinción con safanina O -verde rápido en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio</i>	<i>140</i>
<i>Imagen 25. Evaluación de la estructura del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	<i>143</i>

<i>Imagen 26. Evaluación de la densidad de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	145
<i>Imagen 27. Evaluación de la formación de agrupaciones de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	148
<i>Imagen 28. Evaluación global del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio siguiendo la escala OARSI.</i>	150
<i>Imagen 29. Evaluación de la tinción de la matriz en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	153
<i>Imagen 30. Evaluación de la morfología celular en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	156
<i>Imagen 31. Evaluación de la formación de agrupaciones de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio</i>	158
<i>Imagen 32. Evaluación de la arquitectura de la superficie del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	161
<i>Imagen 33. Evaluación de la integración basal del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio</i>	163
<i>Imagen 34. Evaluación de la formación de la línea de marea en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	166
<i>Imagen 35. Evaluación de las anomalías del hueso subcondral en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	168
<i>Imagen 36. Evaluación de la inflamación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	170
<i>Imagen 37. Evaluación de la calcificación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	172
<i>Imagen 38. Evaluación de la vascularización en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	175
<i>Imagen 39. Valoración de la zona superficial en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	177
<i>Imagen 40. Valoración de las zonas media y profunda del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.</i>	180

Imagen 41. Apariencia histológica del tejido de reparación teñido con Safranina O-Verde rápido. 182

Imagen 42. Apariencia histológica de tejido reparación teñido con Hematoxilina-Eosina... 183

Imagen 43. Valoración general tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio..... 184

Listado Abreviaturas

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Listado de abreviaturas

A continuación, se detallan todas las abreviaturas que aparecen a lo largo del documento:

- AAOS: Asociación Americana de Cirujanos Ortopédicos.
- AC: Cartílago articular.
- ACI: Trasplante de condrocitos autólogos.
- ACR: Colegio Americano de Radiólogos.
- AD: Desbridamiento artroscópico.
- AMSCs: Células madre mesenquimales derivadas de la grasa.
- ASCs: Células madre adultas.
- BDGF: Factor de crecimiento derivado del hueso.

- BMLs: Lesiones de la médula ósea.
- BMSCs: Células Mesenquimales de la Medula Ósea.
- CBPI: Canine Brief Pain Inventory.
- CCL2: Ligando 2 de las quimiocinas.
- COI: Canine Brief Pain Inventory.
- Col-2-1: Fragmento de la degradación del colágeno tipo II.
- Col 2-1NO2: Forma nitrogenada del fragmento de la degradación del colágeno tipo II.
- COMP: Proteína oligomérica del cartílago.
- COX-2: Ciclooxygenasa 2.
- CT: Control.
- CTX-II: Telopéptido C-terminal del colágeno tipo II.
- CXCL12: Ligando 12 de la quimiocina CXC.
- C2C: Neoepítipo de la degradación del colágeno tipo II.
- ESCs: Células madre embrionarias.
- ESWT: Terapia con ondas de choque extracorpóreas.
- EULAR: Liga Europea Contra el Reumatismo.
- FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.
- FNIH: Foundation for the National Institutes of Health.
- GF: Factor de crecimiento.
- HA: Ácido hialurónico.
- HGF: Factor de crecimiento hepático.
- HOOS: Hip Osteoarthritis Outcome Score.
- HVAS: Escala Analógica Visual de Hudson.
- IA: Intraarticular.
- IFN- γ : Interferón gamma.
- IGF-I: Factor de crecimiento insulínico tipo 1.
- IKDC: Cuestionario del comité internacional de documentación de la rodilla.
- IL: Interleucinas.
- IM: Intramuscular.

- IO: Intraóseo.
- IPSCs: Células madre pluripotentes inducidas.
- IV: Intravenoso.
- JSN: Estrechamiento del espacio articular.
- JSW: Anchura del espacio articular.
- KL: Kellgren-Lawrence.
- KOOS: Knee Osteoarthritis Outcome Scale.
- KSS: Knee Society Score.
- LOAD: Liverpool Osteoarthritis in Dogs.
- L-PRP: PRP rico en leucocitos.
- LT: Terapia con láser.
- MACI: Trasplante de Condrocitos Autólogos Guiado por Matriz.
- MEC: Matriz extracelular.
- MFx: Microfracturas.
- MMP: Metaloproteasas.
- MOCART: Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue.
- MSCs: Células madre mesenquimales.
- NMES: Electroestimulación neuromuscular.
- OA: Osteoartritis.
- OARSI: Osteoarthritis Research Society International.
- OAT: Injerto Osteocondral Autólogo.
- OCAT: Aloinjerto Osteocondral.
- PCR: Proteína C-reactiva.
- P-PRP: PRP pobre en leucocitos.
- PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento.
- PROMS: Patient reported outcome measures.
- PRP: Plasma rico en plaquetas.
- PVF: Pico de fuerza vertical.
- PIIANP: Propéptido- N.
- PIICP: Propéptido-C.
- RM: Resonancia magnética.

- ROS: Especies reactivas del oxígeno.
- SB: Hueso subcondral.
- SBA: Artroplastia por abrasión del hueso subcondral.
- SBD: Forage subcondral.
- SBMLs: Lesiones medulares del hueso subcondral.
- SBP: Lámina cortical subcondral.
- SC: Subcutáneo.
- SF: Líquido sinovial.
- SM: Membrana sinovial.
- SMSCs: Células mesenquimales derivadas de la membrana sinovial.
- STB: Hueso subcondral trabecular.
- TAC: Tomografía axial computarizada.
- TENS: Electroestimulación nerviosa transcutánea.
- TGF- β : Factor de crecimiento transformante- β .
- TIMP1: Inhibidor de metalopeptidasas.
- TLR: Receptores tipo toll.
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α .
- TRT: Tratamiento.
- UCSCs: Células mesenquimales derivadas del cordón umbilical.
- UT: Ultrasonido terapéutico.
- VAS: Escala analógica visual.
- VI: Impulso vertical.
- VEGF: Factor de crecimiento endotelio vascular.
- WOMAC: Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index.
- WORMS: Whole Organ Magnetic Resonance Imaging Score.

Introducción

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Introducción

Las lesiones en el cartílago articular (AC) son frecuentes y de etiología multifactorial. Entre las causas más comunes se incluyen las traumáticas, con la posterior disrupción de la superficie del cartílago. Dada la escasa capacidad regenerativa de este tejido, si las lesiones focales no se tratan adecuadamente, el defecto aumentará de tamaño y espesor, llegando a ocasionar en última instancia la degeneración generalizada de la superficie articular y osteoartritis (OA) [1]. La OA es una enfermedad que ha acompañado a la humanidad desde los inicios; se han encontrado restos de articulaciones con OA en momias del Antiguo Egipto, y la patología aparece descrita por primera vez en tratados médicos romanos. Para ser más precisos, podríamos decir que la OA precede a la humanidad, ya que se han encontrado evidencias de lesiones degenerativas en articulaciones de dinosaurios y aves del Cretácico temprano [2].

Hoy en día la OA supone un grave problema de salud pública dada su elevada incidencia y morbilidad, tanto en medicina humana como veterinaria. El AC tienen una capacidad intrínseca de cicatrización limitada puesto que se trata de un tejido altamente diferenciado, avascular, aneural y alinfático [3,4]. Además, la escasa regeneración del AC puede atribuirse a la elevada densidad de la matriz extracelular (MEC), que impide que las células migren desde zonas adyacentes [5]. Esto hace evidente la necesidad de encontrar agentes terapéuticos que faciliten la cicatrización y regeneración del AC.

Convencionalmente, la degeneración articular se ha tratado con fármacos dirigidos a aliviar el dolor, reducir la inflamación y por tanto mejorar la funcionalidad de la articulación afectada. Por otro lado, las opciones quirúrgicas quedan reservadas a pacientes graves en los que el manejo farmacológico es insuficiente [6]. La Administración de Alimentos y Medicamentos reconoce la OA como una enfermedad grave para la que existe una necesidad urgente de encontrar estrategias terapéuticas que modifiquen el curso y la progresión, así como que sean capaces de regenerar el AC dañado [7]. Esto explica el enorme esfuerzo que se ha realizado durante los últimos 20 años para definir mejor la etiopatogenia de la OA e identificar nuevas aproximaciones terapéuticas. Con este fin, agentes biológicos como el plasma rico en plaquetas (PRP) y las células madre mesenquimales (MSCs) han suscitado el interés de clínicos e investigadores [8,9].

El PRP fue el primer producto autólogo, derivado de la sangre que se utilizó y, después de más de una década existe evidencia sólida del papel que desempeñan los factores de crecimiento de las plaquetas en el tratamiento de la OA. Sin embargo, sigue habiendo una falta de estandarización en los procesos de obtención del PRP, lo que resulta en una mayor variabilidad de resultados. En cualquier caso, la mayoría de las investigaciones apuntan a que el PRP es un producto seguro que proporciona alivio del dolor y mejora de la funcionalidad en pacientes con OA, y puede por tanto considerarse una alternativa válida a tratamientos convencionales que proporcionan peores resultados a largo plazo [10-12].

Las MSCs se han empezado a usar más recientemente para tratar la OA, más concretamente las células madre mesenquimales derivadas de la grasa (AMSCs) o las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMSCs). En este campo también existe una gran variabilidad debido a los distintos orígenes, técnicas de cultivo y posterior manipulación de las poblaciones celulares, las dosis y los protocolos terapéuticos. En líneas generales, se ha observado que las MSCs promueven la regeneración tisular y reducen los síntomas asociados a la osteoartritis [13,14].

La aplicación de estas terapias regenerativas varía desde la inyección intraarticular (IA), al empleo de coágulos, injertos o mallas que van asociados a otras técnicas quirúrgicas. Cualquiera de estas técnicas de aplicación va dirigida principalmente al tratamiento de la superficie del AC, por lo que, en pacientes graves, en los que las capas más profundas del cartílago y el hueso subcondral (SB) están dañadas, pierden potencial terapéutico [1]. Para sobreponerse a esta limitación, recientemente algunos autores han propuesto la inyección intraósea (IO) de MSCs o PRP con el objetivo de tratar las lesiones del SB [15-19].

Esta es la línea de trabajo que persigue la presente tesis doctoral, cuyo objetivo es evaluar, de forma objetiva, el efecto de la infiltración IO de PRP y AMSCs en defectos condrales agudos y de espesor completo en un modelo experimental en conejos. Con este fin, se ha realizado el estudio de dos biomarcadores asociados a OA, el ácido hialurónico (HA) y el neoepítipo C2C del colágeno (C2C); y la evaluación macroscópica e histológica de los defectos condrales.

Hipótesis y Objetivos

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Hipótesis de Trabajo

Considerando los resultados obtenidos por otros autores en el tratamiento de lesiones condrales con PRGF, AMSCs y la asociación de ambos tratamientos, nuestra hipótesis de trabajo es que la infiltración IA de PRGF combinada con la infiltración IO de PRGF, AMSCs o la asociación de PRGF y AMSCs en lesiones condrales agudas de espesor completo, ralentizará el proceso de degeneración condral y favorecerá la regeneración del tejido dañado en mayor medida que la infiltración IA de PRGF por sí sola. Esto se verá reflejado en la concentración sérica de los biomarcadores de sinovitis y degeneración del colágeno articular, HA y C2C respectivamente; la evaluación macroscópica del tejido de reparación formado; y el análisis de la estructura, organización y composición histológica del tejido de reparación. Además, cabe destacar que se espera obtener mejores resultados en el grupo en el que se administra de forma

IO una asociación de PRGF con AMSCs. Por último, cabe esperar que, a medida que avanza el proceso de regeneración condral, las diferencias entre los distintos grupos de tratamiento sean más evidentes.

Objetivos

Con la hipótesis de trabajo anteriormente expuesta, nos planteamos un estudio experimental con el objetivo general de evaluar el efecto de la aplicación intraósea de PRGF y AMSCs en el tratamiento de lesiones condrales agudas de espesor completo en un modelo experimental en conejo. Para alcanzar este objetivo principal han sido propuestos los siguientes objetivos secundarios:

1. Evaluar el grado de degeneración del cartílago articular y de sinovitis tras la administración intraósea de plasma rico en factores de crecimiento, células madre mesenquimales derivadas de la grasa y la combinación de ambos en conejos con lesión osteocondral aguda mediante el análisis de

la concentración sérica de ácido hialurónico y neoepítipo C2C del colágeno a lo largo de diferentes tiempos de estudio.

2. Valorar, teniendo en cuenta la apariencia macroscópica de la lesión osteocondral, la efectividad del tratamiento intraóseo con plasma rico en factores de crecimiento, células madre mesenquimales derivadas de la grasa o la combinación de estos.
3. Evaluar la estructura, organización y composición celular a nivel histológico del tejido de reparación formado en el área de la lesión osteocondral y adyacente a la misma tras la infiltración intraósea de plasma rico en factores de crecimiento, células mesenquimales derivadas de la grasa o la combinación de plasma rico en factores de crecimiento junto con células mesenquimales derivadas de la grasa.

Revisión Bibliográfica

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Cartílago Articular

Estructura y función del cartílago articular

El AC es un tejido conectivo altamente especializado, de entre 2 y 4 mm de grosor, presente en las articulaciones diartrodiales y que se caracteriza por la ausencia de inervación y de vasos sanguíneos y linfáticos [20]. La función principal del AC es transmitir las fuerzas entre dos extremos óseos minimizando la fricción entre las superficies articulares. Además, se encarga de proveer lubricación a la articulación, absorber los impactos y proporcionar resistencia al desgaste de las superficies articulares [21].

Está compuesto de una MEC densa, en la que se distribuyen las células especializadas, los condrocitos. La MEC se compone fundamentalmente de agua,

colágeno, proteoglicanos y otras proteínas no colágenas y glicoproteínas presentes en menores cantidades. El conjunto de estos componentes ayuda a retener el agua en la MEC, lo que es vital en el mantenimiento de las propiedades mecánicas del AC [22]

Zonas del cartílago articular

En función de la distribución de las fibras de colágeno en la MEC y de la morfología y disposición de los condrocitos, se diferencian varias zonas en el AC: zona superficial o tangencial, zona intermedia o de transición, zona profunda o radial y zona calcificada (Imagen 1). Además, en cada una de estas zonas, se identifican tres regiones: región pericelular, región territorial y región interterritorial [23].

La **zona superficial o tangencial** es una capa fina, que supone entre el 10% y el 20% del grosor total del cartílago. La *lamina splendens* es la capa más superficial y está formada por fibras de colágeno muy finas. La capa más profunda está compuesta por condrocitos pequeños y planos y fibras de colágeno tipo II y tipo IX, que se disponen en paralelo a la superficie articular. La zona superficial contiene fibronectina en abundancia, pero los proteoglicanos son relativamente escasos. Además, los condrocitos de esta zona sintetizan lubricina, la proteína responsable de que no exista fricción en la articulación. Por otro lado, esta zona desempeña un papel muy importante protegiendo a las capas más profundas del cartílago de las cargas de tensión y de cizallamiento ejercidas durante los movimientos articulares [24].

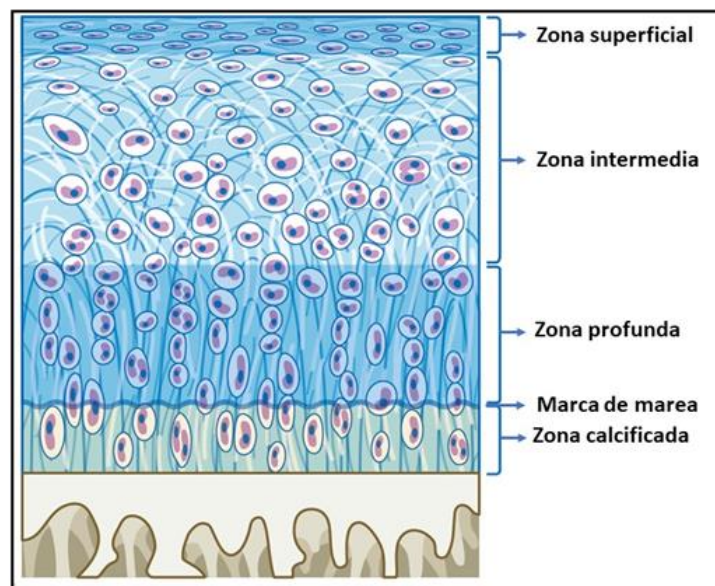
La zona inmediatamente inferior es la **zona intermedia o de transición**. Es la más gruesa de todas y supone entre el 40% y el 60% del espesor total del AC. Los condrocitos en esta zona son escasos, más grandes que en la zona superficial, de forma redondeada y se encuentran rodeados de MEC rica en agregano, el proteoglicano más abundante en el AC. Las fibras de colágeno de la zona de transición son más gruesas y se distribuyen de forma oblicua a lo largo de la MEC. A nivel funcional, esta zona proporciona resistencia frente a las cargas de compresión [25].

La **zona profunda o radial** representa alrededor del 30% del volumen del AC y se sitúa entre la zona intermedia y la zona calcificada. En esta zona los condrocitos se disponen en columnas, paralelos a las fibras de colágeno y perpendiculares a la

superficie articular. La concentración de proteoglicanos, especialmente agregano, es muy alta, sin embargo, es la capa con menos volumen de agua. La cantidad de fibras de colágeno es inferior a la de la zona intermedia, aunque éstas son más gruesas y se disponen perpendicularmente a la superficie articular. Junto con la zona intermedia, proporciona al AC resistencia frente a las cargas de compresión [20].

Separando la zona profunda de la zona calcificada se encuentra la línea de marea o “*tide mark*”, que impide que los vasos sanguíneos del SB lleguen a las capas superiores del AC. La **zona calcificada** supone alrededor del 5-10% del espesor del cartílago y posee propiedades mecánicas intermedias entre el cartílago no calcificado y SB, actuando como una zona de transición. Es una zona pobre en proteoglicanos y los condrocitos presentes en esta zona están hipertróficos y son los encargados de sintetizar fibras de colágeno tipo X, que se anclan al SB [24,25].

Imagen 1. Diagrama de un corte transversal del cartílago articular sano.



Adaptado de: Guía SERVET de Manejo Clínico Osteoartritis [26].

Condrocitos y matriz extracelular

Los condrocitos son las células residentes del AC, altamente especializadas y metabólicamente activas. Se originan a partir de las células mesenquimales y constituyen aproximadamente el 2% del volumen total del AC, pero son las únicas

responsables de la síntesis, degradación y remodelado del AC. Estas células varían en número, forma y tamaño dependiendo de la zona anatómica en la que se localicen. Los condrocitos de la zona superficial tienden a ser elípticos, mientras que en las capas más profundas adquieren forma esférica. Además, en las capas superficiales la densidad es mayor que en la zona profunda [27]. Los condrocitos están completamente rodeados por la MEC que ellos mismos generan, y que evita que la célula migre a zonas de cartílago adyacente. Además de desempeñar un papel clave en el desarrollo, mantenimiento y reparación de la MEC, se encargan también de sintetizar los proteoglicanos, las glicoproteínas y el colágeno. Estas células raramente se comunican entre ellas, sin embargo, son capaces de responder a una gran variedad de estímulos, entre los que se incluyen los factores de crecimiento (GF), las cargas mecánicas y la presión hidrostática, y, por tanto, la composición y características del AC puede variar en función de dichos estímulos [28]. Los condrocitos tienen un potencial de replicación limitado, lo que contribuye a la escasa capacidad de reparación intrínseca del AC en respuesta a una lesión [20].

La MEC está compuesta en su mayoría por agua (65-80% del peso total del cartílago). El segundo componente más abundante es el colágeno de tipo II (50-70% del peso seco del AC), que forma fibras orientadas de tal forma que confieren al cartílago su resistencia característica a las fuerzas mecánicas [29]. Además, se distinguen en menores cantidades otras moléculas, incluyendo proteoglicanos, otros tipos de colágeno, lípidos, fosfolípidos, proteínas no colágenas y glicoproteínas. En la MEC del cartílago se distinguen diferentes regiones en función de la proximidad a los condrocitos, la composición y la disposición de las fibras de colágeno [30].

La **región pericelular** es una capa fina (aproximadamente 2 μm), adyacente a la membrana celular del condrocito, al que rodea por completo. Esta región contiene principalmente proteoglicanos, como decorina y agregano, así como algunas glicoproteínas y proteínas no colágenas como la ancorina y fibronectina. En esta zona se distingue también HA, cuya función es la adherencia de los proteoglicanos sintetizados. Las fibras de colágeno son escasas en esta región, siendo el colágeno tipo VI el predominante. La **región territorial** rodea la matriz pericelular y es más extensa que la anterior. Se compone principalmente de fibras de colágeno muy finas, que

forman una red alrededor de los condrocitos. Esta región es la encargada de proteger a los condrocitos del estrés mecánico y contribuye en la capacidad del AC para soportar grandes cargas. Por último, la **región interterritorial** es la más grande de las tres y la que contribuye en mayor medida a las propiedades biomecánicas del AC. En esta región, se pueden apreciar agregados de proteoglicanos y productos de la degradación del agregano. Las fibras de colágeno (predominantemente colágeno tipo II) son más grandes y se agrupan formando haces que se distribuyen en paralelo a la superficie en la zona superficial, oblicuas a la superficie en la zona intermedia, y perpendiculares a la superficie en la zona profunda [31-33].

El **agua** es el componente más abundante del AC y contribuye entorno al 80% del peso húmedo. La concentración relativa pasa de ser del 80% en la zona superficial al 65% en la zona profunda. La mayor parte de esta agua se encuentra asociada al espacio interfibrilar, entre las fibras de colágeno, y una pequeña cantidad se encuentra en el espacio intracelular de los condrocitos. Además, disueltos en el agua interfibrilar existe una gran cantidad de cationes inorgánicos, como el sodio, el calcio y el potasio; y en cantidades mucho menores aniones inorgánicos como el cloro, los cuales intervienen en el flujo de agua en la MEC. El flujo de agua existente en el AC aporta lubricación al tejido e interviene en el transporte y distribución de los nutrientes hacia los condrocitos y de las sustancias de deshecho hacia el exterior del tejido, manteniendo así la homeostasis [34,35].

El **colágeno** es la macromolécula estructural más abundante en la MEC, y supone en torno al 60% del peso seco del cartílago. El colágeno tipo II es el más abundante en el AC (aproximadamente el 80%) y forma fibrillas y fibras que se entrelazan con agregados de proteoglicanos. Es el responsable de proveer una alta resistencia a la compresión cíclica. En la matriz se pueden distinguir también, aunque en menor proporción, fibras de colágeno tipo VI, IX, X y XI. El colágeno tipo VI supone aproximadamente el 5% del total del colágeno en el AC, se concentra mayoritariamente en la región pericelular y ayuda a que los condrocitos se fijen a la MEC. El colágeno tipo IX constituye aproximadamente el 15% del total del colágeno y su función es facilitar la interacción entre las fibrillas de colágeno y los proteoglucanos. El colágeno tipo X desempeña un papel fundamental en el soporte estructural del cartílago articular. Se localiza

principalmente entre la zona profunda y la zona calcificada, donde organiza las fibrillas de colágeno en una red hexagonal tridimensional, y compone alrededor del 5% del total de colágeno. Por último, el colágeno tipo XI supone el 15% del colágeno articular y se encarga de regular el tamaño de las fibrillas que forman la región pericelular del condrocito y permitir la producción de colágeno tipo II [36]. Todos los tipos de colágeno están formados por 3 cadenas polipeptídicas (cadenas α) que se unen y estabilizan mediante puentes de hidrógeno, dando lugar a una triple hélice. Los aminoácidos principales en la composición de las cadenas polipeptídicas son la glicina, la prolina y la hidroxiprolina. Esta estructura en triple hélice de las cadenas polipeptídicas aporta al cartílago las propiedades tensiles características de este tejido [20,37].

Los proteoglicanos representan el segundo grupo más grande de macromoléculas de la MEC y constituyen aproximadamente entre el 5% y el 10% del peso húmedo. Están formados por un núcleo proteico con una o más cadenas lineales de glucosaminoglicanos unidos mediante enlaces covalentes. Debido a su carga negativa, atrae cationes de sodio y por ende a las moléculas de agua, hidratando así la MEC. Los proteoglicanos pueden variar en tamaño, encontrando moléculas pequeñas como el biglicano, la decorina y la fibromodulina (10% de los proteoglicanos presentes en el AC), hasta moléculas más grandes como el agrecano, que representa el 90% de los proteoglicanos. El agrecano está formado por más de 100 moléculas de condroitín sulfato y 30 moléculas de keratán sulfato unidas a una proteína central, que, al mismo tiempo, se une al HA por medio de proteínas de anclaje formando agregados de proteoglicanos [38,39]. La principal función del agrecano es atrapar y mantener agua para aportarle resistencia al cartílago. Además, su gran tamaño hace que se quede atrapado entre las fibras de colágeno, y gracias a su carga negativa, atrae moléculas de agua creando una presión osmótica alta, garantizando así la hidratación del tejido [40]. La decorina y la fibromodulina interactúan con las fibras de colágeno tipo II en la MEC e intervienen en la interacción entre fibras, mientras que el biglicano se encuentra principalmente en la región pericelular, normalmente adherido a las fibras de colágeno tipo VI [41].

En la MEC se distinguen también distintos tipos de **glicoproteínas y proteínas no colágenas**, entre las que se incluyen la proteína oligomérica del cartílago (COMP), la

fibronectina, la ancorina CII, la laminina y las integrinas. La COMP se localiza principalmente en la región pericelular e interviene en el crecimiento, proliferación y fijación de las células en su entorno. La fibronectina se localiza también en la región pericelular y permite la unión del condrocito a la MEC y la interacción del condrocito con el colágeno tipo II. La ancorina CII se localiza en la superficie del condrocito y lo ancla a las fibras de colágeno de la MEC. La laminina está presente en la membrana basal de los condrocitos y permite la unión entre éstos. Por último, la interacción de todas estas glicoproteínas y proteínas no colágenas con los condrocitos se realiza por medio de las integrinas [21,42].

La interacción entre el colágeno, los proteoglicanos, las glicoproteínas y proteínas no colágenas y el agua se da a través de la presión osmótica de Donnan, que regula la organización de la estructura de la MEC y sus propiedades mecánicas. Además, cuando se aplican cargas en el tejido, el agua puede desplazarse por la MEC libremente, controlándose así la mecánica y la lubricación de la articulación [43].

Metabolismo del cartílago articular

Dada la escasa celularidad del AC, su actividad metabólica es muy baja. Sin embargo, los condrocitos son células metabólicamente muy activas, son los responsables del desarrollo, mantenimiento y reparación de la MEC y de todas las macromoléculas presentes en ella. La actividad metabólica de los condrocitos puede verse alterada por distintos estímulos, entre los que se incluyen agentes farmacológicos, componentes de la MEC, cambios en la presión hidrostática y cargas mecánicas [44]. Por otro lado, la actividad y funcionalidad de los condrocitos varía a lo largo de la vida. Durante el desarrollo, el AC presenta una densidad celular alta y los condrocitos se dividen y sintetizan rápidamente grandes cantidades de MEC. Cuando se alcanza la madurez, la actividad celular disminuye, la mayoría de los condrocitos dejan de dividirse y la producción de MEC se ralentiza, aunque siguen sintetizando las macromoléculas necesarias para garantizar la estructura de la superficie articular [25].

Por otro lado, en cuanto a la nutrición de los condrocitos, durante el desarrollo y maduración del tejido se nutren mediante difusión desde el SB subyacente. Sin embargo, en los adultos, la matriz del AC se separa de la vascularización subcondral por

medio de la placa ósea subcondral. Por tanto, la nutrición del cartílago articular se produce principalmente por la difusión de los nutrientes desde el líquido sinovial (SF) hacia la MEC. El paso de los nutrientes a través de la MEC depende de la concentración, composición y organización de los proteoglicanos presentes en la MEC, así como del tamaño, la composición y la carga de los nutrientes. Sin un suministro directo de nutrientes desde los vasos sanguíneos o linfáticos, los condrocitos dependen principalmente de un metabolismo anaerobio [45].

El metabolismo homeostático de la MEC regula el proceso de degradación de las distintas macromoléculas que la componen, al mismo tiempo que se sintetizan macromoléculas nuevas que las van reemplazando. Las principales enzimas implicadas en este proceso son las metaloproteasas (MMP) (colagenasas, estromelina y gelatinasa) y las catepsinas (B y D). Existen distintos tipos de colagenasas y todas ellas se encargan de fragmentar las hélices de colágeno. La estromelina degrada el núcleo proteico del agregano, y la gelatinasa degrada el colágeno tipo II y IV y, además, tiene actividad frente a la fibronectina y la elastina. Por otro lado, las catepsinas B y D actúan degradando el agregano [46,47].

Las citocinas proinflamatorias tienen efectos anabólicos y catabólicos que desempeñan un papel importante en la síntesis y degradación de las macromoléculas de la MEC. Entre las citocinas proinflamatorias con efectos catabólicos que más actúan sobre el cartílago articular se encuentran la interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-7 y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). La IL-1 β inhibe la formación de colágeno tipo II y agregano; la IL-6 suprime la producción de agregano e induce efectos catabólicos en el cartílago al estimular el gen MMP-13, encargado de sintetizar colagenasa-3; la IL-7 ejerce su acción estimulando la síntesis de otras citocinas inflamatorias en el AC; y el TNF- α aumenta la producción de colagenasas e induce la apoptosis de los condrocitos, además, es capaz de estimular la producción de IL-1 β [48,49]. Por otro lado, se han estudiado también citocinas antiinflamatorias. La IL-10 favorece la expresión de colágeno tipo II y de proteoglicanos y además facilita la actividad de la hemo oxigenasa-1, una enzima con actividad protectora del cartílago. Por otro lado, la IL-10 es capaz de suprimir la expresión de los genes MMP-3 y MMP-13 inhibiendo la síntesis de colagenasas, así como de reducir la apoptosis de los condrocitos inducida por la IL-1 β y el TNF- α . Otra

citocina con efecto antiinflamatorio es la IL-4, que es capaz de prevenir la producción del TNF- α y de la IL-1 β , disminuyendo así la degradación del cartílago [50-52].

Por otro lado, se ha observado que la movilidad y la carga articular desempeñan un papel importante en el metabolismo del AC, siendo necesarias para el mantenimiento correcto de la estructura y función de este. El estrés mecánico adecuado induce la condrogénesis durante el desarrollo fetal y mantiene la homeostasis del cartílago en adultos [53]

Respuesta a la lesión

Cualquier daño en el cartílago, por pequeño que sea, puede causar la alteración de su composición y por tanto de su función. Entre las causas que más comúnmente causan disfunción del AC se encuentran los impactos fisiológicos repetitivos, traumatismos agudos y lesiones progresivas y degenerativas relacionadas con el envejecimiento [54].

Las lesiones del AC pueden ocurrir en cualquier lugar de la articulación, sin embargo, se ha observado que los defectos en las zonas de carga se comportan de forma ligeramente diferente a las lesiones del resto de la articulación. Indistintamente de la zona en la que se encuentre la lesión, la cascada de eventos que se producen en la MEC tras sufrir un daño es siempre similar: alteración del fenotipo de los condrocitos, seguido de la necrosis o apoptosis de estos; por otro lado, se produce la alteración y pérdida de los proteoglicanos y las fibras de colágeno; seguido de inflamación, degradación y remodelado del AC independientemente de la etiología de la lesión. Sin embargo, el tiempo, orden y la gravedad de la respuesta sí que pueden variar enormemente en función del tipo de defecto articular [55]. Recientemente, se ha comenzado a clasificar las lesiones del AC en biomecánicas o biológicas. En general, los defectos biomecánicos afectan a la zona superficial y dan lugar a fibrilación, erosiones y fisuras. Sin embargo, los defectos biológicos afectan primariamente a la zona intermedia y profunda al inducir cambios en el fenotipo de los condrocitos que originan un trastorno en la MEC [56].

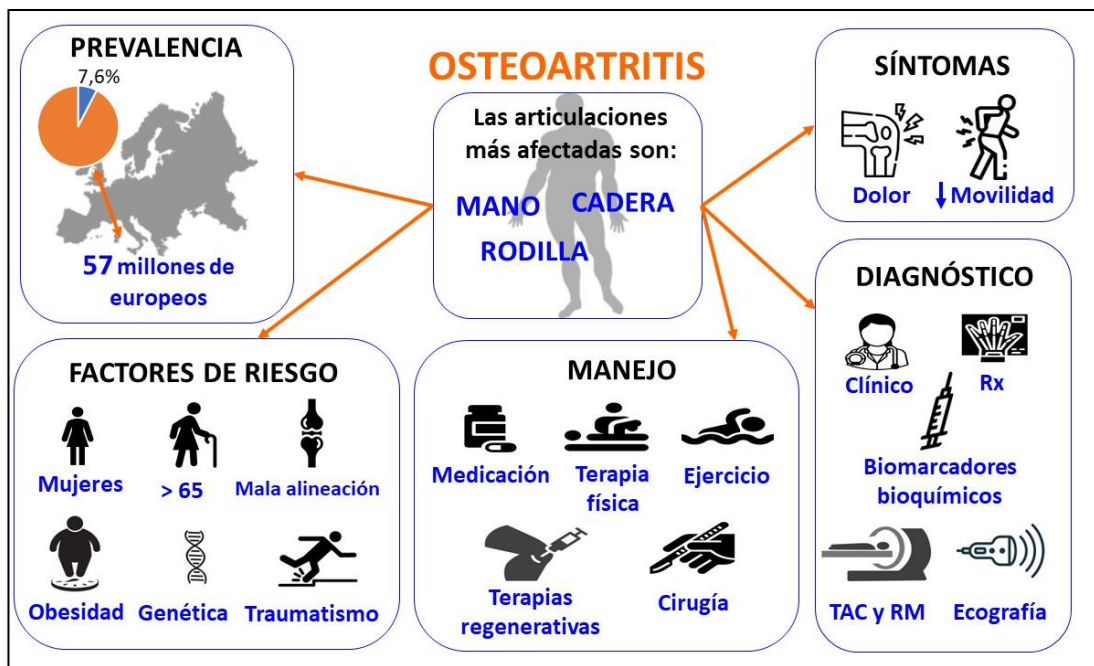
Los defectos articulares de espesor parcial tienen poca o nula capacidad de reparación espontánea, mientras que los de espesor completo, al penetrar en el SB tienen cierto potencial de reparación. Cuando se produce un daño superficial, el metabolismo de los condrocitos se ve alterado, lo que conduce a un descenso de la producción de proteoglicanos y de colágeno de la MEC. Por otro lado, al disminuir la concentración de proteoglicanos aumenta la concentración de agua (hasta el 90%). Este aumento ocasiona un aumento en la permeabilidad y la pérdida de organización de la red fibrilar de colágeno. Estos cambios hacen que el AC pierda sus propiedades viscoelásticas y se produzca un incremento en la transmisión de cargas desde el cartílago al SB, así como un mayor grado de fricción entre las superficies articulares. El aumento en la hidratación, junto con la desorganización de la red de colágeno y la pérdida de tensión en la parte superficial del cartílago es el primer paso en la degeneración progresiva del AC [54,57]. Por el contrario, cuando se produce una lesión de espesor completo existe cierto grado de comunicación del defecto con la médula ósea del SB. Esto desencadena la respuesta de reparación por medio del sangrado y su consiguiente flujo de células al lugar de la lesión, que darán lugar a un hematoma, seguido del coágulo de fibrina y en última instancia a la formación de tejido fibrocartilaginoso de reparación. El fibrocartílago se caracteriza por la presencia de fibroblastos, la menor concentración de proteoglicanos y la predominancia de las fibras de colágeno tipo I, lo que hace que tenga peores propiedades mecánicas que el cartílago hialino. Este tejido de reparación se deteriora rápidamente dejando expuesto al SB de la zona de la lesión. El cartílago circundante se ve sometido a una sobrecarga lo que desemboca en el desarrollo de OA postraumática [56,58,59].

Definición de osteoartritis

La patología del AC con mayor incidencia, que afecta al conjunto de la articulación es la OA. Es una enfermedad musculoesquelética grave que presenta una elevada incidencia, especialmente en países desarrollados [60]. Afecta a todos los tejidos de la articulación, incluyendo el AC, el SB, al SF, la membrana sinovial, los ligamentos y la musculatura [61]. Los síntomas de la OA pueden variar según la gravedad de la patología, pero en los casos más extremos, la OA es una enfermedad dolorosa que restringe la movilidad, interrumpe el sueño, e interfiere con la calidad de vida de quienes la padecen [62] (Imagen 2).

La “*Osteoarthritis Research Society International*” (OARSI) define la OA como una enfermedad que afecta a las articulaciones sinoviales y que se caracteriza por estrés celular y degradación de la MEC del cartílago, y que se inicia con la presencia de micro- y macro lesiones que activan respuestas de reparación mal adaptadas, incluyendo las vías proinflamatorias de la inmunidad innata. En un inicio, la enfermedad se manifiesta como un trastorno molecular (metabolismo anormal del tejido articular), seguido de alteraciones anatómicas y fisiológicas (caracterizadas por la degradación del AC, remodelación ósea, formación de osteofitos, inflamación de la articulación y pérdida de la función articular normal), que culminan en la aparición de la dolencia [63].

Imagen 2. Infografía de la osteoartritis.



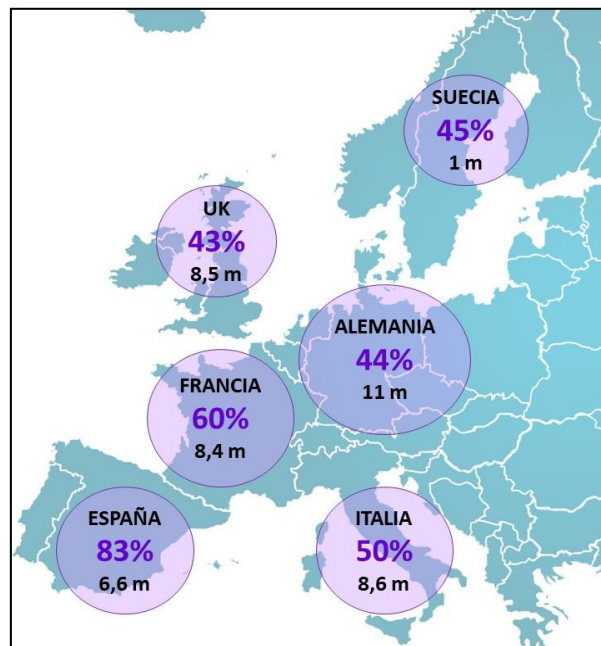
Epidemiología

La OA tiene una prevalencia del 7% a nivel mundial, un total de 528 millones de personas se ven afectadas por dicha patología, e incluso, en países desarrollados en los que existe un claro envejecimiento de la población la prevalencia es aún más alta,

como por ejemplo en Estados Unidos (14%) o España (29.35%) [7,64]. Por otro lado, solo en Europa occidental, 57 millones de personas sufren OA [65].

La prevalencia global de la OA ha aumentado a lo largo de los últimos años (Imagen 3). Desde 1990 hasta 2019 creció en torno al 48%, mientras que, en Europa occidental, en el mismo periodo de tiempo, la incidencia ha aumentado en un 54% [65].

Imagen 3. Aumento de la prevalencia de la osteoartritis en algunas potencias europeas desde 1990 hasta 2019 y millones de personas afectadas por la osteoartritis en el año 2019 [66].



La OA puede producirse en cualquier articulación sinovial, no obstante, la rodilla, la mano y la cadera son las articulaciones más afectadas (365 millones de casos, 142 millones de casos y 33 millones de casos respectivamente) [67].

Entre los factores de riesgo se incluyen la obesidad, la edad, el sexo femenino, traumatismos previos, incongruencia o mala alineación articular, predisposición genética y la falta de masa muscular [68,69]. Por otro lado, se han identificado algunas profesiones estrechamente relacionadas con la presencia de OA, entre los que se incluyen agricultores, albañiles, trabajadores del metal, carpinteros, mineros, empleados del hogar y artesanos [70].

La OA supone una gran causa de discapacidad. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que las personas con OA sufren impedimentos a la hora de realizar tareas de la vida cotidiana y supone la 15ª causa de años vividos con discapacidad o enfermedad [66,71,72]. Un 91% de los pacientes reconoce que la OA limita su capacidad para hacer actividades cotidianas y el 37% ven afectada su vida social; el 84% dice tener dolor o debilidad articular, de los cuales, el 60% afirma tener dolor de moderado a grave; y un 49% reporta que la OA afecta a su trabajo [73]. Esta patología no solo afecta la salud física de las personas que la sufren, sino que también tiene un impacto negativo en su salud mental. Los datos recogidos por la “*Osteoarthritis Initiative*” (OAI) demuestran que las personas con OA de rodilla o cadera están más predispuestas a padecer síntomas de depresión, así como más probabilidades de desarrollar ideas suicidas [74,75]. Por otro lado, cada vez existe mayor evidencia de que la OA es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como el infarto de miocardio [76] o la enfermedad de las arterias coronarias [77,78].

Por otro lado, la OA consume una gran cantidad de recursos sanitarios, tiene también un impacto negativo en la economía debido al bajo rendimiento y al absentismo laboral, así como a las prejubilaciones de quienes la padecen. Se ha demostrado que la patología está asociada con un riesgo más alto de hospitalización y de costes generados en las urgencias hospitalarias [79] y, además, el porcentaje de bajas laborales es significativamente más alto en la población con OA [80]. En Europa, la OA genera unos costes sanitarios directos de 7,2 billones de euros, y 4,6 billones de euros en gastos indirectos, aunque se estima que estos últimos están subestimados y podrían ser 4 veces superiores [81].

Está previsto que la prevalencia de la OA continúe creciendo, en especial en países desarrollados, en los que la esperanza de vida y la incidencia de la obesidad están en aumento [60].

En cuanto a la Medicina Veterinaria, la OA es una de las patologías musculoesqueléticas más diagnosticada en animales de compañía, especialmente en perros, afectando aproximadamente al 20% de los perros mayores de 1 año [82]. La OA canina no solo tienen un gran impacto en el bienestar de los perros, sino que también

supone un gran problema para veterinarios, criadores y propietarios. Estos últimos no solo deben asumir el alto coste de los tratamientos, sino que además tienen que lidiar con el coste emocional que supone tener una mascota con dolor y pérdida de movilidad crónica [83]. La OA primaria en perros se describe como idiopática, aunque se asocia a algunos factores de riesgo como la edad, la obesidad, la raza (por ejemplo, Labrador Retriever, Golden Retriever o Rottweiler), el sexo femenino y al hecho de que estén esterilizados [84,85]. La OA secundaria, producida por traumatismos, cargas anómalas en una articulación normal, o cargas normales en una articulación previamente dañada, representa la forma más común en perros [86]. Las artropatías preexistentes tienen una gran influencia en la patogénesis de la OA, por ejemplo, la ruptura del ligamento cruzado anterior es una de las principales causas de cojera del miembro posterior que puede dar lugar al desarrollo de OA en perros, sin importar la raza o el tamaño [87]. Otro ejemplo es la displasia de cadera y codo, que causan dolor y cojera en perros, y que, con el paso del tiempo, pueden desembocar en el desarrollo de OA [88]. Esto hace que, las articulaciones más frecuentemente afectadas sean la rodilla, seguida del codo y la cadera [82]. En cuanto a la OA felina, se cree que la edad, junto con la obesidad son los factores de riesgo más importantes. Los cambios degenerativos articulares son más significativos en gatos senior, el 90% de los gatos de más de 12 años presenta evidencias radiográficas de la enfermedad, sin embargo, estos cambios degenerativos pueden estar presentes también en gatos muy jóvenes [89-91]. Las articulaciones más frecuentemente afectadas en gatos son el codo y la cadera, seguidas de la rodilla y el tarso. Además, en la columna vertebral, la región torácica, más en concreto T7-T10, es la región afectada con más frecuencia, mientras que la región lumbar o lumbosacra es la que suele presentar lesiones más graves [92-94].

Patogénesis

Durante mucho tiempo, la OA se ha considerado una enfermedad que únicamente afectaba al AC, sin embargo, durante los últimos años se han hecho importantes avances y se ha puesto de manifiesto que la patogénesis de la OA incluye la degeneración progresiva del cartílago junto con cambios estructurales en la articulación al completo [95].

Inicialmente, la OA se produce como respuesta a una alteración en la homeostasis del cartílago que genera la activación del metabolismo catabólico. Con la progresión de la patología, la degradación de los tejidos de la articulación da lugar a la inflamación de la sinovia, remodelación del SB, formación de osteofitos y disminución de la fuerza de la musculatura periarticular. Con el tiempo, estos cambios estructurales se manifiestan con los signos clínicos asociados a la OA [96].

La patogénesis de la OA parece tener tres etapas que se superponen. La primera etapa de la OA implica daño a nivel molecular de la MEC de la zona superficial del cartílago (Imagen 4). Se han determinado muchos factores de riesgo que podrían intervenir en la disrupción de la MEC, entre los que se incluyen la edad, el sedentarismo, la obesidad y fuerzas biomecánicas suprafisiológicas. Además, factores genéticos, metabólicos y biomecánicos también se han asociado con grados de OA más graves [97]. La degeneración de la MEC se produce por la liberación de IL-1 por parte del condrocito y da lugar a la fibrilación del AC y a la aparición de fisuras que, tras recibir cargas continuadas, profundizan hasta llegar al SB. Estos pequeños daños en el SB alteran la distribución de las cargas, por lo que el daño en el AC progresa [98].

Con el tiempo se producen desgarros en la MEC y se libera a la sinovia fragmentos de fibronectina y colágeno tipo II. Las células sinoviales se activan liberando marcadores proinflamatorios (IL-1, el TNF- α , el factor inhibidor de la leucemia y las prostaglandinas E2) para destruir estos fragmentos de la ECM. Los marcadores sinoviales activan a los condrocitos, que producen MMP, óxido nítrico, TNF e IL-1, entre otros en menores concentraciones, iniciando así un círculo vicioso en el que se inhibe la síntesis de proteoglicanos y de colágeno tipo II, con la posterior degradación del AC [99]. Por otro lado, los marcadores proinflamatorios producidos por la sinovia facilitan la llegada de linfocitos y macrófagos al tejido [100].

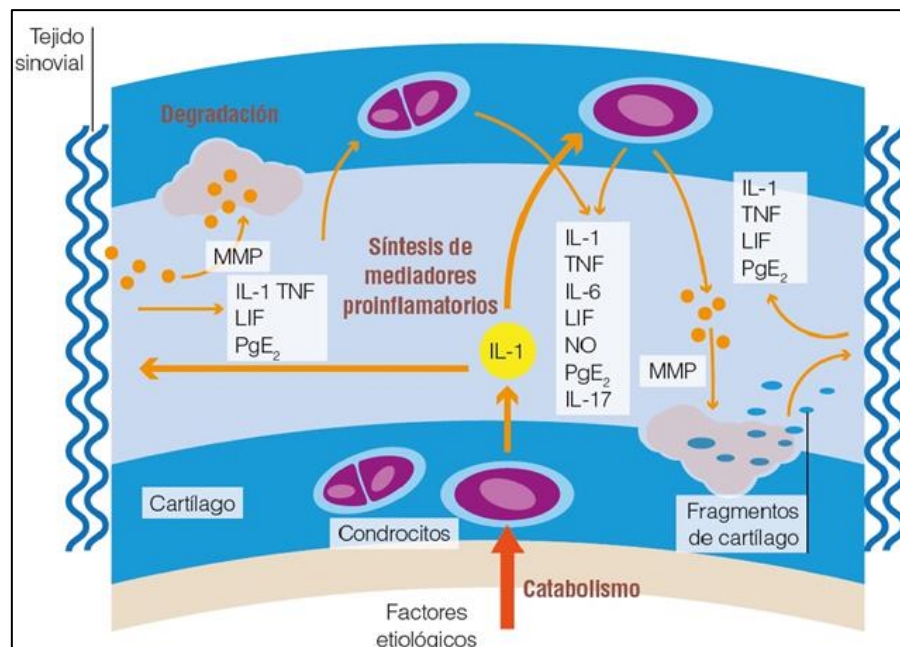
En la segunda etapa de la OA se produce una respuesta al daño articular y subcondral por parte de los condrocitos. En un primer momento, los condrocitos responden con un aumento de actividad anabólica, produciendo colágeno tipo II y citocinas antiinflamatorias como IL-10, IL4, interferón- γ , factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), y factor de crecimiento

fibroblástico (FGF) que se encargan de restaurar la homeostasis en la MEC [101]. Además, los condrocitos producen fosfatasa alcalina, anexinas, y colágeno tipo X, que facilitan la osificación endocondral. Esta respuesta hace que el cartílago sea reemplazado por tejido óseo, empeorando el daño articular mediante la calcificación progresiva y el engrosamiento del SB [102].

Durante la tercera etapa de la OA, los condrocitos no son capaces de satisfacer las necesidades de reparación del cartílago. Se produce un descenso de inhibidores de las citocinas catabólicas y las metaloproteinasas, con el consiguiente aumento en la concentración de éstas. En última instancia, la degeneración continuada del cartílago tiene como resultado la necrosis y apoptosis de los condrocitos [98].

En los últimos años se han identificado numerosas estructuras y mecanismos que desempeñan un papel importante en la patogénesis de la OA entre los que se incluye el SB, la sinovia, la estimulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, los procesos angiogénicos y la formación de osteofitos [39].

Imagen 4. Primera etapa de la patogénesis de la osteoartritis.



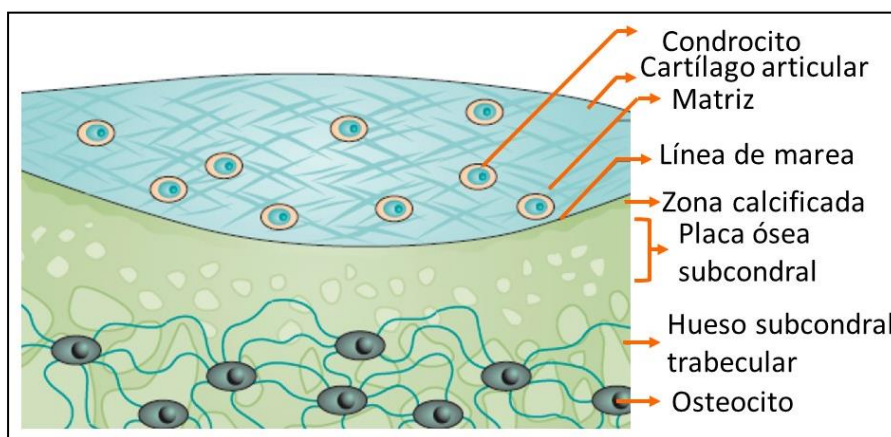
IL: interleucina, LIF: factor inhibidor de la leucemia, MMP: metaloproteasas, NO: óxido nítrico, PgE₂: Prostaglandina E₂, TNF: factor de necrosis tumoral [103].

El hueso subcondral

El SB es el tejido óseo subyacente al AC que está formado por la lámina cortical subcondral (SBP) y el hueso subcondral trabecular (STB). La SBP es una capa fina de hueso cortical que se localiza justo debajo del cartílago calcificado. Aporta resistencia mecánica, sirviendo de apoyo al AC gracias a su densa estructura. Por otro lado, presenta canales de entre 10 y 160 mm de diámetro que permiten el intercambio de nutrientes y moléculas entre el cartílago y el hueso [104]. Seguidamente, bajo la SBP se encuentra el STB, que es más poroso y metabólicamente activo, además, es capaz de modificar su estructura en respuesta a fuerzas mecánicas locales [105]. El SB proporciona un soporte mecánico y nutricional al cartílago, y, por tanto, los cambios en el SB pueden afectar al metabolismo del AC [106].

La unidad osteocondral está formada por el AC, el cartílago calcificado, la SBP y el STB; y su conjunto se encarga de transferir las cargas durante el movimiento articular [107] (Imagen 5). Cuando se produce una lesión en el AC, se rompe la integridad de la unidad osteocondral y aumenta la interacción entre el cartílago y el SB; en consecuencia, el SB comienza a remodelarse como respuesta a cambios mecánicos y biológicos y, a su vez, estos cambios ejercen efectos negativos en el AC [106].

Imagen 5. Diagrama de la unidad osteocondral



Adaptado de Osteoarthritis: New insight on its pathophysiology [108].

Las lesiones de la médula ósea del hueso subcondral (SBMLs) afectan a más de la mitad de los pacientes asintomáticos y su prevalencia parece aumentar con la edad [109], además, estas lesiones están correlacionadas con la agresividad con la que la OA progresa [110]. Las alteraciones del SB en pacientes con OA representan la adaptación del hueso a cambios a nivel biomecánico y biológico que están mediados por distintos tipos celulares. Estas adaptaciones se rigen por la ley de Wolff, que dice que la distribución y las propiedades del hueso están determinadas por las fuerzas aplicadas [111]. Por ello, cuando el SB se ve sometido a una carga excesiva, se producen cambios en la masa ósea y la red trabecular se remodela [105].

Las SBMLs se deben a impactos mecánicos anómalos y persistentes que generan cambios biomoleculares en el SB y dan lugar a la activación de citocinas proinflamatorias. Las SMBLs exhiben una gran actividad metabólica, inflamación, angiogénesis y remodelación ósea. Están asociadas con cambios estructurales que incluyen pérdida de la integridad osteocondral, fibrosis, presencia de quistes, aumento del grosor trabecular y microfracturas subcondrales [112]. A nivel clínico, se ha observado que existe una gran relación entre el incremento de tamaño de las SBMLs y la pérdida de volumen condral en la región correspondiente [95]. Estas lesiones pueden perturbar la integridad de la unidad osteocondral, aumentando así la comunicación entre el SB y el AC, con la consiguiente infiltración de vasos sanguíneos y nervios en el cartílago [113].

La asociación de la OA con las SBMLs es bidireccional. La interrupción de la unión osteocondral debido a la degeneración progresiva sufrida durante la OA, permite la extrusión del SF hacia el SB, causando una respuesta celular por parte del SB. Del mismo modo, los cambios en la arquitectura del SB pueden hacer que aumenten las fuerzas a las que se ve sometido el AC, alterando su homeostasis y activando así el metabolismo catabólico [114]. Por todo lo anterior, recientemente se ha empezado a considerar que la remodelación del SB es un elemento fundamental en la patogénesis de la OA [106].

Sinovitis

La mayoría de los pacientes con OA presentan cierta sinovitis, crucial en el desarrollo y la progresión de la patología. Los mediadores proinflamatorios, como las citocinas y las especies reactivas del oxígeno (ROS), que se producen tanto por los condrocitos como por los sinoviocitos, son los responsables de estimular el metabolismo anabólico del AC y liberar enzimas proteolíticas que degradan la MEC e intervienen en procesos de disrupción de las fibras de colágeno [115]. En los tejidos con OA existe un aumento de citocinas proinflamatorias entre las que se incluyen IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17, IL-18, TNF- α y el factor inhibidor de la leucemia [101]. Por otro lado, las ROS y los niveles de estrés oxidativo se elevan en pacientes con OA y la producción prolongada de ROS se considera vital en la progresión de la inflamación. En los condrocitos, las ROS intervienen en múltiples vías de señalización, como, por ejemplo, en la iniciada por las citocinas. Además, están implicadas en la inhibición de la síntesis de la MEC y bloquean la producción de proteoglicanos alterando así la integridad del AC [115].

Respuesta inmune innata

Se ha observado que el daño en los condrocitos y en la MEC del cartílago puede activar la respuesta inmune innata y provocar una respuesta inflamatoria estéril a través de la interacción entre los patrones moleculares y los receptores reconocedores de patrones, como los receptores tipo Toll (TLR) [116]. En pacientes con OA hay un incremento de TLR-2 y TLR-4 en el tejido sinovial, el AC y las membranas sinoviales, lo que conlleva a un aumento de MMP y prostaglandina E2. Esta última inhibe la proliferación de los condrocitos y la síntesis de proteoglicanos. Una vez iniciada, esta respuesta inflamatoria da lugar al aumento de factores catabólicos, como citocinas proinflamatorias, enzimas proteolíticas y quimiocinas; y a la disminución de los factores anabólicos como las citocinas antiinflamatorias y los GF [117].

Los mediadores que producen el daño en el cartílago pueden pasar al líquido sinovial y activar a los macrófagos presentes. Éstos estimulan la liberación de citocinas proinflamatorias involucradas en la patología de la OA como la IL-1 β y el TNF- α . Por tanto, se considera que los macrófagos son unos mediadores fundamentales en la

patogénesis de la OA [118]. Por otro lado, estudios recientes han puesto de manifiesto la presencia de mastocitos y productos de su desgranulación en la sinovia y el SF de pacientes con OA. Su presencia se ha asociado con cambios estructurales en la articulación de dichos pacientes, lo que sugiere que estas células intervienen en la patogénesis de la enfermedad [119,120].

Inmunidad adaptativa

Los macrófagos liberan citocinas proinflamatorias que producen un aumento en la permeabilidad vascular y facilita la infiltración de linfocitos T CD4+. Estas células están presentes en gran medida, junto con los macrófagos, en la sinovia de los pacientes con OA y son capaces de activarse entre ellos. Los linfocitos T pueden iniciar una cascada de eventos que activan tanto la inmunidad innata como la adaptativa, propagan la inflamación sinovial e intervienen en el deterioro del cartílago. Además, los linfocitos T son los responsables de la activación de los linfocitos B, que aumentan la inflamación y producen autoanticuerpos específicos de las proteínas de la superficie de los condrocitos [121].

Angiogénesis y dolor

En fases tempranas de la OA se produce un aumento en el número de vasos sanguíneos del SB, así como la invasión de estos vasos en el AC, que es de naturaleza avascular. La angiogénesis desempeña un papel importante en la patogénesis de la OA, facilitando la llegada de células inflamatorias e incrementando los receptores de dolor a nivel local, lo que provoca un daño estructural en la articulación y dolor. Por otro lado, la liberación de los factores proangiogénicos estimula el crecimiento nervioso desde el SB hacia la zona no calcificada del cartílago. Los nervios sensitivos crecen a lo largo de los nuevos vasos sanguíneos en las articulaciones de pacientes con OA e invaden el AC, que normalmente no está inervado, explicando así la presencia de dolor en quienes sufren esta patología [109,122].

Formación de osteofitos y remodelación de la articulación

Una característica típica de la OA es la formación de osteofitos, que son sobrecrecimientos osteocartilaginosos que se localizan en los márgenes de la articulación. Se cree que los osteofitos constituyen un mecanismo de reparación endógeno frente a cargas mecánicas excesivas en articulaciones dañadas, en un intento por estabilizar la articulación para que ésta soporte la carga anormal de forma más homogénea [123]. En un estudio reciente se ha observado que la formación de osteofitos está asociada con fuerzas mecánicas anómalas que resultan en inestabilidad y mala alineación articular, por tanto, el control de la inestabilidad articular podría ser una buena medida para prevenir la progresión de la OA. Se ha propuesto también que la aparición de osteofitos podría desempeñar un papel compensatorio en la redistribución de fuerzas para proteger el AC [124].

Diagnóstico

Actualmente, el diagnóstico de la OA está principalmente basado en la presencia de signos clínicos como dolor articular, inestabilidad, crepitación, efusión articular y pérdida de movilidad; junto con la evidencia radiográfica de la enfermedad, como estrechamiento del espacio articular, esclerosis subcondral, formación de quistes y presencia de osteofitos. Sin embargo, los signos clínicos y radiográficos de la OA no suelen aparecer hasta etapas avanzadas del proceso de degeneración [125].

En los últimos años, el estudio de biomarcadores que permita el diagnóstico temprano de la OA, así como evaluar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, ha suscitado el interés de clínicos e investigadores. Boffa *et al.* definen el término “biomarcador” como una característica que se puede medir de forma objetiva y que se puede evaluar como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o en respuesta a intervenciones terapéuticas. Además, los biomarcadores pueden estar representados por características radiográficas, histológicas, fisiológicas o moleculares [126].

Biomarcadores de imagen

Recientemente, la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) y el Colegio Americano de Radiólogos (ACR) han publicado guías de diagnóstico por imagen para pacientes sospechosos de sufrir OA. La EULAR sostiene que la radiología no es necesaria para llegar al diagnóstico, especialmente en pacientes con una presentación típica de la OA, en los que el diagnóstico se puede alcanzar simplemente basándose en la evaluación clínica [127]. Por el contrario, la ACR considera que es apropiado realizar un estudio inicial de imagen en pacientes con dolor articular crónico [128]. En pacientes con presentaciones poco comunes, tanto la EULAR como la ACR apoyan el uso de radiografías convencionales para confirmar el diagnóstico de la OA. La resonancia magnética (RM), la tomografía axial computarizada (TAC) y la ecografía se recomiendan para realizar estudios más detallados de pacientes con hallazgos radiográficos atípicos o previos al tratamiento quirúrgico. Por otro lado, la OARSI recomienda el uso de la radiografía, RM, TAC y artrografía en los estudios clínicos, tanto para el diagnóstico, como para evaluar la progresión de la enfermedad [129-131].

Radiografía

La técnica “*gold standard*” para el diagnóstico de la OA es la radiografía convencional, ya que es una técnica rápida, sencilla y económica que permite la visualización clara de los cambios óseos producidos durante la OA. Entre los hallazgos radiográficos más frecuentes se incluye la disminución asimétrica del espacio articular, el desarrollo de osteofitos en los márgenes articulares, esclerosis del SB subyacente, erosiones subcondrales, aparición de quistes óseos y en estadios muy avanzados de la enfermedad, calcificación del cartílago hialino [132].

La evaluación radiográfica incluye medidas cuantitativas y semicuantitativas. A nivel cuantitativo, la anchura del espacio articular (JSW) es un indicador del aumento de grosor del cartílago articular, ya que éste no se puede visualizar directamente con radiografías. La pérdida completa de la JSW indica la necesidad de someter al paciente a una cirugía de reemplazo articular. Otra medida cuantitativa es el estrechamiento del espacio articular (JSN), que es el primer indicador de progresión estructural de la OA

[133,134]. En cuanto a las técnicas semicuantitativas, la más utilizada es el sistema de Kellgren & Lawrence (KL), ya que se ha demostrado que, entre todas las escalas disponibles, ésta presenta el grado de correlación más alto con la pérdida de cartílago [135]. La escala KL clasifica la OA en cinco grados basándose en la presencia de cambios radiográficos como el JSN o la formación de osteofitos [136].

La principal limitación de esta técnica diagnóstica es la imposibilidad de visualizar los tejidos blandos de forma directa. Medidas como el JSN tienen una baja sensibilidad para los cambios de los tejidos blandos. Por ejemplo, el 42% de las rodillas con pérdida de cartílago visible en RM, a nivel radiográfico no presentaban JSN. Por tanto, el uso de radiografías por sí sólo puede resultar en una elevada incidencia de falsos negativos [137]. Por otro lado, la radiografía no es el método ideal para detectar la OA en estadios tempranos de la enfermedad. Se tiene que perder entre el 11-13% de cartílago para que se pueda detectar JSN, por lo que cuando se observan cambios radiográficos, la enfermedad se encuentra en estados avanzados [138,139].

A pesar de las limitaciones mencionadas, el enfoque diagnóstico convencional, en el que se combina la clínica del paciente con los hallazgos de laboratorio y radiográficos, presenta una sensibilidad y especificidad elevada (80%) [140]. Así mismo, su bajo coste y la buena aceptación de la técnica tanto por parte de los clínicos, como por parte de los pacientes hacen que la radiografía sea la técnica de imagen de elección [141].

Resonancia magnética

La RM no suele utilizarse en el diagnóstico de la OA de forma generalizada debido a su alto coste y limitada accesibilidad. Sin embargo, en investigación es la técnica más empleada, dado que es altamente sensible y permite evaluar los tejidos blandos implicados en la patología de la OA [142].

Los métodos cuantitativos principalmente miden el volumen del cartílago, el grosor y la zona superficial, ofreciendo datos fiables del estado del cartílago que se corresponden con los signos clínicos y que además tienen un elevado valor pronóstico [143]. Recientemente se han introducido nuevas técnicas de RM, permitiendo la caracterización bioquímica del AC. La relaxometría de las secuencias T1rho y T2 es una

técnica prometedora y no invasiva que permite evaluar los cambios producidos en la composición del cartílago incluso antes de que aparezcan cambios morfológicos [144]. El tiempo de relajación de la secuencia T1rho es sensible a cambios en el contenido de proteoglicanos, mientras que el de la secuencia T2 se asocia al contenido de agua y a la orientación y densidad de las fibras de colágeno [145]. Por otro lado, los métodos semicuantitativos, como la escala “*Whole Organ Magnetic Resonance Imaging Score*” (WORMS), permiten determinar la gravedad de la OA, calificando el cartílago, el SB y las alteraciones del espacio intraarticular (IA) [146].

Esta técnica tiene una especificidad del 82% y una sensibilidad del 61% en el diagnóstico de la OA [140]. Además, permite visualizar de forma directa todas las estructuras de la articulación de forma tridimensional, pudiendo así evaluarse distintos factores implicados en la patogénesis de la OA, como la degeneración del AC, la formación de osteofitos, lesiones de la médula ósea, cambios en los meniscos, derrame sinovial y sinovitis [141].

Por otro lado, los hallazgos de RM tienen una buena correlación con la gravedad y la manifestación clínica de la enfermedad. Algunas características evaluables en la RM, como puede ser la presencia de lesiones subcondrales o sinovitis, están fuertemente asociadas al dolor [147]. Así mismo, los biomarcadores de RM entre los que se incluyen cambios en el volumen del AC, lesiones del SB y la presencia de osteofitos, tienen un gran valor predictivo del reemplazo total de rodilla y cadera [148].

Puesto que con la RM se pueden visualizar alteraciones que ocurren antes de los cambios radiográficos, esta técnica permite el diagnóstico de la OA en estadios tempranos de la enfermedad, incluso en pacientes asintomáticos. Permite también distinguir entre individuos que presentan riesgo de padecer OA y los que no [149,150]. Por todo esto, la RM se considera una buena alternativa a las radiografías convencionales, sobre todo en las primeras fases de la enfermedad [141].

Ecografía

La ecografía es una técnica segura, económica y muy manejable que permite la visualización de los tejidos blandos implicados en la patogénesis de la OA a tiempo real

y en múltiples planos. Es útil para evaluar cambios erosivos a nivel del AC, inflamación de la membrana sinovial, la superficie ósea, y los meniscos y ligamentos. En el diagnóstico de la OA, la principal ventaja de la ecografía sobre las radiografías convencionales es la capacidad de detectar alteraciones sinoviales, como hipertrofia sinovial, aumento de la vascularización y efusión sinovial [151], presentando una sensibilidad del del 97% para detectar sinovitis y efusión sinovial en pacientes con OA [152].

Los hallazgos ecográficos tienen una sensibilidad comparable a la escala radiográfica de KL, así como a la evaluación de la degradación del AC y otros tejidos blandos con RM [153,154]. Además, existe un gran grado de asociación entre la presentación clínica de la OA y los hallazgos ecográficos. Por ejemplo, se ha correlacionado el dolor crónico de rodilla con hallazgos ecográficos como extrusión de los meniscos, quistes poplíteos, sinovitis y efusión sinovial [155,156].

La principal limitación de esta técnica es que las ondas de ultrasonidos no pueden penetrar en el interior del hueso, de modo que solo se pueden visualizar estructuras superficiales al mismo, por lo que no es posible evaluar la presencia de lesiones medulares o de quistes subcondrales [152]. En líneas generales, la ecografía no se recomienda como técnica diagnóstica de rutina para evaluar la progresión de la OA. Ocasionalmente, se recomienda para confirmar el diagnóstico o evaluar de forma más detallada alteraciones de los tejidos blandos como los quistes poplíteos [157].

Tomografía axial computarizada

La TAC proporciona una imagen tridimensional de la articulación y permite evaluar cambios en la morfología ósea como la formación de osteofitos, quistes subcondrales y calcificación del cartílago, de forma más clara que la RM. Además, es una técnica más económica, más asequible y requiere menos tiempo de realización que la RM [158].

La TAC convencional no permite la evaluación adecuada de los tejidos blandos, sin embargo, cuando se usan agentes de contraste (artrografía), se convierte en una herramienta altamente sensible capaz de detectar degeneración del AC o daños en los meniscos. La principal desventaja es que se trata de una técnica invasiva, en la que se

emplean agentes de contraste que pueden provocar reacciones alérgicas y los niveles de radiación ionizante son más altos que con otros métodos de diagnóstico por imagen [131]. En la práctica clínica, la EULAR recomienda el uso de la TAC sólo para examinar el hueso de forma más detallada en casos de presentaciones atípicas [127].

Medicina nuclear

La medicina nuclear utiliza isótopos radioactivos que permiten tener una imagen del metabolismo activo y visualizar la remodelación ósea que se lleva a cabo con la formación de osteofitos, la esclerosis subcondral, la formación de quistes subcondrales y las lesiones medulares. Las técnicas más utilizadas incluyen la tomografía por emisión de fotón simple y la tomografía por emisión de positrones. Ambas técnicas se han utilizado en investigación para visualizar el SB, localizar puntos de inflamación sinovial y detectar lesiones de la médula ósea [159-161].

Las limitaciones de la medicina nuclear incluyen que son técnicas poco específicas, la resolución anatómica es pobre, riesgo de reacciones alérgicas y exposición elevada a radiación ionizante. Recientemente, han surgido nuevas técnicas de medicina nuclear que proveen una mayor resolución anatómica, sin embargo, no hay evidencias suficientes que sustenten su uso en el diagnóstico y manejo de la OA [162].

Biomarcadores bioquímicos

En los últimos años, numerosos estudios han investigado el papel de distintos biomarcadores bioquímicos en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la OA [163]. Estos biomarcadores permiten el diagnóstico temprano de la enfermedad y el tratamiento más rápido de la misma, evitando así en mayor medida las secuelas del daño al cartílago o al SB [164]. Además, la evaluación individualizada de biomarcadores bioquímicos en pacientes con OA permite predecir o monitorizar la respuesta al tratamiento [126].

Los biomarcadores bioquímicos de OA pueden evaluarse tanto en suero, como en orina o SF. Los biomarcadores se pueden clasificar en dos grupos en función de su naturaleza: (I) biomarcadores asociados a la síntesis y degradación del cartílago y (II) biomarcadores asociados a daño e inflamación articular [102].

Biomarcadores asociados a la síntesis y degradación del cartílago articular

El colágeno tipo II es el principal componente del AC y es prácticamente específico de dicho tejido. Además, el anabolismo y catabolismo del colágeno tipo II es la base de la fisiopatología de la OA, por lo que, durante los últimos años, se han estudiado numerosos biomarcadores producto de la degradación o la síntesis de esta proteína [165]. Entre los biomarcadores asociados al metabolismo del colágeno se encuentran el telopéptido C-terminal del colágeno tipo II (CTX-II), propéptidos del colágeno tipo II y el neoepítipo de la degradación del colágeno tipo II (C2C) [166].

El CTX-II es un producto de la degradación del colágeno y ha sido identificado como uno de los principales indicadores de daño del AC y erosión articular. Tras la degradación del colágeno por parte de las colagenasas, el CTX-II se libera de la triple hélice de colágeno, lo que lo hace un biomarcador específico de la OA [98]. Varios estudios han puesto de manifiesto que los niveles de CTX-II se elevan en la orina de pacientes con OA de rodilla o cadera y que existe cierta correlación entre los niveles de este biomarcador y el riesgo de que la progresión de la patología sea rápida. Además, se observó que la concentración urinaria del CTX-II aumenta en presencia de pequeñas lesiones condrales que preceden a la OA, por lo que es útil en el diagnóstico temprano de la patología [167-169].

Por otro lado, el colágeno tipo II se sintetiza como una molécula de procolágeno, con propéptidos-N (amino-terminal) (PIIANP) y propéptidos-C (carboxilo-terminal) (PIICP) en cada extremo. Estos propéptidos representan la síntesis de colágeno tipo II y se ha observado que están inversamente correlacionados con la destrucción del cartílago en pacientes con OA. Niveles séricos bajos de PIIANP y PIICP se han asociado con alteraciones radiográficas en pacientes con OA de rodilla y mano, además, más recientemente, el PIIANP se ha consolidado como un buen biomarcador de progresión de la patología [170-174].

El fragmento de la degradación del colágeno tipo II (Col-2-1) es una secuencia que se localiza en el extremo amino-terminal de la triple hélice de colágeno y que puede detectarse en suero, orina o SF una vez que la triple hélice se ha desnaturalizado, representando por tanto la degradación del colágeno tipo II. Su forma nitrada (Coll-2-

1NO2) refleja la degradación oxidativa del colágeno tipo II y la reacción de inflamación local. Tanto el Col-2-1 como el Coll-2-1NO2 son sensibles a cambios estructurales en la articulación, lo que los convierte en biomarcadores óptimos para el diagnóstico de la patología. Se ha observado también que el aumento de la concentración sérica de ambos biomarcadores está asociado con la presencia de quistes periarticulares, bursitis, alteraciones del SB y alteraciones de la integridad del AC. Además, un estudio reciente ha puesto de manifiesto que los niveles basales de Col-2-1NO son más altos en aquellos pacientes en los que el dolor asociado a la OA aumenta durante un periodo de un año [175-181].

Otro producto de la degradación del colágeno que se ha estudiado como biomarcador es el C2C. Es un biomarcador sensible al aumento del catabolismo del colágeno de tipo II y a la desnaturalización de las triples hélices de colágeno por parte de las colagenasas y la katepsina K. Este biomarcador se ha estudiado tanto en suero como en orina y SF, y la concentración elevada de C2C en estos fluidos se correlaciona con fases iniciales de la OA, en la que todavía no se aprecian cambios en las radiografías convencionales, pero sí en RM. Además, existe una fuerte correlación entre los niveles elevados de C2C y el dolor y la pérdida de funcionalidad reportada por los pacientes con OA. Por otro lado, se ha observado que la concentración elevada de C2C en orina está relacionada con el riesgo de desarrollar lesiones en el AC en un periodo de tres años. Por todo ello, este biomarcador se ha propuesto como una herramienta potencial en el diagnóstico y la predicción de la evolución de la patología [182-186].

La COMP es una proteína no colágena sintetizada por los condrocitos, las células sinoviales, los osteoblastos y los fibroblastos. Desde hace años se ha establecido como un biomarcador de la degradación del AC y concentraciones altas en suero, orina y SF se correlacionan con la gravedad de la OA. Además, los niveles altos de COMP en suero y SF están fuertemente asociados con la manifestación clínica y los hallazgos radiográficos en pacientes con OA [187-191]

Biomarcadores asociados al daño e inflamación articular

La sinovitis se produce como resultado de la liberación de los productos de la degradación del cartílago hialino al espacio articular, activando las células sinoviales. En respuesta, las células sinoviales producen biomarcadores proinflamatorios y enzimas proteolíticas como las MMP, que intensifican el daño en el AC y atraen linfocitos y macrófagos al espacio articular. Estudios recientes han puesto de manifiesto la capacidad de varios biomarcadores sinoviales para predecir la evolución clínica de la OA y su pronóstico [192].

Los mediadores proinflamatorios, como la IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, el TNF- α y la ciclooxigenasa- 2 (COX-2) son capaces de identificar pacientes con riesgo de desarrollar OA de rodilla. En pacientes sintomáticos, niveles séricos elevados de IL-1 β , TNF- α y COX-2 a tiempo basal, se asociaron con mayor grado de estrechamiento del espacio articular en un periodo de 24 meses. Además, la IL-4, IL-6 y el TNF- α han demostrado ser útiles en el diagnóstico temprano de la OA, y el incremento de sus concentraciones tanto en suero como en SF está relacionado con cambios estructurales visibles en RM y se correlacionan positivamente con la gravedad radiográfica [181,193-196].

Las MMP regulan la degradación enzimática de la MEC y están implicadas en la inducción de la OA. En pacientes con OA se ha observado un incremento en la expresión de la MMP-13 en comparación con pacientes sanos. Además, el aumento de sus niveles ha sido asociado con una progresión más rápida de enfermedad. Por otro lado, niveles altos de MMP-3 se correlacionan con la disminución del espacio articular y con la gravedad de la clínica que presentan los pacientes con OA [197-199].

Numerosas citocinas, como las quimiocinas, están implicadas en el desarrollo de la OA y se han propuesto como biomarcadores que permiten llegar al diagnóstico de la OA, además de identificar a los pacientes con riesgo de sufrir la enfermedad. El ligando 12 de la quimiocina CXC (CXCL12) es un tipo de citocina que en líneas generales se encarga de movilizar células madre mesenquimales (MSCs) para facilitar la cicatrización de los tejidos blandos y la remodelación ósea. Concentraciones elevadas de CXCL12 en el SF y suero de pacientes con OA se ha correlacionado con alteraciones radiográficas graves. Además, se ha demostrado que niveles elevados de CXCL12 en suero se asocian

a pacientes con riesgo de desarrollar la patología [200-203]. Por otro lado, el ligando 2 de las quimiocinas (CCL2) se encarga de atraer linfocitos T y células natural killer al espacio articular. Así mismo, el CCL2 actúa incrementando la expresión de MMP-3 en pacientes con OA, exacerbando la degradación del AC. La concentración elevada de CCL2 en el líquido sinovial de pacientes con OA de rodilla se correlaciona con la evidencia radiográfica de la OA y la progresión de la patología [204,205].

El HA es un glicosaminoglicano no sulfatado que se localiza en tejidos conectivos, como el AC y que es sintetizado por los fibroblastos y condrocitos. Se ha identificado como un biomarcador útil en el diagnóstico temprano de la patología. En pacientes con OA de rodilla, los niveles elevados de HA se corresponden con estadios iniciales de la enfermedad y están asociados a la gravedad de la presentación clínica. La concentración sérica de HA se ha correlacionado positivamente con la progresión de la OA siguiendo la escala KL. Así mismo, los niveles séricos elevados de este biomarcador se han asociado a la progresión del JSN en rodillas que inicialmente no presentaban signos de OA, lo que indica que el HA es útil en la predicción de la progresión de la OA [206-209].

Tratamiento de la Osteoartritis

El tratamiento de la OA es multimodal y cada vez está más aceptado que no existe un tratamiento único y válido para todos los pacientes, sino que debe individualizarse, tomando en consideración las comorbilidades, el número de articulaciones afectadas y la sintomatología presentada por cada paciente. Actualmente, los tratamientos van encaminados a reducir el dolor y la inflamación, así como a ralentizar la progresión de la patología, con el fin aumentar la masa muscular, mejorar la funcionalidad de la articulación afectada, y con todo ello mejorar la calidad de vida de los pacientes [67]. Los tratamientos disponibles se pueden clasificar en cuatro grupos: no farmacológicos, farmacológicos, quirúrgicos y terapias regenerativas.

Tratamientos no farmacológicos

Los tratamientos no farmacológicos buscan disminuir el dolor, mejorar la movilidad y la calidad de vida de los pacientes, y ralentizar la progresión de la enfermedad. Entre las modalidades no farmacológicas empleadas actualmente en el manejo de la OA destaca la educación del paciente (o de los propietarios en caso de Medicina Veterinaria), la pérdida de peso y el ejercicio físico, la fisioterapia y los suplementos nutricionales con efecto terapéutico [210].

Educación del paciente

El manejo adecuado de la OA requiere invertir cierto tiempo en la educación del paciente, pues es importante el compromiso de este para garantizar el control de la sintomatología, así como para mejorar su calidad de vida. Algunos clínicos e investigadores han manifestado que los pacientes con OA están interesados en aprender estrategias, especialmente no farmacológicas, que les permitan controlar su enfermedad sin necesidad de acudir al médico [211].

Control del peso y actividad física

Cada vez es más evidente la estrecha relación existente entre el sobrepeso y la OA. Además, se ha demostrado que en pacientes obesos con OA, la pérdida de peso reduce la gravedad de los síntomas, lo que hace indiscutible, que el control del peso es de vital importancia en el manejo de la patología [212,213].

Por otro lado, la actividad física es el tratamiento no farmacológico más recomendado como parte del tratamiento de problemas musculoesqueléticos, especialmente la OA. El objetivo principal de la actividad física en pacientes con OA es reducir el dolor, mejorar la movilidad articular y la condición física, incrementando la calidad de vida de éstos. Así mismo, la actividad física tiene muchas ventajas en comparación al tratamiento farmacológico o quirúrgico, como, por ejemplo, su fácil aplicación y disponibilidad, los escasos efectos adversos y el coste relativamente bajo. Muchos estudios clínicos han demostrado los beneficios de la actividad física como parte del tratamiento de esta patología [214-216], además, en modelos animales, se

ha observado que la actividad física moderada en las etapas tempranas de la OA ralentiza el proceso de destrucción articular, atrofia ósea y pérdida de masa muscular, mientras que la inactividad física contribuye a la progresión de cambios musculoesqueléticos de forma generalizada [217-219]. Entre las actividades físicas propuestas como beneficiosas para el control de la OA en humana se encuentra el ejercicio aeróbico de bajo impacto como caminar, nadar o montar en bicicleta, que pueden mejorar la fuerza muscular mientras que la carga articular es mínima; ejercicios de tonificación muscular, especialmente útiles en pacientes con OA de rodilla o cadera en los que es recomendable aumentar el tono de masa muscular; ejercicios de flexibilidad, que permiten aumentar el rango de movimiento mejorando así la funcionalidad articular; y ejercicios en los que se trabaje la mente y el cuerpo, como el taichí y el yoga [220-224].

Dieta y nutraceuticos

La alimentación tiene un importante efecto en el estado inflamatorio del cuerpo. Las dietas altas en grasas, en las que se consumen grandes cantidades de grasas trans y saturadas, aumentan el riesgo de padecer OA, así como el grado de dolor en pacientes con la enfermedad [225,226]. Algunos estudios han demostrado que la prevalencia de la OA disminuye cuando se sigue una dieta mediterránea, además, esta dieta es capaz de aliviar el dolor y la rigidez articular [227,228]. Otro estudio reciente ha puesto de manifiesto que la reducción del consumo de carbohidratos disminuye la intensidad del dolor y favorece la funcionalidad de la rodilla de quienes sufren esta patología [229].

Los nutraceuticos son sustancias químicas que se encuentran formando parte de la composición natural de los alimentos y que se ha determinado que son beneficiosas para prevenir o tratar alguna enfermedad [230]. Entre los nutraceuticos que se utilizan para el manejo de la OA se encuentran la glucosamina y la condroitina, con efectos analgésicos y condroprotectores [231,232]; el metilsulfonilmetano, que posee propiedades antiinflamatorias y es capaz de ralentizar la degeneración articular en pacientes con OA [233,234]; el colágeno, que induce la regeneración del cartílago al aumentar la síntesis de macromoléculas de la MEC [235,236]; el HA, que se une a numerosos receptores suprimiendo la expresión de citocinas proinflamatorias, estimula

la síntesis de proteoglicanos y previene la degeneración articular al contribuir en la lubricación del cartílago [237,238]; el ácido ascórbico, que disminuye la degradación del cartílago en pacientes con OA mediante la reducción del estrés oxidativo [239,240]; la *Boswellia serrata*, con componentes antiinflamatorios que han demostrado disminuir el dolor y la rigidez, así como aumentar la funcionalidad articular en pacientes con OA de rodilla y cadera [241-243]; la capsaicina, con propiedades analgésicas [244]; la curcumina, que ha demostrado tener efectos condroprotectores, antioxidantes y antiinflamatorios [245,246]; el jengibre, que posee un efecto antiinflamatorio y mejora la sintomatología de los pacientes con OA [247]; los polifenoles presentes en algunos alimentos, especialmente en el té verde, pueden reducir el dolor y mejorar la movilidad [248]; y por último, los lípidos insaponificables y los ácidos grasos omega -3 presentes en la soja, el aguacate, el pescado y los frutos secos pueden disminuir el dolor y la rigidez de la articulación afectada, así como disminuir el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en pacientes con OA [249,250].

Fisioterapia

La disminución de la actividad física asociada al dolor producido por la OA lleva asociada una pérdida de función muscular, que limita en mayor medida si cabe la movilidad del paciente. La fisioterapia contrarresta este círculo vicioso mejorando la fuerza muscular, el control neuromuscular, la amplitud del movimiento y la estabilidad articular [251]. La OARSI recomienda la fisioterapia en la guía para el manejo de la OA, para cualquier paciente independientemente de la articulación afectada o de la existencia de otras patologías asociadas. Las técnicas de fisioterapia se pueden dividir en terapia manual o física [210].

La terapia manual es aquella que se realiza por las manos del fisioterapeuta, e incluye distintas técnicas de masaje y estiramientos. En cuanto al masaje, existen varias técnicas ("*effleurage*", "*petrissage*", percusión, presión o "*stroking*") que buscan reducir la rigidez y el dolor articular, al mismo tiempo que mejoran la función articular y la amplitud de movimiento. Además, los masajes inducen cambios en el sistema nervioso autónomo, reduciendo los niveles de estrés y ansiedad, por lo que mejoran la calidad de vida del paciente con OA [252-255]. Por otro lado, mediante los

estiramientos se logra la elongación de los tejidos blandos periarticulares que se han acortado de forma patológica y se mejora la flexibilidad y la amplitud del movimiento articular [224].

La terapia física consiste en el empleo de ciertos factores físicos que han demostrado tener efecto terapéutico en pacientes con OA. Entre las técnicas frecuentemente utilizadas como parte del tratamiento de esta enfermedad se encuentran los ultrasonidos, la terapia con láser, la terapia de ondas de choque y la electroterapia [256].

Los ultrasonidos terapéuticos (UT) son una modalidad terapéutica que utiliza ondas acústicas con una frecuencia comprendida entre 1-3 MHz. Los UT se pueden aplicar de forma continua, con un efecto térmico que favorece la irrigación, reduce el dolor y aumenta la flexibilidad de los tejidos; o pulsada, que favorece la permeabilidad de la membrana celular. Los UT pulsados son más eficaces en el control del dolor y la mejora de la movilidad en pacientes con OA que los UT continuos. Además, recientemente se ha demostrado que los UT tienen efectos antiinflamatorios, reducen la expresión de MMP-13, promueven la proliferación de los condrocitos y aumentan la expresión celular de colágeno tipo II y proteoglicanos. Así mismo, son capaces de mejorar la viscosidad del líquido sinovial y aumentar la masa muscular y la amplitud de movimiento [256-260].

La terapia con láser (LT) es una modalidad terapéutica no invasiva que opera con luz infra roja y que tienen efectos analgésicos y antiinflamatorios en pacientes con OA, en los que se ha observado una mejora en la función articular, así como en la amplitud de movimiento. La LT tiene efectos positivos en la célula entre los que se incluye la síntesis de colágeno y la producción de GF. Los efectos analgésicos vienen mediados por la producción endógena de opiáceos y la inhibición de nervios periféricos, mientras que el efecto antiinflamatorio se debe a su efecto vasodilatador, lo que permite la eliminación de las sustancias proinflamatorias [261-266].

La terapia de ondas de choque extracorpóreas (ESWT) se basa en la aplicación de ondas acústicas de alta energía que en contacto con áreas que contienen fluidos se transforman en ondas mecánicas que originan distintos efectos a nivel biológico. En

etapas tempranas de la OA, la ESWT reduce la superficie de cartílago dañado y la pérdida de proteoglicanos, además de promover la síntesis de colágeno tipo II y la reparación del SB. Por otro lado, tiene un efecto antiinflamatorio al reducir la síntesis de MMP y óxido nítrico. Estos efectos se manifiestan con la disminución del dolor y la mejora de la funcionalidad en pacientes con OA tras someterse a ESWT [267-271].

Dentro de la electroterapia existen dos modalidades, la electroestimulación nerviosa transcutánea (TENS), que persigue aliviar el dolor mediante la sobreestimulación de las terminaciones nerviosas nociceptivas; y la electroestimulación neuromuscular (NMES), cuyo beneficio principal es el fortalecimiento muscular mediante la estimulación de las fibras motoras. A nivel experimental, la TENS produce un efecto analgésico en animales con OA, sin embargo, los resultados de los estudios clínicos son contradictorios. Mientras que algunos autores concluyen que la TENS es eficaz para aliviar el dolor, otros no pueden confirmar su efectividad [272-275]. Por otro lado, la NMES es especialmente útil en pacientes con comorbilidades que les impiden realizar ejercicio físico. Esta modalidad de electroestimulación ha demostrado ser capaz de mejorar la cojera en pacientes con OA, disminuir la crepitación y la rigidez articular, aumentar la amplitud de movimiento, incrementar el grosor de los fascículos musculares y en líneas generales, mejorar la calidad de vida de quienes sufren la enfermedad [276-278]. Sin embargo, una revisión sistemática reciente manifiesta que no existe evidencia clínica suficiente como para recomendar el uso de electroestimulación como parte del manejo de la OA [279].

Acupuntura

La acupuntura es una técnica segura, con muy pocos efectos adversos, que ha sido recomendada para tratar pacientes con distintas patologías musculoesqueléticas. Varios estudios han demostrado que la acupuntura puede considerarse como un tratamiento eficaz para aliviar el dolor en pacientes con OA a corto plazo, sin embargo, los resultados no son consistentes debido a la gran variabilidad de las modalidades empleadas. Entre todas las modalidades de acupuntura existentes, la electroacupuntura es la que mejores resultados ofrece, siendo capaz de disminuir el dolor y

mejorar la funcionalidad de la articulación afectada durante largos periodos de tiempo [280-283].

Tratamientos farmacológicos

El tratamiento farmacológico de la OA está encaminado a reducir la inflamación y a aliviar el dolor. Entre estos fármacos se encuentran los AINEs (tópicos u orales), el paracetamol, el tramadol y los glucocorticoides.

Antiinflamatorios no esteroideos

Los AINEs de uso tópico surgen como alternativa a los AINEs orales, tienen un efecto analgésico y antiinflamatorio comparable, pero su uso minimiza el riesgo de efectos secundarios indeseados asociados a la exposición sistémica. Los AINEs tópicos deben penetrar la piel para alcanzar concentraciones antiinflamatorias en la articulación, por tanto, su uso está más recomendado en superficies articulares pequeñas como los nudillos o las rodillas, en las que el dolor y la inflamación están muy localizados [284-286]. Son muchas las instituciones que reconocen el papel tan importante que desempeñan los AINEs tópicos en el manejo del dolor en pacientes con OA, y las últimas guías publicadas por la OARSI y la EULAR abogan por su uso como primera opción farmacológica, puesto que son más seguros que los AINEs orales, los efectos adversos se limitan a irritación local transitoria, y la eficacia reportada es muy similar [210,287-289]. Pueden estar formulados en forma de crema, gel, parches o soluciones. Entre los AINEs tópicos que se han investigado para el tratamiento de la OA se incluyen el diclofenaco, el etoricoxib, el felbinaco, el flufenamato, el flurbiprofeno, el ibuprofeno, el ketoprofeno, el piroxicam, el piketoprofeno y la nimesulida. De entre todos ellos, los que mejores resultados han mostrado son el gel y los parches de diclofenaco, y los geles de ketoprofeno e ibuprofeno [290,291].

En cuanto al uso de AINEs orales de forma generalizada en los pacientes con OA, actualmente existe cierta controversia. La OARSI sólo recomienda el uso de estos fármacos en pacientes sin morbilidades asociadas, cuando los AINEs tópicos no consigan disminuir la inflamación y el dolor asociados a la patología. Por lo general, se

prefieren AINEs no selectivos (como por ejemplo naproxeno, ibuprofeno, carprofeno, ketoprofeno o diclofenaco) en asociación con inhibidores de la bomba de protones; o inhibidores selectivos de la COX-2 (como firocoxib, mavacoxib, robenacoxib o cimicoxib). En pacientes con problemas gastrointestinales, se aboga por el uso de inhibidores de la COX-2, que son más seguros, mientras que en pacientes con problemas cardiovasculares el uso de AINES orales no está recomendado [292]. Sin embargo, el Colegio Americano de Radiólogos y la Academia Americana de Cirujanos Ortopédicos (AAOS) recomiendan el uso de AINES orales para cualquier paciente con OA [221,293].

Paracetamol

Durante muchos años, el tratamiento farmacológico de la OA ha estado basado en el empleo del paracetamol como analgésico. Sin embargo, en los últimos años, la evidencia sugiere que el paracetamol tiene un efecto muy ligero en pacientes con OA, en los que alivia mínimamente el dolor [294,295]. Por ello, en la última actualización de la guía de la OARSI del manejo farmacológico de la OA, el paracetamol no está recomendado [210].

Opioides

Durante los últimos años, el uso de opioides, tanto tópicos como orales, para controlar el dolor en pacientes con OA ha aumentado. En Estados Unidos, hasta el 40% de las personas con OA de rodilla son tratadas con opioides, mientras que, en Reino Unido, su prescripción ha aumentado significativamente en los últimos años [296,297]. Entre los opioides más comúnmente prescritos se incluyen la oxycodona, el tapentadol, la hidromorfona, la codeína, la buprenorfina, el fentanilo, la oximorfona y el tramadol. A pesar del incremento en su empleo, son varios los estudios que han reportado que los opioides tienen muy poco efecto en la mejora del dolor o la función articular en pacientes con OA, sumado a que presentan una elevada incidencia de efectos adversos, principalmente gastrointestinales [298-300]. Basándose en estos datos y teniendo en consideración la gran problemática existente por la dependencia a los opioides

[301,302], la OARSI no recomienda el empleo de estos fármacos para el tratamiento de la OA [210].

Inyecciones intraarticulares con corticoesteroides

La inyección IA de corticoesteroides se recomienda en pacientes en los que está contraindicada la administración de AINEs orales, o en aquellos que no responden adecuadamente al tratamiento con AINEs. Entre los corticoesteroides comúnmente infiltrados se encuentra la hidrocortisona, la metilprednisolona, la betametasona y la triamcinolona [303]. Los corticoesteroides IA han demostrado ser efectivos en el alivio del dolor a corto-medio plazo, así como en la mejora de la funcionalidad articular. Los efectos beneficiosos comienzan a observarse 1 semana después de la infiltración IA, y suelen durar entre 3 y 4 semanas, aunque algunos autores han reportado que estos efectos pueden durar hasta 6 meses [304,305]. La mayor inquietud existente con respecto a esta terapia es la asociada a los potenciales efectos adversos. La complicación más frecuente es la atrofia de la piel en el punto de inyección y raramente se observan efectos sistémicos como infección articular e incremento de la concentración sanguínea de glucosa y cortisol [306]. Por otro lado, no se conocen con exactitud los efectos dañinos que puede tener la inyección IA de corticoesteroides a largo plazo en los tejidos articulares. Los resultados de algunos estudios preclínicos sugieren que dosis elevadas de corticoesteroides tienen un efecto nocivo sobre los condrocitos, mientras que dosis bajas, tienen un efecto condroprotector al reducir la inflamación [307]. Otro aspecto para tener en cuenta es el riesgo potencial de inmunosupresión. En algunos estudios se ha observado que los pacientes que se someten a una cirugía de reemplazo de rodilla después de haber sido tratados con inyecciones IA de corticoesteroides tienen más riesgo de padecer infecciones postquirúrgicas [308,309]. A pesar de las limitaciones existentes, la última guía publicada por la OARSI recomienda el uso de corticoesteroides IA como terapia de segunda línea [210].

Inyecciones intraarticulares con ácido hialurónico

El HA es un componente del AC y del SF responsable de reducir la fricción entre las superficies articulares. En las articulaciones sanas, la vida media del HA es de aproximadamente 20 horas, mientras que en OA, se reduce a la mitad. El propósito de las inyecciones IA de HA es mejorar las propiedades viscoelásticas del cartílago [310]. El HA ejerce también un efecto antiinflamatorio, analgésico y condroprotector, reestableciendo la homeostasis en la articulación. Por otra parte, existen también numerosos estudios que demuestran que las inyecciones IA de HA proporcionan más analgesia que las inyecciones IA de corticoesteroides, además, la disminución del dolor y la mejora de la movilidad articular es más duradera, y estos efectos beneficiosos, se han reportado hasta 6 meses después de la aplicación del tratamiento [311-315] . Existen distintos productos de HA, y en función de su peso molecular, se pueden clasificar en elevado, moderado y bajo peso molecular, siendo el de elevado peso molecular el que mayores beneficios proporciona en el tratamiento de pacientes con OA [316,317]. A pesar de que los resultados obtenidos en numerosos estudios son positivos, no existe consenso sobre el empleo de inyecciones IA de HA en el manejo de la OA. Algunas instituciones como la AAOS no recomiendan el empleo de HA IA para el tratamiento de la OA de cadera o rodilla, sin embargo, la OARSI recomienda su uso como terapia de segunda línea, siempre y cuando no sean pacientes con infecciones en la articulación a tratar [210,221].

Tratamiento quirúrgico

Desbridamiento artroscópico

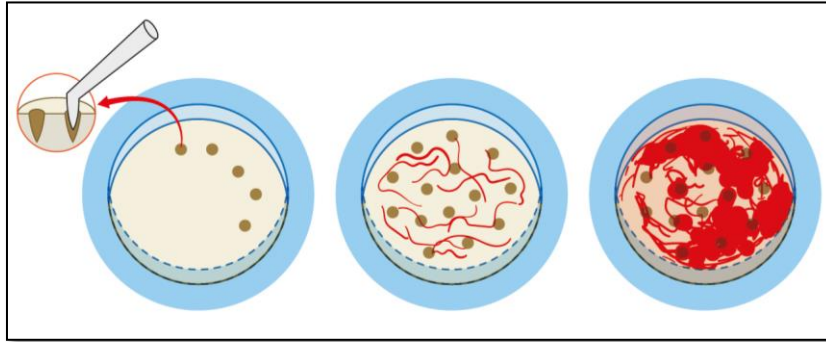
El desbridamiento artroscópico (AD) consiste en la eliminación de los fragmentos inestables y fibrilados del AC con ayuda de una cureta, dejando así la superficie articular más lisa y estable. Estos fragmentos de cartílago que están sueltos son los responsables de causar irritación mecánica e inflamación sinovial. El AD del cartílago dañado resulta en alivio del dolor y mejora de la sintomatología en pacientes con OA de rodilla [318-320]. El AD es la técnica quirúrgica más comúnmente utilizada en pacientes con OA leve o moderada, sin embargo, algunos autores no la consideran una opción

eficaz por la corta duración de sus efectos [321-323]. En cuanto a las lesiones condrales focales, independientemente del tamaño y la profundidad, el AD proporciona muy buenos resultados a corto-medio plazo, sobre todo en lo que respecta a la función articular [324]. Entre las ventajas que presenta esta técnica se incluyen la sencillez y el bajo coste. Otra ventaja es que los pacientes con altas demandas se recuperan muy rápidamente. En un estudio llevado a cabo por Joshi *et al.* alrededor del 91% de los militares con lesiones osteocondrales recuperaron el nivel de actividad que tenían antes de sufrir la lesión 6 semanas después del AD, mientras que este tiempo es significativamente más alto para otras técnicas quirúrgicas [325,326].

Técnicas de estimulación de la médula ósea

Las técnicas de estimulación de la médula ósea son muy comunes en el tratamiento de lesiones osteocondrales e incluyen las microfracturas (MFx) (Imagen 6), el *forage* subcondral (SBD) y la artroplastia por abrasión del SB (SBA). Estas técnicas persiguen penetrar en el SB con el fin de provocar una hemorragia en la zona con la consiguiente liberación de factores quimiotácticos y GF, que atraen células mesenquimatosas no diferenciadas. Éstas se multiplican y se diferencian en fibroblastos que, al ser sometidos a estimulación mecánica, se diferencian en condrocitos, formándose así un tejido fibrocartilaginoso en el área del defecto [327].

La técnica de las MFx generalmente se usa para tratar defectos condrales pequeños, y consiste en realizar varias perforaciones con la ayuda de una aguja de Kirschner o un punzón de artroscopia que penetren hasta el SB (4-8 mm de profundidad). Dada la sencillez de la técnica y el bajo coste, así como los buenos resultados demostrados a corto plazo, las MFx se consideran la primera opción quirúrgica para este tipo de defectos condrales [328,329]. Sin embargo, a largo plazo, la técnica de las MFx no reporta buenos resultados, especialmente en lesiones condrales más grandes y en pacientes jóvenes y activos [330-332]. Además, existe cierta preocupación con respecto al efecto de las MFx en el SB, ya que se cree que pueden producir que el hueso se vuelva más frágil, y predisponen a la formación de quistes óseos y a la disrupción de la SBP [333,334].

Imagen 6. Técnica de microfracturas.

Adaptado de Guía SERVET de Manejo Clínico Osteoartrosis [26].

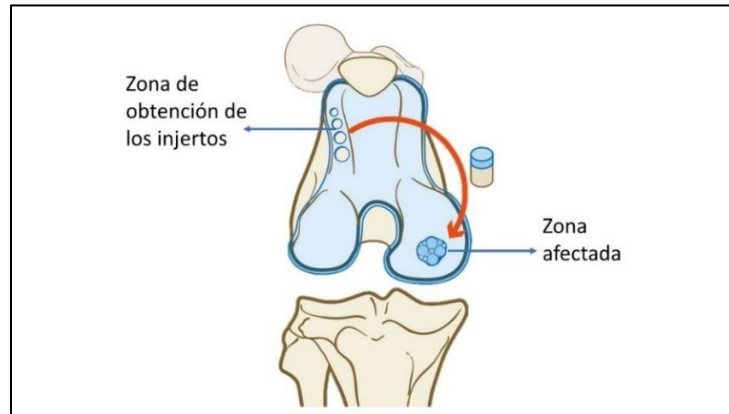
Basándose en estas evidencias, algunos cirujanos ortopédicos han dejado de realizar MFx y han vuelto a practicar la técnica de SBD, que fue muy popular en los 80 pero durante décadas se mantuvo en un segundo plano, porque se consideró que el riesgo de producir necrosis térmica de los condrocitos era más alto, ya que las perforaciones en el SB se realizan con un taladro [335]. Sin embargo, trabajos recientes han puesto de manifiesto que el SBD no es tan perjudicial para el SB como las MFx, además, consigue una mayor penetración en el SB, estimulando en mayor medida la médula ósea y consiguiendo mejores resultados regenerativos a medio y largo plazo [336-339].

La SBA es otra técnica de las denominadas de estimulación medular que fue introducida a principio de los 80 y que conlleva la resección de pequeños fragmentos de SB esclerótico (1-3 mm) usando una fresa, para exponer la vascularización subcondral. Pocos años después esta técnica dejó de emplearse porque algunos estudios demostraron que no reportaba ningún beneficio frente al SBD, además, su uso estaba asociado a un empeoramiento de los síntomas [340-342]. No obstante, independientemente de la técnica de estimulación de la médula ósea empleada, el tejido de reparación no alcanza las características del cartílago hialino sano, y las propiedades histológicas y biomecánicas son más similares a las propiedades del fibrocartílago [343,344].

Injertos y trasplantes de condrocitos

La mosaicoplastia o el injerto osteocondral autólogo (OAT) (Imagen 7) es una técnica que persigue el relleno del defecto con fragmentos de cartílago hialino (también llamados “plugs”), que previamente se han obtenido de una zona de la misma articulación en la que no se carga peso [345]. La revisión sistemática más reciente demostró que, tras el OAT los signos clínicos de los pacientes con lesiones condrales mejoran significativamente, así como su movilidad. Además, estos efectos siguen siendo significativos a largo plazo [346]. Entre las principales desventajas del OAT se incluyen la dificultad de la técnica y la morbilidad en la zona donante. Por otro lado, los espacios que quedan entre los “*plugs*” osteocondrales se rellenan con tejido fibroso, que posteriormente se diferencia en fibrocartílago, de modo que no se logra la reparación homogénea del defecto. Esto podría ser la causa de que esta técnica pierda parte de su potencial terapéutico en lesiones de más de 2cm² [347-349]. El OAT proporciona mejores resultados clínicos que las MFX. Los pacientes que son tratados con el OAT se recuperan más rápido y presentan una tasa más alta de recuperación total de la función articular normal a largo plazo que los que son tratados con MFX. Alrededor del 93% de los pacientes sometidos al OAT, frente al 52% de los pacientes tratados con MFX, volvieron a practicar deporte al mismo nivel al que lo hacían previo a la lesión. Teniendo en cuenta estos datos, el OAT se recomienda como técnica de elección para el tratamiento de lesiones osteocondrales menores de 2cm² [350-353].

Los aloinjertos osteocondrales (OCAT) son una alternativa al OAT que resulta de especial utilidad en casos en los que se ha realizado cualquier otra técnica de reparación del cartílago y ha fracasado [354,355]. La principal ventaja de esta técnica es que evita la morbilidad de la zona donante y puede utilizarse para tratar defectos osteocondrales que son demasiado grandes como para beneficiarse del autoinjerto. Numerosos estudios han demostrado mejoras en la función articular tras el OCAT en pacientes con lesiones tanto focales como difusas, y la tasa de supervivencia del injerto es muy alta (82% a los 10 años y 74% a los 15 años). El principal inconveniente que presenta esta técnica es que el aloinjerto puede ser rechazado por el lecho receptor [356-358].

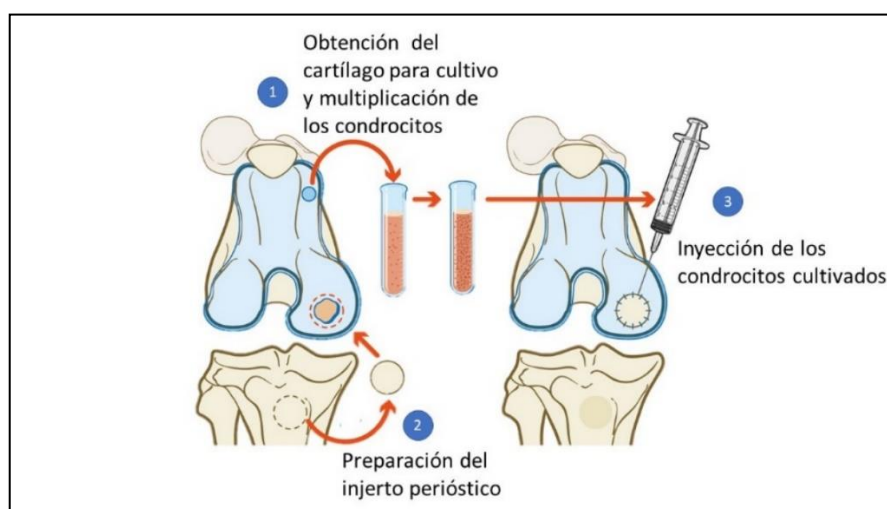
Imagen 7. Técnica de la mosaicoplastia.

Adaptada de Guía Servet de Manejo Clínico Osteoartritis [26].

El trasplante de condrocitos (ACI) (Imagen 8) es la técnica más novedosa en el tratamiento de lesiones osteocondrales y la más empleada actualmente para tratar defectos grandes de más de 3-4 cm². Para llevar a cabo esta técnica es necesario realizar dos cirugías, una primera en la que se obtiene una pequeña cantidad de cartílago hialino sano (200-300 mg) de una zona que no esté sometida a cargas, para posteriormente aislar y cultivar los condrocitos para su implantación; y una segunda cirugía para reimplantar los condrocitos en el defecto tras su expansión in vitro durante 4-6 semanas [359,360]. El ACI se categoriza en distintas generaciones dependiendo de cómo se cultivan los condrocitos y la técnica quirúrgica empleada [361]. En los ACI de primera generación, previo a la reimplantación de los condrocitos ya expandidos, se realiza un injerto perióstico, por lo general de la zona proximal medial de la tibia. La zona lesionada se prepara mediante su legrado para dejar un lecho receptivo al injerto perióstico, y éste se sutura cuidadosamente a los bordes del defecto para seguidamente realizar la inyección de las células cultivadas [362]. La principal complicación asociada a esta técnica es la hipertrofia del periostio, que causa dolor en aproximadamente el 25% de los pacientes [363,364]. Los ACI de segunda generación, también llamados implantes de condrocitos guiados por matriz (MACI) implican el cultivo de los condrocitos directamente en una matriz de colágeno tipo I o tipo III. Tras la expansión de los condrocitos y previo a la implantación de la matriz de colágeno, se realizan microfracturas en el SB expuesto para formar canales a través de los cuales las

células mesenquimales de la médula ósea (BMSCs) puedan llegar a la zona de la lesión; seguidamente, la membrana de colágeno se une al área del defecto por medio de suturas o utilizando un sellador de fibrina. La unión de la membrana de colágeno con los condrocitos autólogos, justo después de la realización de las microfracturas, promueve la regeneración del cartílago puesto que las BMSCs quedan selladas en la zona del defecto [365-368]. Esta técnica reduce el tiempo quirúrgico, puede realizarse mediante artroscopia y evita las complicaciones asociadas a la realización del injerto perióstico, por lo que permite una recuperación postquirúrgica más rápida [369,370]. A nivel histológico, tanto el ACI como el MACI originan un tejido de reparación más similar al cartílago hialino que al fibrocartílago. Además, ambas técnicas han demostrado ser mejores que la mosaicoplastia en cuanto a la recuperación de la función articular [364,367,371]. El ACI y el MACI se han empleado con éxito en el tratamiento de grandes defectos osteocondrales, de hasta 22cm². Además, se ha demostrado que en torno al 75% de los pacientes mejoran su movilidad tras la realización de estas técnicas quirúrgicas, y hasta el 71% de los ACI tienen una supervivencia superior a los 10 años [372-374]. La principal desventaja de esta técnica es que requiere un abordaje en dos tiempos quirúrgicos, el periodo de rehabilitación es largo y está asociada con un elevado coste económico [349].

Imagen 8. Trasplante de condrocitos autólogos.



Adaptada de Guía SERVET de Manejo Clínico Osteoartritis [26].

Artroplastia de escisión y artroplastia de interposición

La artroplastia de escisión es una técnica quirúrgica en la que se realiza la eliminación total o parcial de una de las superficies articulares, de modo que se evita el contacto de las superficies óseas en el momento de la carga y disminuye el dolor asociado a este roce. La técnica se describió originalmente para tratar artritis séptica de cadera en humanos, pero actualmente es más utilizada en traumatología veterinaria, especialmente en pacientes con OA de cadera, en la que se realiza la escisión de la cabeza femoral [375,376]. En Medicina Veterinaria, la técnica presenta mejores resultados en pacientes que pesan menos de 18kg, siendo los gatos y los perros pequeños los más beneficiados. La recuperación tras la cirugía es lenta, y la función articular máxima tarda en recuperarse en una media de 6 meses, o incluso más si se trata de pacientes crónicos. Entre los resultados observados en pacientes que han sido sometidos a la escisión de la cabeza femoral se incluyen disminución del grado de dolor, aumento de la carga en la extremidad tratada durante la marcha y una mejora general en la calidad de vida del paciente [375,377,378]. Las principales complicaciones asociadas a la técnica incluyen el acortamiento de la extremidad secundario a la inclinación de la pelvis, atrofia muscular y disminución de la amplitud de movimiento [379].

La artroplastia de interposición consiste en la resección de una de las superficies articulares y el posterior llenado del defecto creado con una estructura, para evitar que se produzca contacto directo entre dos superficies óseas. Entre los materiales de interposición se incluyen siliconas, metales, tendones, músculos, grasa, piel y fascia. Esta técnica es más empleada en Medicina Humana, especialmente en articulaciones pequeñas como la carpometacarpiana, la acromioclavicular, las metatarsofalángicas, la tarsometatarsiana y la talo-navicular [380-382]. La artroplastia de interposición es una técnica muy útil en el tratamiento de artritis postraumática de codo, sobre todo en pacientes jóvenes en los que se busca evitar la artroplastia de sustitución, y suele realizarse con aloinjertos del tendón de Aquiles o con autoinjertos de fascia lata. Los resultados de esta técnica a medio-largo plazo son positivos. Revisiones sistemáticas recientes han demostrado que tras la cirugía disminuye el dolor y aumenta la movilidad

de los pacientes significativamente. Además, se ha observado que el injerto tiene un periodo de supervivencia bastante amplio, lo que retrasa enormemente la necesidad de la realización de la artroplastia de sustitución. Las contraindicaciones para la realización de esta técnica incluyen pacientes mayores de 65 años en los que la artroplastia de sustitución está indicada, pacientes con deformidad e inestabilidad articular graves, y pacientes con artritis séptica [383-386]. También en el codo, se ha descrito la resección de la cabeza del radio combinada con la interposición del ancóneo con buenos resultados a medio-largo plazo [387,388]. En veterinaria, se han llevado a cabo artroplastias de interposición como variante a la artroplastia de escisión de la cabeza femoral, en las que se han utilizado colgajos del músculo glúteo profundo o una tira del músculo bíceps femoral. A pesar de que la técnica ha demostrado ser más efectiva en el control del dolor ambulatorio en perros grandes que la artroplastia de escisión, su uso rutinario no está recomendado y quedaría excluido para pacientes en los que la atrofia muscular es muy grave o en los que la artroplastia de escisión ha fallado [375,389-391].

Artrodesis

La artrodesis es una técnica quirúrgica en la que se busca la fusión de una articulación irrecuperable. El resultado de dicha técnica es irreversible, por tanto, es una técnica de última elección. La inducción de la osteosíntesis hipertrófica requiere un equilibrio complejo entre factores biológicos, la técnica quirúrgica en la que se prepara la zona de fusión, y la elección de injertos apropiados que permitan la correcta fusión ósea, teniendo en consideración el aporte sanguíneo, la osteología y la biomecánica articular [392].

En Medicina Humana la artrodesis de tobillo es la que mejores resultados ofrece. El 90% de los pacientes con OA grave tratados reportan estar satisfechos con el tratamiento dada la disminución del dolor y la rápida rehabilitación. La artrodesis de la articulación metatarsofalángica proximal también ha demostrado dar muy buenos resultados, y actualmente, es el tratamiento recomendado para la OA moderada y grave de esta articulación [393-396]. La artrodesis de hombro rara vez se utiliza, su uso queda reducido a pacientes en los que las artroplastias han fracasado o casos de artritis

inflamatoria en los que el manguito rotador está dañado [397,398]. En cuanto a la articulación del codo, es un procedimiento que se realiza en raras ocasiones ya que provoca un gran déficit funcional y queda únicamente reservado a pacientes con articulaciones muy inestables [399]. En pacientes con OA de muñeca localizada, se puede realizar una artrodesis parcial del carpo, sin embargo, si la articulación está afectada al completo, debe realizarse una artrodesis pancarpal. La artrodesis parcial del carpo proporciona mejores resultados que la artrodesis pancarpal en cuanto a funcionalidad articular, sin embargo, en lo que respecta a la mejora del dolor, ambas técnicas son similares [400-402]. Por último, la artrodesis de rodilla es una técnica que se emplea únicamente cuando la artroplastia de sustitución ha fallado [403]. En veterinaria, la artrodesis de carpo y tarso son las mejor toleradas por los pacientes y su funcionalidad es muy buena. Suele aplicarse en casos muy graves, en los que el tratamiento previo no ha sido efectivo [404-406].

Artroplastia de sustitución o reemplazo

En las artroplastias de sustitución, tras la resección de las superficies articulares afectadas, se realiza la sustitución de estas por una prótesis adaptada a la articulación. En la artroplastia de sustitución o reemplazo total se sustituyen las dos superficies articulares, mientras que en la parcial únicamente se reemplaza una superficie articular. La artroplastia de sustitución es la técnica quirúrgica que más beneficiosa resulta en pacientes con OA grave, en los que mejora drásticamente la calidad de vida al mejorar la amplitud de movimiento y reducir el dolor [392]. En la articulación del hombro, la artroplastia de sustitución total se considera la técnica de elección en pacientes con OA grave en los que el manguito rotador esté intacto, mostrando muy buenos resultados a largo plazo. La artroplastia de reemplazo parcial consiste en la sustitución únicamente de la superficie articular del húmero, y está especialmente indicada en pacientes en los que la masa ósea de la fosa glenoidea es muy pobre [407-409]. La artroplastia de reemplazo total de codo es la técnica de elección en pacientes con OA grave en los que las técnicas de interposición han fallado. Inicialmente, esta técnica fue descrita para el tratamiento de la artritis reumatoide, pero actualmente, se recomienda también para pacientes con OA que presenten dolor, inflamación,

limitaciones en el rango de movimiento articular y en los que la función del tríceps no esté alterada [410-412]. En cuanto a la artroplastia de reemplazo de cadera, se considera la técnica quirúrgica más efectiva para el tratamiento de OA grave. Los resultados que ofrece con excelentes, los pacientes se muestran muy satisfechos y reportan que su calidad de vida mejora notablemente tras la cirugía. Una alternativa al reemplazo total de cadera de especial utilidad en pacientes jóvenes es la artroplastia de superficie de la cadera, en la que, en lugar de sustituir la cabeza femoral por una prótesis, esta no se elimina y se recubre con un protector metálico [413-417]. La artroplastia total de reemplazo de rodilla es una de las técnicas quirúrgicas ortopédicas más costo-efectiva y segura. Es la técnica de elección en pacientes de cualquier edad con OA crónica y grave que afecta a los tres compartimentos (patelofemoral, femorotibial medial y femorotibial lateral) [418-421]. En pacientes en los que la OA se limita al compartimento femorotibial medial o lateral se puede realizar artroplastia parcial de rodilla. Estos implantes sustituyen las superficies articulares del cóndilo y la meseta tibial mediales (más comúnmente) o laterales. La principal ventaja de esta técnica es que es menos agresiva que el reemplazo total, pero los resultados a largo plazo son peores [422,423]. Otra opción es la artroplastia de reemplazo patelofemoral en pacientes en los que la OA está limitada a dicha articulación. Esta técnica puede ser útil en pacientes jóvenes, en los que ninguno de los otros compartimentos está afectado, sin embargo, algunos autores abogan por la realización de una artroplastia de reemplazo total de rodilla, ya que un alto porcentaje de pacientes sometidos a artroplastias parciales acaban necesitando artroplastias totales [424,425].

En veterinaria no es muy común realizar este tipo de cirugías, aunque actualmente hay disponibles prótesis de cadera, rodilla, tarso y codo. De todas ellas, la más extendida es la prótesis de cadera que hasta la fecha ha reportado muy buenos resultados. Sin embargo, el elevado coste de los implantes hace que los propietarios prefieran otras técnicas que proporcionan resultados similares, como la artroplastia de escisión femoral [426,427].

Terapias regenerativas

Dado el aumento de la esperanza de vida, los cambios degenerativos a nivel musculoesquelético entre los que se incluyen la pérdida de densidad ósea, la laxitud de los ligamentos y tendones y los cambios osteoartrósicos se han convertido en las últimas décadas en un enorme problema médico, con consecuencias importantes tanto a nivel económico como a nivel social. Debido al impacto que producen, la comunidad investigadora ha realizado grandes esfuerzos para encontrar terapias regenerativas que sean apropiadas para el tratamiento de lesiones óseas, tendinosas, musculares y condrales [428].

La medicina regenerativa se define como un campo de la investigación biomédica novedoso y creciente cuyo objetivo principal es reemplazar, restaurar y regenerar células, tejidos y órganos dañados. El uso de la medicina regenerativa en el campo de la traumatología incluye distintos abordajes como los tratamientos con células madre mesenquimales y GF [429].

Células Madre Mesenquimales

Las MSCs son células madre especializadas que tienen un gran potencial en la ingeniería tisular del hueso y en la medicina regenerativa debido a su capacidad de autorrenovación y diferenciación. Son células multipotentes, con poca inmunogenicidad y que se pueden obtener fácilmente a partir de distintos tejidos como la médula ósea, la grasa, el cordón umbilical, la placenta, la sinovia, el periostio y la pulpa dental (Imagen 9). Además, poseen capacidad para diferenciarse en numerosos tipos celulares, como los adipocitos, los miocitos, los osteoblastos o los condrocitos [430].

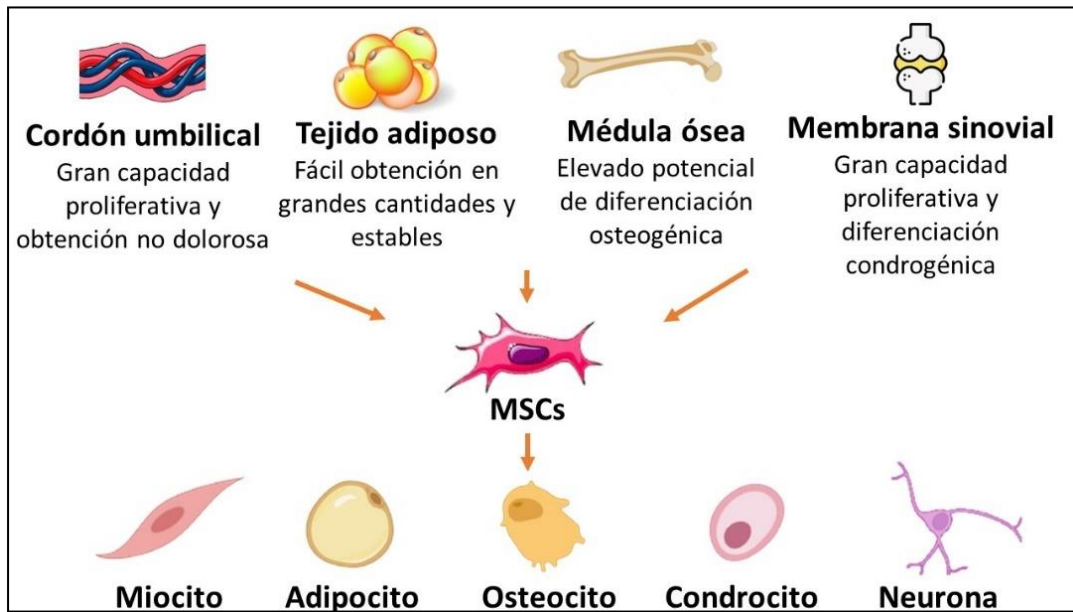
La médula ósea fue el primer sitio de extracción de MSCs. Después de años de estudios en animales, el aislamiento y expansión de las BMSCs humanas se llevó a cabo por primera vez en 1992 [431,432]. La seguridad y efectividad de estas células se ha confirmado en numerosos estudios clínicos, lo que las ha convertido en la fuente más común de MSCs. Las BMSCs tienen un marcado potencial de diferenciación, el análisis de la expresión génica demostró que expresan más genes relacionados con la diferenciación osteogénica que las MSCs procedentes de otros tejidos [433]. No obstante, existen ciertas limitaciones, la más importante es que el potencial de diferenciación y reparación depende, en gran medida, de las características del donante, como la edad y la presencia de patologías asociadas [434]. Además, el cultivo de las BMSCs es un proceso costoso e ineficiente, ya que solo alrededor del 0.001-0.01% de las células de la médula ósea son MSCs. Por todo ello, muchos investigadores se han esforzado en identificar nuevas fuentes de MSCs que requieran técnicas menos invasivas y produzcan mejores resultados [435,436].

El cordón umbilical se identificó como una fuente alternativa para la obtención de MSCs en el año 2000. Las MSCs derivadas del cordón umbilical (UCSCs) poseen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse de forma rápida, promoviendo así la reparación del tejido y modulando la respuesta inmune. Además, el acceso a estas células es muy sencillo y el proceso de extracción es indoloro [437]. Las UCSCs, tienen una tasa de proliferación muy elevada, aproximadamente tres o cuatro veces superior a la de las MSCs de otras procedencias [438,439]. Sin embargo, estas células también tienen algunas características poco deseables, como la facilidad con la que sufren cambios morfológicos o la menor eficiencia para adherirse a la zona de la lesión [440,441].

En el año 2001, el tejido adiposo fue identificado como otra fuente prometedora de MSCs dada su accesibilidad y abundancia. Las células AMSCs pueden ser extraídas en grandes cantidades, ya que su concentración en el tejido adiposo es muy alta (hasta 500 veces superior a la concentración de BMSCs en la médula ósea), por medio de un procedimiento relativamente sencillo que solo requiere anestesia local [442]. Otra ventaja es que las AMSCs son muy estables tanto genética como morfológicamente y se pueden obtener de distintas localizaciones, como la grasa subcutánea, la grasa de las almohadillas de Hoffa o la grasa orbitaria. La expresión génica de las AMSCs varía en función de la zona de extracción, sin embargo, no se conoce si existe alguna asociación entre estas diferencias y el potencial terapéutico [435,443].

Las localizaciones previamente mencionadas representan los tejidos más comunes para la extracción de MSCs, pero existen otras localizaciones como la membrana sinovial. Las MSCs derivadas de la membrana sinovial (SMSCs) fueron por primera vez aisladas en 2001 y pueden ser extraídas de distintos sitios, como la cavidad cotiloidea, el rodete glenoideo o el rodete acetabular [444,445]. Las SMSCs tienen una gran capacidad proliferativa y baja inmunogenicidad en comparación a las AMSCs o las MSCs [446]. Además, tienen mayor potencial condrogénico al expresar en mayor medida el colágeno tipo II y el agregano, por lo que se recomiendan para el tratamiento de lesiones condrales [447-449]. La principal desventaja de las SMSCs es que no se pueden obtener en grandes cantidades [450].

Imagen 9. Origen y diferenciación de las células madre mesenquimales.



MSCs: Células madre mesenquimales

Las MSCs producen sustancias inmunorreguladoras y antiinflamatorias que potencian la regeneración tisular. La OA se caracteriza por el flujo de células inmunes, principalmente monocitos, macrófagos y linfocitos T hacia la sinovia. Así mismo, la sinovia de pacientes con OA contiene mastocitos, células “natural killer”, células dendríticas, linfocitos B y granulocitos. Existen tres vías por las que las MSCs intervienen en la respuesta inmune producida en la OA. En primer lugar, suprimen el desarrollo de células dendríticas maduras y disminuyen la citotoxicidad de las células “*natural killer*”, controlando así la respuesta inmune innata [451,452]. En segundo lugar, modifican la inmunidad adquirida previniendo la apoptosis celular y ralentizando el desarrollo de linfocitos T y B [453,454]. Por último, las MSCs son capaces de modificar el fenotipo de los macrófagos desde el fenotipo proinflamatorio (M1), que promueven la síntesis de IL-1 y TNF- α , al fenotipo restaurador (M2), que tienen un efecto antiinflamatorio y condroprotector al estimular la producción de IL-10 y TGF- β , reduciendo así la inflamación periarticular. Además, las MSCs tienen capacidad para suprimir la respuesta inmune patológica y mejorar la función de las células locales [455-457]. Sin embargo, se desconoce el mecanismo completo por el cual las MSCs

promueven la reparación del AC. En algunos estudios se ha observado que las MSCs potencian el reclutamiento de células progenitoras y la diferenciación del cartílago al secretar sustancias que promueven la proliferación y el anabolismo de los condrocitos. Por otro lado, algunos factores producidos por las MSCs afectan a la sinovia y a los condrocitos encargados del metabolismo del cartílago, y aumentan la síntesis de mediadores relacionados con la condrogénesis [458-461].

Actualmente, no existe un consenso en cuanto a la concentración de MSCs apropiada para obtener el efecto terapéutico deseado. En estudios en los que emplean MSCs alogénicas, los grupos tratados con dosis más bajas han mostrado menos dolor y mejor funcionalidad de la articulación afectada, así como mayor grado de reparación del AC evaluado mediante RM, que los grupos tratados con dosis más altas [462-465]. Algo similar ocurre cuando se emplean MSCs autólogas, dosis más altas no resultan necesariamente en mejores efectos terapéuticos. En un estudio en el que emplearon tres dosis distintas (2×10^6 , 10×10^6 y 50×10^6) se observó una mayor disminución del dolor y mejora en la movilidad en el grupo tratado con la dosis más baja, mientras que el grupo de la dosis más alta reportó mayor grado de dolor y limitaciones en la funcionalidad articular [466]. Sin embargo, en otro estudio en el que se aplicaron dosis bajas, medias y altas de MSCs (1×10^7 , 2×10^7 y 3×10^7 respectivamente) se observó un mayor aumento del volumen del AC a largo plazo en el grupo en el que se administró la dosis media [467]. Por otro lado, otro estudio mostró que a corto-medio plazo, dosis más altas (100×10^6) de MSCs proporcionan mejores resultados clínicos, sin embargo, a largo plazo, dosis bajas (10×10^6) reducen más los niveles de dolor [468,469]. Por el contrario, otros autores han reportado mejores resultados en cuanto a la disminución de dolor e incremento en la funcionalidad cuando se emplean dosis altas de MSCs [470,471].

Generalmente, las MSCs se aplican directamente en la cavidad articular por medio de inyecciones IA. Esta técnica promueve la regeneración del cartílago mediante la diferenciación directa de las MSCs en condrocitos y la estimulación para que éstos produzcan la MEC que rellena el defecto [472]. Las inyecciones IA de MSCs han demostrado potenciar la regeneración del cartílago en numerosos modelos animales. En un estudio llevado a cabo por Cui *et al.* el análisis histológico del AC, en un modelo

de OA inducida quirúrgicamente en ratas, concluyó que una única inyección IA de MSCs favoreció la regeneración del AC e inhibió la progresión de la OA. Además, mediante PCR se confirmó la presencia de colágeno tipo II en el tejido de reparación [473]. Por otro lado, He *et al.* utilizaron el mismo modelo animal y concluyeron que la inyección IA de MSCs disminuía los niveles sinoviales de MMP13 al mismo tiempo que aumentaba la expresión génica de COL2A1, el gen encargado de regular la síntesis de colágeno tipo II [474]. Recientemente, los resultados histológicos y macroscópicos publicados por Yang *et al.*, tras la inyección IA de AMSCs en un modelo de ratas con OA, han demostrado que el AC de las ratas tratadas con AMSCs mostró características muy similares a las del cartílago sano, mientras que en el grupo control el AC se describió como gravemente dañado, inflamado, con una pérdida importante de su grosor e infiltración de células inflamatorias. Así mismo, los niveles séricos de 1L-1 β fueron significativamente más altos en el grupo control que en el grupo tratado con una inyección IA de MSCs, tanto 7 como 14 días tras la inyección [475]. Por otro lado, Li *et al.* realizaron un estudio en el que se administraron MSCs de forma IA en conejos con una lesión osteocondral. A las 12 semanas tras la infiltración, los animales fueron sacrificados y se realizó la evaluación macroscópica e histológica del defecto, así como una evaluación mediante RM. A nivel macroscópico, tanto los animales incluidos en el grupo control como los del grupo tratados con MSCs mostraron un llenado completo del defecto. En cuanto a la evaluación histológica, el tejido de reparación se describió como cartílago hialino prácticamente sano, con una estructura, morfología y composición adecuada. Por último, la evaluación mediante RM mostró que en los animales tratados con MSCs, el llenado del defecto estaba en línea con el AC adyacente y la intensidad de la señal fue normal, además, la lámina basal subcondral se mostró intacta [476]. En contraposición a estos resultados, Ozeki *et al.* realizaron un estudio en el que compararon el efecto de una única inyección IA de MSCs frente a la inyección semanal de MSCs, sin especificar durante cuantas semanas y los resultados histológicos mostraron que una única inyección de MSCs no fue efectiva en el tratamiento de la OA en ratas, mientras que las inyecciones semanales mostraron efectos condroprotectores. En el grupo en el que se realizó una única inyección IA los resultados macroscópicos e histológicos fueron similares a los obtenidos en el grupo control. A las 8 semanas se apreciaron lesiones

significativas en el AC, que a las 12 semanas habían empeorado significativamente. Por el contrario, en el grupo tratado con inyecciones semanales de MSCs, la escala OARSI fue significativamente mejor que en los otros grupos. Además, la inmunohistoquímica mostró mayor cantidad de colágeno tipo II en los animales tratados semanalmente. En cuanto a la inflamación y el grado de sinovitis, se realizó un examen de la membrana sinovial y los autores concluyeron que los animales del grupo control y los tratados con una única inyección de MSCs presentaron hiperplasia de la membrana sinovial y más infiltración de células inflamatorias [477]. Van Buul *et al.* realizaron un estudio en un modelo en ratas con OA que fueron tratadas con una única inyección IA de MSCs. Cuatro semanas tras la inyección evaluaron el dolor mediante un medidor de capacitancia y, las ratas tratadas con MSCs, cargaban más peso en la extremidad afectada que las ratas del grupo control. Sin embargo, a nivel histológico, no se observaron diferencias significativas en cuanto al daño observado en el cartílago o la inflamación sinovial. Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con MSCs en cuanto a los cambios apreciados mediante μ TAC en el SB, por lo que concluyeron que las MSCs no son capaces de reparar las lesiones del AC o del SB [478].

Los buenos resultados obtenidos en modelos experimentales han posibilitado el empleo de inyecciones IA de MSCs en ensayos clínicos. En el campo de la veterinaria, las AMSCs han sido ampliamente estudiadas como parte del tratamiento de la OA en perros y los resultados demuestran que las AMSCs son capaces de disminuir el grado de cojera y dolor, así como aumentar la amplitud de movimiento y la funcionalidad de la extremidad afectada [9,479-481]. Además, en un estudio llevado a cabo por Kriston-Pal *et al.* se realizó una biopsia del tejido de reparación y el análisis histológico confirmó que se trataba de cartílago hialino [482]. Hunakova *et al.* realizaron un estudio en con perros con OA de codos, y analizaron la concentración de diferentes biomoléculas pro- y antiinflamatorias en el SF antes y después de la infiltración IA de AMSCs. La concentración sinovial de MMP-3, IL-6 y TNF- α disminuyó significativamente a los 42 días tras la infiltración, mientras que la concentración del inhibidor de las metalopeptidasas (TIMP1) aumentó significativamente en comparación con los niveles

basales. Así mismo, la administración IA de AMSCs produjo también una disminución de los niveles de IL-8, IL-2, IL-12 e IFN- γ en el SF 42 días tras la inyección [483].

En cuanto a Medicina Humana, son muchos los estudios clínicos en los que se han empleado MSCs de distintos orígenes y que han reportado muy buenos resultados. El estudio de una serie de casos en el que se incluyeron 9 pacientes con OA de rodilla y se evaluaron un total de 11 rodillas puso de manifiesto que una única inyección IA de AMSCs autólogas es un método seguro y eficiente para tratar la OA. Tanto 6, como 12 y 18 meses tras la inyección IA, se observó una mejora significativa en los signos clínicos valorados por medio de distintas escalas como la escala “*Knee Society Score*” de rodilla (KSS), la escala Tegner-Lysholm, o la escala visual analógica (VAS) de dolor; además, se realizó una evaluación del cartílago mediante RM utilizando la escala “*Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue*” (MOCART) y se observó una reparación significativa del cartílago [484]. Por otro lado, un metaanálisis llevado a cabo por Yubo *et al.* demostró que la inyección IA de MSCs (con dosis celulares comprendidas ente 1×10^6 y 1.5×10^8) es segura y tiene potencial terapéutico en pacientes con OA de rodilla. En el estudio se incluyeron 582 pacientes, de todos ellos, 444 fueron tratados con BMSCs, 94 con AMSCs, 49 con MSCs derivadas de la sangre periférica y 14 con SMSCs. El grado de dolor y la funcionalidad articular fueron evaluados por medio de la escala VAS, escala “*Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*” (WOMAC), índice de Lequesne, escala Lysholm de rodilla y escala de actividad de Tegner. Los resultados mostraron que el tratamiento con MSCs ofrece resultados favorables tanto a los 12 como a los 24 meses tras la infiltración IA [485]. Otro metaanálisis llevado a cabo por Cui *et al.* obtuvo resultados similares. Se incluyeron 565 pacientes con OA de rodilla y la inyección IA de MSCs alivió los síntomas asociados a la patología, incluyéndose la reducción del dolor valorado por la escala VAS y la mejoría funcional basándose en los resultados de las escalas WOMAC y Lysholm. En este caso, se observó que los efectos beneficiosos fueron apreciables hasta 2 años después de la administración del tratamiento [486]. Awad *et al.* realizaron un metaanálisis en el que se incluyeron 724 pacientes y concluyeron que la administración IA de BMSCs en pacientes con OA de rodilla reduce significativamente el dolor, evaluado mediante la escala VAS, y mejora la función articular, evaluada por

medio de la escala de actividad de Tegner y el índice de Lysholm [487]. En el estudio de Han *et al.*, los resultados de la escala VAS de dolor fueron significativamente mejores a los 6, 12 y 24 meses tras la infiltración con BMSCs en comparación con los grupos control. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos en la escala WOMAC y el índice de Lysholm. Sin embargo, tras la inyección IA de AMSCs los resultados obtenidos en la escala VAS de dolor y en la escala WOMAC fueron significativamente mejores a los 6, 12 y 24 meses tras la infiltración. Los resultados muestran que las AMSCs tienden a ser superiores que las BMSCs en el tratamiento de la OA de rodilla [488]. Estos resultados son similares a los publicados por Zhou *et al.* quienes concluyeron que las AMSCs tienen un efecto terapéutico más estable que las BMSCs [489]. En otro estudio llevado a cabo por Wang *et al.* se incluyeron 256 pacientes, de los cuales 67 fueron tratados con AMSCs, 163 con BMSCs y 26 con UCSCs; y fueron comparados con un grupo placebo (infiltración IA con suero salino fisiológico estéril) o un grupo control (infiltración IA con HA). Los resultados concluyeron que la administración IA de MSCs mejora los resultados obtenidos en la escala VAS de dolor y en la escala WOMAC, sin embargo, la evaluación de la articulación mediante RM no mostró diferencias entre los grupos MSCs, control y placebo en la escala WORMS [490]. Sin embargo, en una revisión bibliográfica llevada a cabo por Ha *et al.* 9 de los 11 estudios analizados reportaron mejoras en el AC observables mediante RM, así como por medio de artroscopia [491]. En un estudio de Lu *et al.* se comparó el efecto de la inyección IA de AMSCs con la inyección IA de HA. En comparación con el grupo tratado con HA, más pacientes tratados con AMSCs alcanzaron una mejoría del 50% en la escala WOMAC y del 70% en la escala VAS de dolor 12 meses tras la inyección IA. Así mismo, mediante RM se observó que el volumen del AC de las rodillas tratadas con AMSCs aumentó significativamente en comparación con el de los pacientes tratados con HA [464].

A pesar de los buenos resultados reportados con la inyección IA de MSCs, algunos autores abogan por la necesidad de una estructura tridimensional en la que se combinen biomateriales que puedan promover el crecimiento de las MSCs. Entre estos biomateriales se incluyen los hidrogeles, formados por varios polímeros naturales o sintéticos, que son capaces de retener grandes cantidades de agua e imitar la

naturaleza del cartílago hialino para optimizar la diferenciación condrogénica de las MSCs [492]. Los hidrogeles facilitan la diferenciación condrogénica, mantienen el fenotipo condrogénico y limitan la hipertrofia condrogénica de las MSCs [493-496]. Tanto para el tratamiento de defectos osteocondrales como para el tratamiento de la OA se suelen utilizar hidrogeles de HA cargados con BMSCs o AMSCs y ambos tratamientos han reportado muy buenos resultados a nivel experimental. Numerosos estudios en modelos animales han demostrado que los hidrogeles de HA cargados con MSCs son superiores a la infiltración IA de HA o MSCs por sí solas. A nivel histológico, se ha observado que el tratamiento con hidrogeles de HA con AMSCs o BMSCs da lugar a un tejido de reparación de mejor calidad y más similar al cartílago hialino sano; a nivel radiográfico, se ha observado menor pérdida de cartílago y menos fibrilaciones de la superficie articular; por último, a nivel clínico, se han demostrado mejorías en la sintomatología asociada a la OA [497-501]. Se han estudiado también otros tipos de hidrogeles en los que se pueden cargar las MSCs, como los de gelatina, alginato, poliglucosamina, quitosan y colágeno, y los resultados obtenidos son comparables a los descritos cuando se utilizan hidrogeles de HA [501-504]. Algunas limitaciones asociadas al uso de hidrogeles incluyen la toxicidad asociada a la degradación del hidrogel, dificultad para transmitir las cargas, y la alteración del fenotipo celular [361]. A pesar de las ventajas ofrecidas por los hidrogeles a nivel experimental, a nivel clínico varios autores han manifestado que la inyección IA de MSCs es comparable al uso de MSCs en hidrogeles, y en ambos casos, facilitan la reparación y regeneración del cartílago. Estos efectos son detectables a través de RM, apreciándose un aumento en el volumen del cartílago, o por medio de la artroscopia, en la que se observa un buen llenado del defecto, y una superficie articular lisa, sin grietas ni fibrilaciones [465,470,505-507]. Los resultados de un metaanálisis llevado a cabo por Lijima *et al.* en el que se incluyeron un total de 2385 pacientes con OA de rodilla demostraron que el tratamiento con MSCs por medio de inyecciones IA o mediante la implantación artroscópica de hidrogeles, mejoró significativamente el grado de dolor, la función física y la calidad del cartílago de reparación. Sin embargo, la terapia con MSCs mostró un efecto limitado sobre el volumen del cartílago. No se reportaron efectos adversos

graves, aunque algunos pacientes manifestaron dolor o inflamación articular tras el tratamiento [508].

Por otro lado, más recientemente, algunos autores han propuesto la inyección IO de BMSCs para tratar las lesiones de la médula ósea del SB asociadas a la OA, o la OA secundaria a la osteonecrosis de la rodilla y, han demostrado, que esta vía de administración es segura y proporciona mejores resultados que la IA en el control del dolor [15,16,509]. La técnica fue descrita por Hernigou *et al.* en un estudio en el que compararon la artroplastia de sustitución con la inyección IO de MSCs en pacientes con OA secundaria a osteonecrosis de rodilla. Se incluyeron un total de 60 pacientes con OA bilateral, y en una rodilla se realizó una artroplastia de sustitución mientras que en la contralateral se llevó a cabo la infiltración IO de BMSCs. Menos rodillas tratadas con las MSCs necesitaron ser reintervenidas en comparación con las que fueron tratadas con la artroplastia de reemplazo, además, 21 de los 30 pacientes reportaron sentir menos dolor y mejor movilidad en la rodilla tratada con la infiltración IO de BMSCs [509]. Los autores concluyeron que la inyección IO de BMSCs ejerce un efecto significativo en cuanto a la disminución del dolor, de modo que se consigue postponer o incluso evitar la artroplastia de sustitución a largo plazo [15].

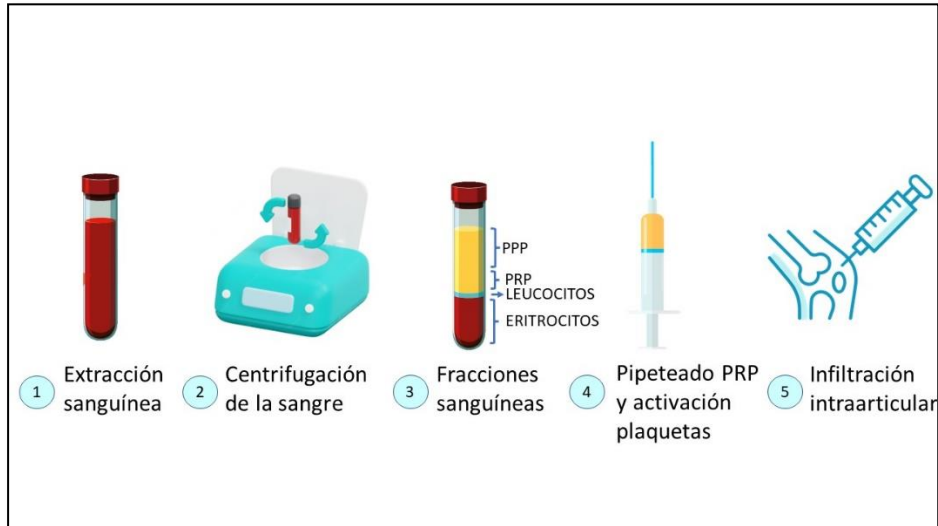
Plasma Rico en Factores de Crecimiento

El PRP se define como un producto biológico autólogo, derivado de la sangre, y en el que, tras su centrifugación, se obtiene una fracción plasmática con una concentración de plaquetas mayor a la de la sangre periférica. Además de los GF contenidos en los gránulos- α de las plaquetas y liberados tras su degranulación, el PRP contiene también proteínas como la fibronectina, la vitronectina y el fibrinógeno, que desempeñan un papel importante durante el proceso de reparación y regeneración condral [510] (Imagen 10).

Dentro del término PRP se engloban un gran número de preparados sanguíneos autólogos que difieren en el protocolo de preparado y procesado del PRP y, por tanto, en las características cuantitativas y cualitativas de este, como la concentración plaquetaria, el tipo de anticoagulante empleado, el número de centrifugaciones

necesarias para la obtención del PRP y la velocidad de estas, el tipo de activador plaquetario y la presencia o ausencia de leucocitos y eritrocitos. Por este motivo, existe cierta controversia con respecto a la nomenclatura y definición del PRP [511-513].

Imagen 10. Proceso de obtención y procesado del plasma rico en plaquetas.



PPP: plasma pobre en plaquetas, PRP: plasma rico en plaquetas.

El término Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) fue acuñado por Anitua *et al.* y hace referencia a un producto autólogo, elaborado partiendo de la sangre del propio paciente tras una única centrifugación y en el que se emplea citrato sódico como anticoagulante y cloruro cálcico como activador plaquetario. Se caracteriza por presentar una concentración de plaquetas moderada, entre 2 y 3 veces superior a la de la sangre periférica, y la ausencia de leucocitos y eritrocitos. El PRGF System® es un medicamento autorizado en Europa para su aplicación en diversas especialidades médicas. La tecnología empleada es pionera en el desarrollo de protocolos específicos para la regeneración tisular y la primera técnica 100% autóloga del mercado. Entre las ventajas que ofrece el PRGF sobre otros productos de PRP se incluyen las siguientes: es un producto con propiedades bacteriostáticas, no posee leucocitos y por tanto no tiene actividad proinflamatoria, es un producto versátil con diferentes opciones de aplicación disponibles (gel, colirio, inyectable, coágulo, membrana o injertos), es seguro y no tiene

efectos adversos, y su proceso de obtención es corto, ya que solo requiere una única centrifugación de 8 minutos [514].

Los GF son proteínas de señalización que influyen el metabolismo de otras células. Fueron descritos por primera vez por Canalis en 1988 y los definió como un grupo de sustancias polipeptídicas solubles y difusibles que actúan como agentes reguladores del crecimiento, diferenciación, proliferación y metabolismo celular de numerosos tipos de células. Son capaces de inducir la migración de otros tipos celulares hasta el lugar de la lesión al ejercer un efecto quimiotáctico, favoreciendo así el proceso de reparación y regeneración de distintos tejidos [515,516].

Los GF liberados tras la degranulación de las plaquetas proporcionan las señales iniciales para la activación de las células integrantes de los tejidos que rodean la zona. Como respuesta a estas señales, las células del propio tejido se ven sometidas a cambios en la proliferación, diferenciación y síntesis de proteínas con distintas funciones biológicas [517]. Entre los principales factores de crecimiento liberados se incluyen: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), TGF- β , factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado del hueso (BDGF), IGF-1, TNF- α , y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) [518]. El TGF- β es importante para la condrogénesis al inducir la proliferación celular en el cartílago, la diferenciación osteocondrogénica y al aumentar la expresión génica de agregano y colágeno tipo II [519]. Por otro lado, el PDGF estimula la proliferación celular y la producción de proteoglicanos [520], y el FGF induce la proliferación de los condrocitos y de MSCs [521]. Además, las plaquetas contienen también citocinas e inmunomoduladores.

Como resultado de su naturaleza antiinflamatoria y su papel en la cicatrización de los tejidos, han sido objeto de estudio para el tratamiento de la OA [522,523]. Varios autores han demostrado que las plaquetas promueven la cicatrización de los tejidos y modulan la inflamación, tanto *in vitro* como *in vivo* [524-526]. Un estudio comparó el cartílago y la membrana sinovial de pacientes en los que se había realizado una artroplastia de sustitución de rodilla tras haberse cultivado con PRP o con HA. En el grupo PRP se observó un aumento en la expresión génica del agregano y una

disminución del COL1A1, un gen implicado en la síntesis de colágeno tipo 1, en comparación con el grupo HA. En ambos grupos se observó una disminución en la concentración de TNF- α y de IL-1 β . Por otro lado, no se observaron diferencias entre grupos en la expresión de MMP-13 por parte del cartílago, pero sí por parte de la membrana sinovial, que mostró una expresión de MMP-13 menor en el grupo PRP [527].

En cuanto a la Medicina Veterinaria, un estudio reciente llevado a cabo por Gines *et al.* ha evaluado el efecto del PRP en los niveles de TNF- α e IL-6 del SF de perros con OA de rodilla secundaria a la ruptura del ligamento cruzado craneal. Los resultados muestran que entre 20 y 28 días después de la infiltración, la concentración de leucocitos en el SF se redujo un 99.7% y, los niveles de IL-6 y TNF- α disminuyeron más en el grupo L-PRP que en el grupo control [528]. Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Alves *et al.* se incluyeron 15 perros de trabajo con OA bilateral de cadera y fueron tratados con una única inyección IA de PRP. La respuesta al tratamiento se evaluó en un periodo comprendido entre los 15 días y los 5 meses tras la inyección del tratamiento, mediante las escalas “*Canine Brief Pain Inventory*” (CBPI), “*Liverpool Osteoarthritis in Dogs*” (LOAD), “*Canine Orthopedic Index*” (COI) y la escala analógica visual de Hudson (HVAS). Los resultados muestran mejorías en todas las escalas evaluadas y en todos los tiempos del periodo de seguimiento en comparación con los resultados obtenidos previo a la inyección IA de PRP, por lo que los autores concluyen que una única inyección IA de PRP produce mejorías significativas en cuanto al dolor y la funcionalidad articular que perduran durante al menos 5 meses [529]. Seguidamente, este mismo grupo de trabajo realizó un estudio en el que se incluyó un grupo tratado con dos inyecciones IA de PRP, y un grupo control en el que se realizaron dos inyecciones IA de suero salino fisiológico estéril separadas por un periodo de 14 días. Los resultados de las escalas CBPI, LOAD, COI y HVAS pusieron de manifiesto que la infiltración IA de PRP proporciona resultados significativamente mejores que los obtenidos en el grupo control durante un periodo de al menos 6 meses [530]. Venator *et al.* realizaron un estudio para evaluar el efecto de una única infiltración IA de PRP en la rodilla de perros con OA secundaria a la ruptura del ligamento cruzado anterior evaluando el pico de fuerza vertical (PVF) y el impulso vertical (VI) utilizando una

plataforma de presión, y concluyeron que, tras el tratamiento, se observaron cambios cinemáticos significativos durante un mínimo de 4 meses, y en algunos casos, de hasta 12 meses [531]. Cuervo *et al.* evaluaron estos mismos parámetros en perros con OA de cadera. Los animales fueron divididos en dos grupos, en uno de ellos se realizó una infiltración IA de PRP, mientras que en el otro grupo la inyección de PRP se combinó con un protocolo fisioterapéutico. En comparación con los resultados obtenidos antes de la infiltración, ambos grupos mostraron mejores resultados biomecánicos tanto a los 30, como a los 90 y 180 días tras el tratamiento. Sin embargo, 180 días después, el grupo en el que sólo se aplicó el PRGF mostró una disminución del PVF y del VI con respecto a los valores obtenidos a los 90 días, mientras que en el grupo en el que se realizó la inyección de PRGF junto con el protocolo fisioterapéutico, los valores del PVF y del VI permanecieron elevados [532]. El efecto del PRP alogénico como parte del tratamiento de la OA canina ha sido también estudiado por Catarino *et al.* Los perros incluidos en el estudio fueron evaluados para valorar el grado de cojera tanto al paso como al trote (clasificada en 5 niveles) y el nivel de dolor (también catalogado en 5 grados) antes de la infiltración con PRP y 30, 60 y 90 días tras el tratamiento. Todos los animales presentaron mejoras significativas en ambos parámetros tanto 30 como 60 días tras la aplicación del tratamiento, y el 80% de los perros presentaron una disminución de 3 niveles en el grado de cojera 90 días después de la inyección IA con PRP. Así mismo, en cuanto al dolor, a los 30 días tras la infiltración el 100% de los perros presentaron una reducción del dolor de grave o moderado a leve, mientras que 90 días después el 60% de los perros no presentó ningún grado de dolor [533].

En Medicina Humana, Lacko *et al.* investigaron el efecto de tres inyecciones IA de PRP en pacientes con OA unilateral de rodilla. En la revisión tres meses después de la última inyección, los pacientes mostraron mejoría en las escalas WOMAC y VAS para el dolor. Además de estos resultados, se observó una reducción significativa de marcadores proinflamatorios como MMP-1, IL-1 y TNF- α , junto con un incremento de los niveles de marcadores pro anabólicos como la COMP o el colágeno tipo II [534]. Por otro lado, Tang *et al.* realizaron un estudio en el que compararon la inyección IA de PRP con la inyección IA de HA en pacientes con OA. Llegaron a la conclusión de que la inyección de PRP reduce el dolor de forma más efectiva que el HA, así como

proporciona mejor recuperación de la funcionalidad de la articulación en un periodo de seguimiento comprendido entre 1 y 12 meses. Sin embargo, en cuanto a los efectos adversos, no encontraron diferencias entre grupos [535]. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Wu et al. que observaron que, en comparación con el HA, el PRP da lugar a resultados significativamente mejores en las escalas IKDC y WOMAC de funcionalidad articular y en la escala VAS de dolor [536]. Además de haber comparado el efecto del PRP con el del HA en el tratamiento de pacientes con OA, en un estudio realizado por Trams et al. se ha comparado también la efectividad de las inyecciones IA de PRP frente a la de corticosteroides y la técnica quirúrgica de microfracturas. Los resultados en las escalas IKDC, WOMAC de dolor y funcionalidad, y la escala VAS de dolor fueron significativamente mejores en el grupo PRP que en los grupos tratados con HA, corticosteroides y microfracturas. Sin embargo, en cuanto a la escala KOOS, no se observaron diferencias significativas entre grupos [537]. En esta misma línea, Kon *et al.* realizaron un estudio en el que compararon la inyección IA de PRP con la de HA, corticoesteroides o placebo y se observó que el PRP ofrecía resultados significativamente mejores en cuanto al control del dolor y al aumento de la función articular, sobre todo en la revisión realizada 12 meses después de la administración del tratamiento [523]. Estos resultados son similares a los obtenidos recientemente por Ferrara *et al.* en una revisión sistemática en la que concluyeron que las inyecciones IA de PRP reducen el dolor y mejoran el grado de movimiento articular en mayor medida que las inyecciones IA de corticosteroides o HA en pacientes con OA de cadera [538].

Por otro lado, en lo que respecta al uso de PRP por sí solo o en combinación con HA (PRP + HA), Xu *et al.* publicaron un estudio clínico en el que se comparaban ambos para el tratamiento de la OA de rodilla. Se cuantificaron los niveles de IL-1 β , TNF- α y MMP-3 en el SF y, además, se realizó un examen de la sinovia y el AC con un Doppler de alta frecuencia y color. Así mismo, se evaluaron escalas de dolor y funcionalidad entre las que se incluyeron la VAS, WOMAC y el índice de Lysholm, así como las complicaciones asociadas a la intervención. A los 24 meses tras la infiltración, el grupo PRP + HA mostró mejores resultados en cuanto al control del dolor y a la mejora de la funcionalidad articular que el PRP o el HA por sí solos. Con respecto a los resultados obtenidos tras la

evaluación de la sinovia y el AC, 6 y 12 meses después del tratamiento la hiperplasia sinovial mejoró tanto en el grupo PRP como en el grupo PRP + HA, mientras que, a los 12 meses, esta mejoría solo fue apreciable en el grupo PRP + HA. En cuanto a la concentración de IL-1 β , TNF- α y MMP-3 en el SF, se observó una disminución significativa en ambos grupos, aunque en el grupo PRP + HA se apreció mayor grado de inhibición. Por tanto, los autores concluyeron que la combinación de PRP con HA es más efectiva que el PRP o el HA por sí solos en la inhibición de la inflamación sinovial y puede mejorar de forma efectiva el dolor y la funcionalidad en pacientes con OA de rodilla [539]. Siguiendo esta misma línea de trabajo, un metaanálisis reciente llevado a cabo por Zhang *et al.* en el que se incluyeron un total de 1118 pacientes con OA de rodilla, ha evaluado el efecto terapéutico y la seguridad de la inyección IA de PRP combinado con HA frente al PRP por sí solo. Los resultados indican que la combinación de PRP y HA no es superior al PRP por sí solo en lo que se refiere al alivio de dolor y a la mejora de la movilidad articular, sin embargo, la combinación de PRP con HA se considera más segura al producir menos efectos adversos [540].

La principal limitación a la que nos enfrentamos a la hora de comparar estudios es la variabilidad del PRP aplicado en cuanto al volumen de sangre extraída para su obtención, la técnica utilizada para su preparación y el número de inyecciones IA que se realizan. También existe una gran variabilidad en el contenido de agentes proinflamatorios como los leucocitos. Es importante mencionar que existen tanto PRP pobres en leucocitos (P-PRP) como PRP ricos en leucocitos (L-PRP) [541]. El papel antiinflamatorio del P-PRP se ha demostrado en modelos animales *in vivo* y se ha observado que tras su aplicación la respuesta inflamatoria se ve atenuada [542]. Por el contrario, se ha observado que el L-PRP podría desencadenar la respuesta inflamatoria [543]. No obstante, en un estudio *in vitro* realizado por Osterman *et al.* se creó un sistema de cultivo con sinovia y cartílago de pacientes que habían sido sometidos a artroplastia de reemplazo de rodilla y se emplearon preparaciones de P-PRP y L-PRP. Ambas preparaciones disminuyeron significativamente la expresión de genes relacionados con el proceso inflamatorio en la OA y la producción de NO; así mismo, aumentaron la producción de agregano [524]. A nivel clínico, un metaanálisis reciente en el que se han incluido un total de 2260 pacientes ha mostrado que el P-PRP da lugar

a resultados significativamente mejores en la escala WOMAC, en el cuestionario del Comité Internacional de Documentación de la rodilla (IKDC) y en la VAS que los resultados obtenidos con la inyección IA de HA o placebo en un periodo comprendido entre 6 y 12 meses tras la infiltración, contrariamente, con el L-PRP no se observan estas diferencias. Sin embargo, en cuanto a las reacciones adversas como inflamación local o dolor, no hubo diferencias entre el L-PRP y el P-PRP [544].

Otra limitación de esta terapia es su vía de administración. Algunos autores consideran que, a pesar de los buenos resultados que esta técnica ofrece en el tratamiento de la OA leve o moderada, en pacientes graves, en los que existe afectación del SB, la inyección IA de PRP pierde potencial terapéutico al no conseguir alcanzar el SB o incluso la zona profunda del AC [17]. Desde que Sánchez *et al.* describiesen la técnica por primera vez en el año 2014 para pacientes con OA de rodilla, este mismo grupo de investigación ha realizado numerosos estudios para evaluar el efecto de la infiltración IO de PRP tanto en pacientes con OA de rodilla como en pacientes con OA de cadera mostrando muy buenos resultados en cuanto a la reducción del dolor y a la mejora de la movilidad [545]. Adicionalmente, se ha investigado también el efecto modulador que ejerce el PRP sobre las SFSCs presentes en el SF de pacientes con OA, y se ha observado que, sólo cuando se combina la infiltración IO con la infiltración IA de PRP se induce la reducción de la población de SFSCs [546]. Por otro lado, más recientemente, Ganguly *et al.* han investigado el efecto que desempeña la combinación de la inyección de PRP por las vías IA e IO sobre las BMSCs procedentes del SB de pacientes con OA de cadera. Los resultados han puesto de manifiesto que esta combinación favorece la capacidad proliferativa de las BMSCs del SB, así como las propiedades de resistencia al estrés, especialmente en los pacientes más mayores [547]. La principal limitación de la técnica de infiltración IO es que no existen estudios experimentales en los que se analicen parámetros objetivos que avalen su eficacia, siendo esta la línea de trabajo que sigue esta tesis doctoral.

Material y Métodos

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Material y Métodos

Esta tesis doctoral está basada en la investigación sobre la aplicación IO de PRGF y AMSCs en lesiones condrales agudas de espesor completo sobre un modelo experimental en conejo (*Oryctolagus cuniculus*), siendo de gran importancia tanto en medicina humana como en veterinaria en el contexto de la medicina regenerativa como alternativa a los tratamientos convencionales de procesos degenerativos osteocondrales.

Se llevó a cabo un estudio experimental *in vivo*, aleatorio y controlado con un grupo control, en un modelo animal en el que se evaluó la aplicación IO de PRGF, AMSCs y la asociación de PRGF+AMSCs sobre el proceso de regeneración de defectos osteocondrales inducidos quirúrgicamente. Los defectos fueron evaluados a distintos

tiempos de estudio, tanto a nivel macro como microscópico. Además, se analizaron biomarcadores asociados al daño condral.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera (2019/VSC/PEA/0153), siguiendo las normas referentes a bienestar y experimentación animal (Real Decreto 53/2013 sobre protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos -Boletín Oficial del Estado del 8 de febrero – que adecúa la Directiva Comunitaria 2010/63/UE).

Modelo animal

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se optó por la elección del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo animal. Se incluyeron un total de 80 hembras sanas de raza Nueva Zelanda, con 6 meses de edad y un peso medio de 4,46 kg, procedentes de la Universidad Politécnica de Valencia y criadas para ser utilizados con fines experimentales.

Los animales fueron estabulados durante 15 días previos al inicio del estudio en las instalaciones de la Granja Docente y de Investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera, en jaulas individuales para conseguir una buena adaptación y reducir los niveles de estrés previos a la cirugía.

Previo a la inclusión de los animales en el estudio, se realizó a cada uno de ellos un examen físico completo junto con una hematología y una bioquímica sanguínea básica, con el objetivo de confirmar que los conejos no presentaran ninguna enfermedad concomitante que pudiese afectar el proceso de cicatrización del cartílago y por tanto los resultados del estudio. Cualquier animal que presentase alteraciones hematológicas, bioquímicas o signos de enfermedad durante la exploración física fue excluido del estudio.

Durante el periodo completo del estudio, no se restringió el movimiento de los animales en la jaula y fueron alimentados con agua y pienso *ad-libitum*. Adicionalmente, fueron monitorizados diariamente para detectar signos de dolor, infección o pérdida de peso. La aparición durante el periodo de estudio de infección no controlable, lesión grave en la zona de estudio o alteraciones graves de la condición

física (como pérdida de peso grave, lesiones traumáticas, u otro tipo de alteraciones que puedan afectar el desarrollo del procedimiento), fueron causas de exclusión y sacrificio del animal. La exploración física se realizó evaluando los siguientes parámetros:

- **Peso:** La pérdida de peso constante y en días consecutivos se consideró indicativo de enfermedad. Rango de valores: 0= normal, 1= <10% pérdida de peso, 2= 10-15% pérdida de peso, 3= 15-20% pérdida de peso.
- **Temperatura:** La temperatura rectal fue tomada empleando termómetros digitales. Rango de valores: 0= temperatura normal (38-39,6°C), 1= temperatura \pm 1°C sobre la temperatura normal.
- **Apariencia física:** evaluación del estado general de los conejos. Rango de valores: 0= normal, 1= pérdida de acicalamiento, 2= pelo basto, presencia de secreción ocular o nasal, 3= pelo sucio y muy áspero, postura anormal.
- **Comportamiento:** respuesta del conejo a distintos estímulos dentro de la jaula. Rango de valores: 0= normal, 1= animal ligeramente apático, pero responde si se abre la jaula para interactuar, 2= inactividad o movilidad reducida, sólo responde si se siente acorralado, 3= letárgico o inmóvil, presencia de vocalizaciones o automutilación.

Una valoración superior a 4 en el cómputo total, de 2 en dos criterios, o de 3 en un único criterio, fue motivo de exclusión del animal y eutanasia de este.

Al final del estudio los animales fueron sacrificados según lo previsto por el Real Decreto por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación (RD118/2021). Los animales fueron sedados con Dexmedetomidina 0.05 mg/kg IM (Dexdomitor®, Esteve, España) y Ketamina 10 mg/kg IM (Imalgene®, Merial, España), seguido de la inyección de Pentobarbital sódico 150 mg/kg IV (Dolethal®, CIMAVet, España).

Instalaciones

Tanto la estabulación de los animales como la fase experimental quirúrgica se llevaron a cabo en las instalaciones de la Granja Docente y de Investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

Los análisis de hemograma y bioquímica sanguíneas, previas al procedimiento quirúrgico, se realizaron en el laboratorio clínico del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU Cardenal Herrera. Así mismo, el procesado y análisis histológico se llevó a cabo en el laboratorio de histopatología del mismo hospital.

El análisis de los niveles séricos de HA y C2C se llevaron a cabo en el Laboratorio de Patología Clínica de la Universidad de Murcia (Interlab-UMU).

Diseño experimental

Se llevó a cabo un estudio experimental controlado con un total de 80 conejas. Los animales se dividieron de forma aleatoria en 4 grupos de estudio, de 20 conejas cada uno, en función del tratamiento IO administrado:

- **Grupo control (CT):** Inyección IA con PRGF seguida de la inyección IO de suero salino fisiológico.
- **Grupo PRGF:** Inyección IA con PRGF seguida de la inyección IO de PRGF.
- **Grupo AMSCs:** Inyección IA con PRGF seguida de la inyección IO de AMSCs.
- **Grupo PRGF+AMSCs:** Inyección IA con PRGF seguida de la inyección intraósea de PRGF combinado con AMSCs.

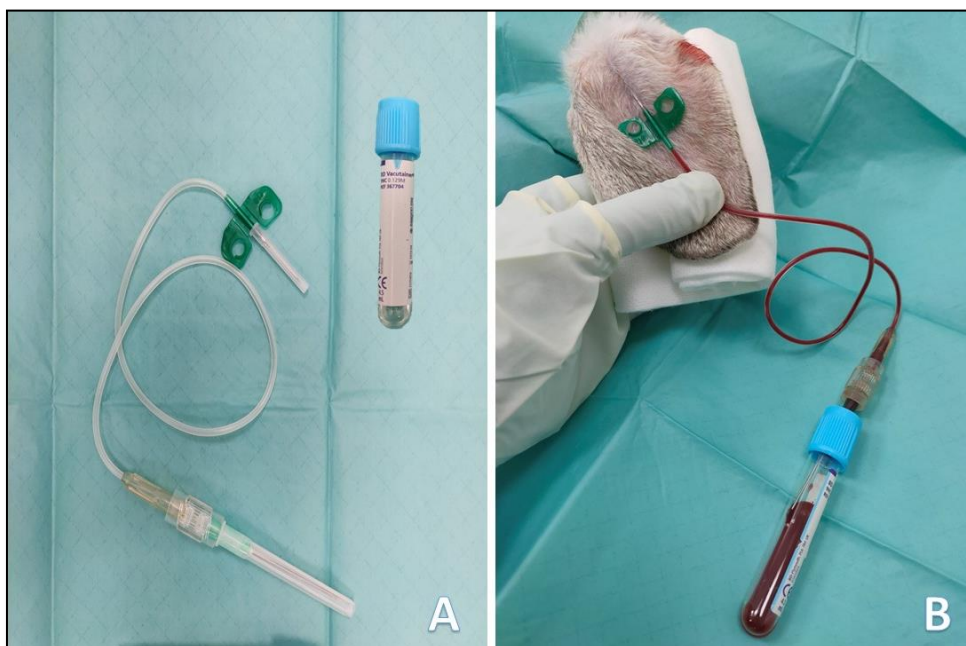
Adicionalmente, los animales de cada grupo se dividieron en 2 subgrupos de 10 conejas cada uno en función del periodo de supervivencia (56 u 84 días).

Plasma Rico en Factores de Crecimiento

El procedimiento para la obtención del PRGF se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Anitua en 1999 [548]. Tras la sedación de los animales con Dexmedetomidina (0,05 mg/kg IM; Dexdomitor®, Esteve, España), Ketamina (10 mg/kg IM; Imalgene®, Merial, España), y Morfina (1 mg/kg IM; B-Braun®, Alemania), se

procedió a la extracción sanguínea en condiciones asépticas. Se realizó la extracción sanguínea de 15 ml de sangre autóloga, es decir, de cada conejo, de la arteria auricular mediante el uso de palomillas de infusión de 21G (Venofix®, B-Braun, Alemania) conectadas a una aguja hipodérmica de 21G (Sterican®, B-Braun, Alemania) por medio de un adaptador macho-macho (Combifix®, B-Braun, Alemania) (Imagen 11). La sangre se recolectó en tubos 5 ml de citrato sódico (BD Vacutainer®, Nueva Jersey, Estados Unidos).

Imagen 11. Extracción sanguínea para la obtención del PRGF.



A, Palomilla de infusión verde conectada a una aguja hipodérmica mediante un adaptador macho-macho, y tubo vacutainer de 5 ml de citrato sódico. B, Extracción sanguínea de la arteria auricular para la obtención del PRGF.

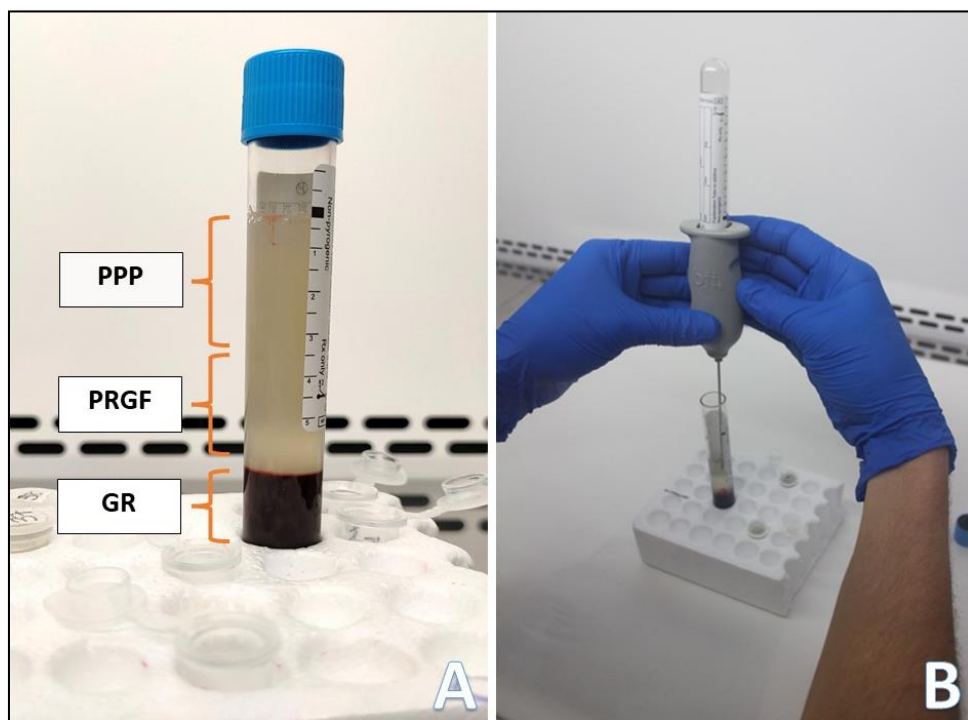
A continuación, los tubos se sometieron a una única centrifugación a 460G durante 8 minutos en una centrífuga para PRGF (PRGF® System III, Biotechnology Institute®, Álava, España). Tras la centrifugación la sangre queda separada en 4 fracciones como se puede apreciar en la imagen 12A:

- **Fracción superior:** se corresponde con el plasma pobre en factores de crecimiento y suponen los primeros 60 µl de cada 100 µl de plasma.

- **Fracción intermedia:** que corresponde al PRGF y posee una concentración de plaquetas 2,5-3,5 veces superior a la de la sangre entera. Supone los 40 μ l inferiores por cada 100 μ l de plasma.
- **“Buffy coat”:** se corresponde con las células de la serie blanca.
- **Fracción inferior:** se corresponde con la serie roja.

Tras la centrifugación de los tubos se procedió al pipeteado de las fracciones de interés en máximas condiciones de esterilidad (Imagen 12B). Con este fin se emplearon 2 tubos estériles a los que se transfirió la fracción pobre en factores de crecimiento y el PRGF utilizando micropipetas con puntas estériles de 1000 μ l y 200 μ l respectivamente.

Imagen 12. Procesado del Plasma Rico en Factores de Crecimiento



A, Tubo de sangre tras la centrifugación con las diferentes fracciones sanguíneas. GR: Glóbulos rojos, PPP: Plasma pobre en plaquetas, PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento. B, Pipeteado de la fracción de plasma rico en factores de crecimiento para transferirlo a tubos estériles, donde será activado con cloruro cálcico justo antes de realizar la infiltración.

Por último, inmediatamente previo a la infiltración, el PRGF se activó añadiendo cloruro cálcico al 10% (50 μ l por cada ml de PRGF) para favorecer la degranulación de las plaquetas y la consiguiente liberación de los GF.

Células Mesenquimales derivadas de la Grasa

Se emplearon AMSCs alogénicas procedentes del Centro de Investigación Príncipe Felipe y obtenidas a partir de un mismo conejo donante. Para su obtención se recolectaron muestras de grasa inguinal de 30 g junto con 20 ml de sangre en tubos sin anticoagulante para conseguir el suero autólogo.

Las muestras fueron después lavadas con tampón fosfato salino junto con diversos antibióticos para eliminar posibles residuos. Seguidamente, se distribuyeron 10 g de tejido por cada placa de Petry y fueron sumergidas en una solución que contenía tampón fosfato salino, penicilina, estreptomina, colagenasa tipo 1-A y dispasa. El tejido graso se cortó manualmente con tijeras quirúrgicas estériles en pequeños trozos, para ser sometido después a un proceso de digestión enzimática durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se recolectó el tejido digerido y se cultivó en suero autólogo hasta conseguir una densidad celular de 1×10^6 células por g de tejido. Por último, se amplificaron durante 4 pases, y finalmente, se resuspendieron para su posterior infiltración en el medio Eagle modificado de Dulbecco y tampón fosfato al 10%.

Preparación del paciente y procedimiento anestésico

Los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno tanto sólido como líquido de 2 horas. Las conejas se pesaron e identificaron en la cara interna del pabellón auricular antes de iniciar la preparación prequirúrgica.

Seguidamente se procedió a la sedación de estos empleando el siguiente protocolo: con Dexmedetomidina (0,05 mg/kg IM; Dexdomitor®, Esteve, España), Ketamina (10 mg/kg IM; Imalgene®, Merial, España), y Morfina (1 mg/kg IM; B-Braun®, Alemania).

Aproximadamente 10 minutos tras la sedación, se obtuvieron muestras de sangre de la arteria auricular para la realización de las hematologías y bioquímicas sanguíneas, además, de para la obtención del PRGF, y se colocó un catéter intravenoso de 24G (Vasofix® Safety, B-Braun, Alemania) en la vena marginal. Seguidamente se rasuró la cara medial de ambas extremidades posteriores y se preparó asépticamente para proceder a la realización de la cirugía.

Para el mantenimiento anestésico se empleó Sevoflurano (Sevoflo[®], Esteve, España) vaporizado en oxígeno al 100% mediante mascarilla.

El protocolo analgésico postoperatorio se mantuvo durante 7 días y consistió en la administración de Meloxicam SC 0,3 mg/kg cada 24 horas (Metacam[®], Boehringer Ingelheim, España). Además, los animales fueron monitorizados diariamente y si en la escala Grimace [549] (Tabla 1) obtenían una puntuación igual o superior a 4 se administró analgesia de rescate, que consistió en Buprenorfina SC 0,1 mg/kg cada 8 horas (Bupaq[®], Richter Pharma AG, Austria). Durante este mismo periodo de tiempo los animales fueron tratados también con Enrofloxacin SC 10 mg/kg cada 24 horas (Ganadexil[®], Invesa, España).

Tabla 1. Escala Grimace para conejos

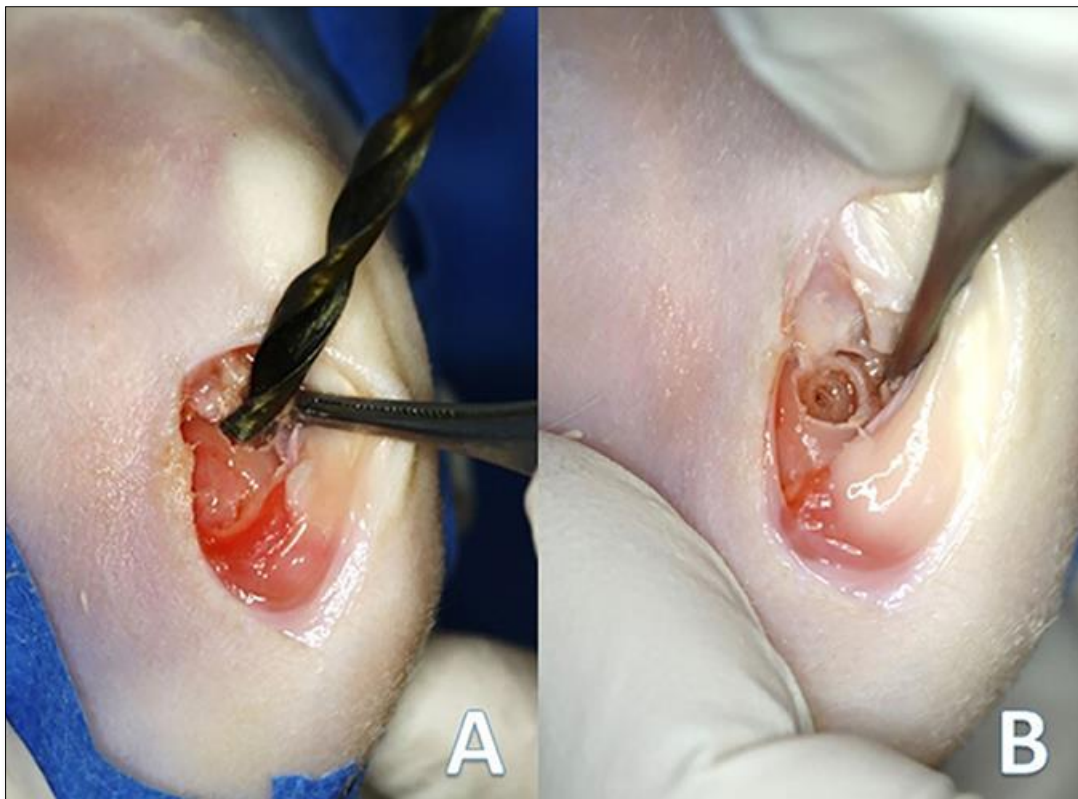
	UNIDADES DE ACCIÓN		
	No presente: 0	Moderadamente presente: 1	Obviamente presente: 2
Apertura orbital	Apertura normal de los párpados, ojos con forma redondeada	Los párpados se entrecierran, zona orbital más estrecha	Párpados completamente cerrados, puede aparecer una arruga alrededor del ojo
Aplanamiento de mejillas	Mejillas hinchadas, cara redondeada	Mejillas aplanadas, la cara aparece más alargada	Mejillas hundidas, la cara se vuelve angulosa
Forma de las fosas nasales	Fosas nasales formando una "U"	Las fosas nasales se vuelven más verticales, formando una "V"	Fosas nasales formando una "V" y la punta de la nariz se mueve hacia la barbilla
Forma y posición de las vibrisas	Vibrisas pegadas a la cara y curvadas hacia abajo	Las vibrisas se separan de la cara y se ponen "de punta", pierden su curvatura	Las vibrisas apuntan todas en la misma dirección y se mueven hacia abajo
Forma y posición de las orejas	Las orejas apuntan hacia la fuente de sonido y tienen una forma redondeada	Las orejas se curvan, se vuelven más cilíndricas y apuntan hacia la zona caudal	Las orejas se mantienen cerca de los flancos o la espalda del animal

Procedimiento quirúrgico

Con el objetivo de conseguir un defecto osteocondral lo más homogéneo posible, todas las cirugías fueron realizadas por los mismos cirujanos.

Con la rodilla de los animales en flexión completa, se realizó una incisión de piel de 10 mm de longitud sobre el margen del cóndilo femoral medial, seguida de la incisión de la fascia y la cápsula articular con el fin de exponer el cóndilo femoral medial y poder identificar la zona de carga. Seguidamente, se procedió a la realización de un defecto de 4 mm de diámetro y 5 mm de profundidad utilizando una broca y un taladro quirúrgico y con la ayuda de una guía. Por último, se emplearon puntos simples para realizar las diferentes capas con una sutura de poligliconato 3/0 (Novosyn® Quick, B-Braun, Alemania). Este mismo procedimiento se llevó a cabo después en la extremidad contralateral (Imagen 13).

Imagen 13. A, creación del defecto condral de espesor completo en el cóndilo femoral medial. B, apariencia macroscópica del defecto.

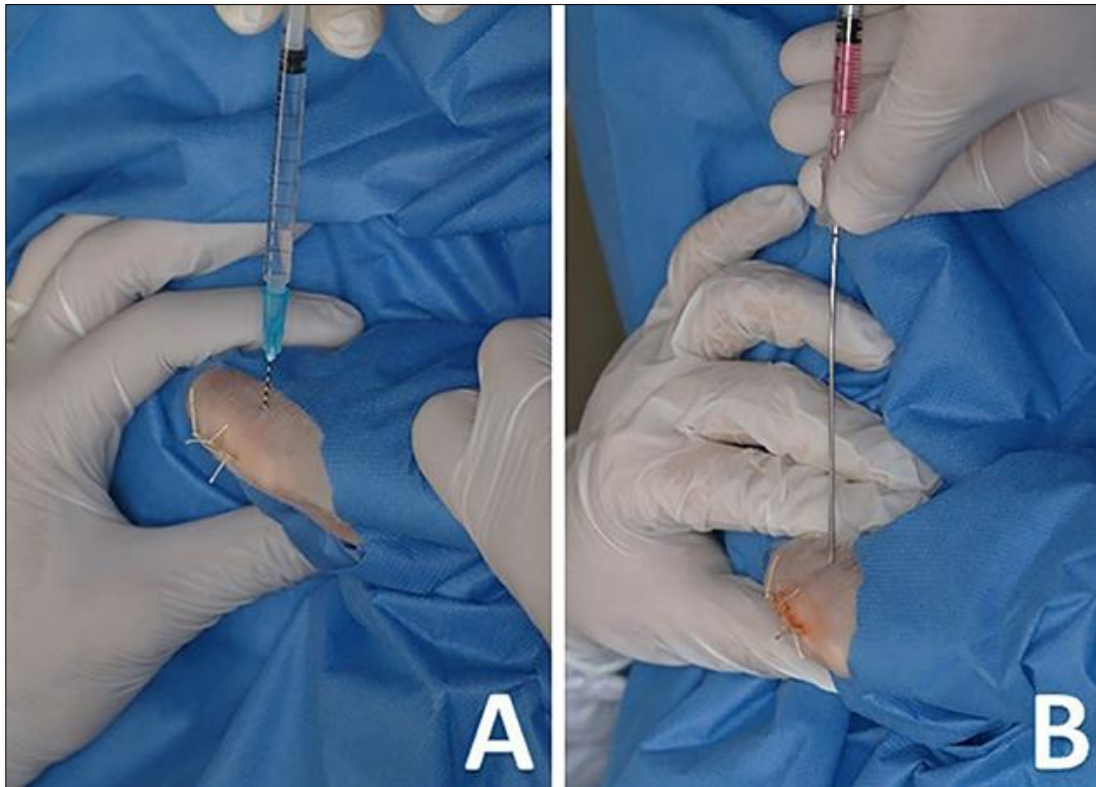


A, creación del defecto osteocondral en el cóndilo femoral medial con un taladro quirúrgico. B, Apariencia macroscópica del defecto osteocondral inmediatamente después de su realización.

Tras la cirugía se realizó la infiltración IA de 0,25 ml de PRFG en todos los animales, independientemente del grupo de tratamiento al que perteneciesen (Imagen 14A). Con este fin se empleó una aguja hipodérmica de 22G (Sterican®, B-Braun, Alemania)

y, con la rodilla en flexión, fue insertada lateral al tendón rotuliano. Seguidamente, se realizó la infiltración IO de 0,5 ml de suero salino fisiológico estéril, PRGF, AMSCs o una combinación de PRGF y AMSCs, en función del grupo de tratamiento asignado. Para ello, mediante movimientos rotatorios, se insertó una aguja espinal de 18G (Spinocan®, B-Braun, Alemania) perpendicular al fémur en la zona supracondílea lateral (Imagen 14B).

Imagen 14. Infiltración intraarticular e intraósea.



A, infiltración intraarticular con 0,25 ml de plasma rico en factores de crecimiento empleando una aguja hipodérmica 22G insertada lateralmente al tendón rotuliano. B, Infiltración intraósea de 0,5 ml de células madre mesenquimales derivadas de la grasa en el cóndilo femoral lateral, empleando una aguja espinal de 18G.

Análisis de biomarcadores séricos

Para realizar el análisis de biomarcadores séricos se obtuvieron muestras sanguíneas de 3,5 ml en tubos vacutainer de suero con gel separador (BD Vacutainer® SST™ II Advance, BD, Nueva Jersey, EE. UU.). Las muestras fueron extraídas justo previo a la cirugía (tiempo basal), y 28, 56 y 84 días tras la infiltración.

Los tubos fueron centrifugados a 3000 g durante 5 minutos y el suero obtenido se pipeteó y se transfirió a tubos Eppendorf que fueron congelados a -80°C hasta el análisis de las muestras.

Para determinar la concentración sérica de C2C y de HA se emplearon las pruebas de ELISA, IBEX® 60-1001-001 y TECO® TE1017-2 respectivamente.

Evaluación macroscópica

Tras el sacrificio de los animales a sus correspondientes tiempos de supervivencia (56 u 84 días tras la infiltración), se procedió a la escisión de la parte distal de ambos fémures para llevar a cabo la evaluación macroscópica e histológica.

Seguidamente, se limpió bien la muestra empleando suero salino fisiológico, y se trató de eliminar cualquier resto graso o muscular que pudiera estar adherido al hueso. Se realizaron fotografías de cada uno de los defectos para su posterior evaluación por parte de 4 evaluadores independientes.

Para evaluar el grado de reparación condral se empleó la escala semicuantitativa descrita por Goebel *et al.*, en la que se incluyen 5 parámetros divididos a su vez en 5 ítems y se obtienen un resultado comprendido entre 0 y 20, siendo 20 el peor resultado posible [550] (Tabla 2).

Tabla 2. Escala semicuantitativa para la evaluación macroscópica de defectos condrales.

Parámetro	Puntos	Descripción
Color del tejido de reparación	0	Hialino o blanco
	1	Predominantemente blanco (> 50%)
	2	Predominantemente translúcido (> 50%)
	3	Translúcido
	4	Ausencia de tejido de reparación
Presencia de vasos sanguíneos	0	Ausencia de vasos sanguíneos
	1	Presencia en < 25% del tejido de reparación
	2	Presencia en 25-50% del tejido de reparación
	3	Presencia en 50-75% del tejido de reparación
	4	Presencia en más del 75% del tejido de reparación
Superficie del tejido de reparación	0	Lisa y homogénea
	1	Lisa y heterogénea
	2	Fibrilada
	3	Tejido de reparación incompleto
	4	Ausencia de tejido de reparación
Llenado del defecto	0	Alineado con el cartílago adyacente
	1	Hipertrofia o > 50% de la profundidad del defecto
	2	< 50% de la profundidad del defecto
	3	0% de la profundidad del defecto
	4	Daños en el hueso subcondral
Degeneración del cartílago articular adyacente	0	Normal
	1	Grietas y fibrilaciones en la zona de integración
	2	Cambios degenerativos difusos
	3	Extensión del defecto al cartílago adyacente
	4	Daño en el hueso subcondral
Valoración global: 0-20 PUNTOS		

Evaluación microscópica

Tras realizar las fotografías para la posterior evaluación microscópica, se procedió a fijar las muestras de fémur en una solución de formaldehído al 4% tamponada, durante 15 días, y posteriormente las muestras fueron decalcificadas en EDTA bisódico (Osteodec®, Bio-Optica, Milan, Italia) durante 5 semanas. Cada semana las muestras se volvieron a fijar en formaldehído al 4% tamponado durante 48 horas. De este modo, a lo largo de una semana, las muestras se mantenían durante 5 días en la solución descalcificadora y 2 días en la solución de fijado.

Una vez que las muestras estuvieron debidamente descalcificadas, se seleccionó la zona del defecto osteocondral para ser tallada. El defecto se seccionó longitudinalmente, de modo que de cada cóndilo se obtuvieron dos cortes que fueron introducidos en distintos casetes. Posteriormente, el tejido fue deshidratado durante

50 horas en el procesador de tejidos (Leica biosystems®, Amsterdam, Países Bajos) empleando series de etanol concentrado desde el 70% al 100%. Finalmente, las muestras fueron aclaradas en xilol y embebidas en parafina. Las secciones embebidas en parafina fueron cortadas con un microtomo (Leica biosystems®, Amsterdam, Países Bajos) a 5 μm en un plano parasagital y se evaluaron 6 secciones de cada cóndilo. Tres secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina, mientras que las tres secciones restantes fueron teñidas con safranina O- verde rápido.

Por último, se empleó un fotomicroscopio para digitalizar las secciones teñidas, que fueron evaluadas por un patólogo independiente. Para valorar el proceso de regeneración osteocondral se emplearon dos escalas semicuantitativas: el sistema de evaluación ICRS II [551] y la escala OARSI para la evaluación histológica del cartílago articular en conejos [552]. La escala ICRS II está representada por 13 parámetros (Tabla 3). Cada parámetro debe ser evaluado basándose en la escala analógica visual obteniendo así una puntuación comprendida entre 0% (peor puntuación posible) y 100% (mejor puntuación posible) [551]. Para llevar a cabo la escala OARSI (Tabla 4), el cartílago articular se divide en cuatro zonas: zona superficial (1/3 superior del cartílago hialino), zona intermedia (1/3 intermedio del cartílago hialino), zona profunda (1/3 profundo del cartílago hialino), y cartílago calcificado. El resultado total varía entre 0 y 24 puntos, siendo 24 el peor resultado posible [552].

Tabla 3. Sistema de evaluación ICRS II.

Parámetro	Puntuación	Descripción
Tinción de la matriz	0%	Sin tinción
	10%	Metacromasia completa
Morfología celular	0%	Ausencia de células redondas u ovaladas
	100%	Principalmente células redondas u ovaladas
Racimos de condrocitos	0%	Presentes
	100%	Ausentes
Arquitectura de la superficie	0%	Grandes irregularidades, laminación del cartílago
	100%	Superficie lisa y regular
Integración basal	0%	Sin integración
	100%	Integración completa
Formación de la línea de marea	0%	Ausencia de línea de calcificación
	100%	Presencia de línea de marea
Anomalías en el hueso subcondral	0%	Anomalías medulares
	100%	Médula normal
Inflamación	0%	Presente
	100%	Ausente
Calcificación anómala	0%	Presente
	100%	Ausente
Vascularización	0%	Presente
	100%	Ausente
Valoración de la superficie	0%	Pérdida completa o disrupción
	100%	Se asemeja al cartílago articular intacto
Valoración de la zona media y profunda	0%	Tejido fibroso
	100%	Cartílago hialino normal
Valoración general	0%	Malo (fibrocartílago)
	100%	Bueno (cartílago hialino)

Tabla 4. Escala OARSI para la evaluación histológica del cartílago articular en conejos.

Parámetro	Puntos	Descripción
Tinción con safranina O-verde rápido	0	Tinción uniforme a lo largo de todo el cartílago
	1	Pérdida de tinción en la zona superficial < 50% de la longitud del cóndilo
	2	Pérdida de tinción en la zona superficial ≥ 50% de la longitud del cóndilo
	3	Pérdida de tinción en los 2/3 superiores del cartílago < 50% de la longitud del cóndilo
	4	Pérdida de tinción en los 2/3 superiores del cartílago ≥ 50% de la longitud del cóndilo
	5	Pérdida de tinción en todo el espesor del cartílago hialino < 50% de la longitud del cóndilo
	6	Pérdida de tinción en todo el espesor del cartílago hialino ≥ 50% de la longitud del cóndilo
Estructura del tejido de reparación	0	Normal
	1	Irregulares superficiales
	2	Fisuras en < 50% de la superficie
	3	Fisuras en ≥ 50% de la superficie
	4	Erosión del 1/3 superior de cartílago hialino en < 50% de la superficie
	5	Erosión del 1/3 superior de cartílago hialino en ≥ 50% de la superficie
	6	Erosión de los 2/3 superiores del cartílago hialino en < 50% de la superficie
	7	Erosión de los 2/3 superiores del cartílago hialino en ≥ 50% de la superficie
	8	Erosión de espesor completo del cartílago hialino en < 50% de la superficie
	9	Erosión de espesor completo del cartílago hialino en ≥ 50% de la superficie
	10	Erosión del cartílago hialino y la zona calcificada del hueso subcondral < 50% de la superficie
	11	Erosión del cartílago hialino y la zona calcificada del hueso subcondral ≥ 50% de la superficie
Densidad de los condrocitos	0	No hay disminución celular
	1	Disminución celular focal
	2	Disminución celular multifocal
	3	Disminución celular multifocal y confluyentes
	4	Disminución celular difusa
Formación de racimos de condrocitos	0	Normal
	1	< 4 racimos
	2	≥ 4 racimos, pero < 8 racimos
	3	≥ 8 racimos
Valoración global: 0-24 PUNTOS		

Análisis estadístico

Al finalizar el estudio, y una vez recopilados todos los datos de los parámetros evaluados, estos fueron analizados con el programa SPSS 20.0 para Mac (SPSS® Inc., Chicago, EE. UU.), tomando como diferencia significativa un valor de $p < 0,05$.

En primer lugar, se realizó un estudio descriptivo de la media, desviación estándar, intervalos de confianza, máximos y mínimos y representación con gráficas de barras de las variables cuantitativas.

En todas las variables se comprobó la normalidad con el test de Shapiro- Wilk y la homogeneidad de las varianzas con el test de Levene. Se tomaron como parámetros a evaluar dos factores: el tiempo, comparando los resultados obtenidos en cada uno de los tiempos de forma independiente para cada grupo de estudio y comprobando así comprobando las diferencias que existieron dentro de un mismo animal a lo largo del tiempo que indican su evolución; y el factor tratamiento, para conocer si existían diferencias en el grado de regeneración condral entre los 4 tratamientos, comparándose cada una de las variables en los diferentes tiempos de estudio.

En el caso de las variables normales se realizó un test de ANOVA con el posterior test posthoc de Bonferroni. Para las variables que no cumplieron la normalidad, se emplearon los test no paramétricos de Kruskal- Wallis y U de Mann-Whitney.

Resultados

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Resultados

A continuación, se exponen los resultados obtenidos durante la fase experimental en los diferentes protocolos, recogidos en tablas y figuras. Todos los resultados se expresan como la media y la desviación típica para todas las variables estudiadas. En todos ellos se ha tomado como diferencia estadísticamente significativa un p-valor < 0,05.

Para una mejor exposición de los datos obtenidos, el apartado de resultados se ha dividido en los siguientes puntos:

- Estudio descriptivo de los pacientes.
- Estudio descriptivo y comparativo del análisis de biomarcadores.
- Estudio descriptivo y comparativo de la evaluación macroscópica.
- Estudio descriptivo y comparativo de la evaluación histológica.

Estudio descriptivo de los animales

Criterios de inclusión y exclusión de los animales en el estudio

Para la realización de la tesis doctoral se evaluaron un total de 80 animales y, antes de comenzar la fase experimental se evaluó el estado de salud. En primer lugar, se realizó una exploración física básica de cada uno de ellos para comprobar que no presentaban signos evidentes de enfermedad. Seguidamente, se realizaron analíticas sanguíneas y los valores tanto hematológicos como bioquímicos se recogen en las tablas 5 y 6 respectivamente.

Todos los valores hematológicos y bioquímicos se estaban dentro de la normalidad, a excepción de los valores de glucosa, que se encontraron ligeramente aumentados

debido al estrés asociado a la manipulación. Todos los animales pudieron ser incluidos en el estudio.

Tabla 5. Valores hematológicos de los conejos empleados durante la fase experimental.

	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO
WBC	6,12	1,86	2,80	9,97
RBC	4,93	0,27	5,87	4,12
HGB	10,45	0,62	7,99	11,76
HTO	34,86	1,68	28,00	37,60
MCV	66,23	2,05	63,91	76,03
MHC	21,05	0,74	19,90	23,71
MHCH	30, 12	0,58	28,86	32,34
PLT	439,98	50,38	293,18	518,23
RDW	13,63	0,82	12,07	16,59
PCT	0,21	0,79	0,05	7,08
MPV	3,94	0,94	2,50	10,11
PDW	18, 17	1,35	17,01	22,50

WBC: glóbulos blancos; RBC: glóbulos rojos; HGB: hemoglobina; HTO: hematocrito; MCV: volumen corpuscular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media; PLT: plaquetas; RDW: amplitud de distribución eritrocitaria; PCT: procalcitonina; MPV: volumen promedio de plaquetas; PDW: amplitud distribución de plaquetas.

Tabla 6. Valores bioquímicos de los conejos empleados durante la fase experimental.

	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO
ALB	3,89	0,32	3,19	4,28
FA	43,13	21,65	28	123
CREA	0,72	0,09	0,51	0,92
GLOB	2,04	0,33	1,34	2,73
GLU	151,68	19,84	117	189
GPT	43,85	9,82	23	61
PT	6,12	0,51	4,82	6,63
UREA	30,09	5,72	23,89	41,78

AL: albúmina; FA: fosfatasa alcalina; CREA: creatinina; GLOB: globulinas; GLU: glucosa; GPT: transaminasa glutámico-pirúvica; PT: proteínas totales.

Por otro lado, durante el estudio se realizó un examen físico diario de los animales, en el que se valoró el peso, temperatura, apariencia física y comportamiento. Cabe destacar que dos animales fueron excluidos del estudio y sacrificados según lo expuesto anteriormente, uno de ellos debido a un absceso molar que desembocó en pérdida de peso extrema (> 15% de su peso), y el otro, a causa de una infección en la zona quirúrgica con *Pseudomona aeruginosa* multirresistente.

De este modo, finalmente el grupo CT contó con 19 conejos, de los cuales 9 se sacrificaron a los 56 días y 10 a los 84 días tras la cirugía; los grupos PRGF y AMSCs contó con 20 conejos cada uno, la mitad de ellos sacrificados en cada uno de los

tiempos de estudio; y el grupo PRGF+AMSCs fue conformado por 19 conejos, 9 sacrificadas a los 56 días y el resto sacrificadas a los 84 días.

Dolor postquirúrgico

Tras la cirugía, el grado de dolor en los animales fue evaluado diariamente por medio de la escala Grimace y si la puntuación obtenida era igual o superior a 4 se proporcionó analgesia de rescate. Los resultados de esta escala se han agrupado por semanas para facilitar su análisis de la siguiente manera:

- Semana 1: periodo comprendido desde el día de la cirugía hasta 6 días después de la realización del procedimiento, ambos inclusive. Un animal del grupo CT requirió analgesia de rescate durante los dos días posteriores a la cirugía, puesto que obtuvo una puntuación de 6 y 5. Un animal del grupo CT y dos animales del grupo AMSCs necesitaron una dosis única de buprenorfina el día siguiente a la cirugía, puesto que todos ellos obtuvieron una nota de 4 puntos. Por último, un conejo del grupo PRGF+AMSCs obtuvo una puntuación de 4 el cuarto día tras la cirugía.
- Semana 2: periodo comprendido entre 7 y 13 días después de la realización de la cirugía, ambos incluidos. Durante este periodo, tan solo una coneja del grupo CT obtuvo 5 y 4 puntos los días 12 y 13 respectivamente.
- Semana 3: periodo comprendido entre el día 14 y 20 tras la realización de la cirugía, ambos días incluidos. En este tramo, la misma coneja que necesitó analgesia de rescate en la semana 2, necesitó una dosis más de buprenorfina el día 14 al haber obtenido 4 puntos en la escala.

Transcurrido este periodo, ningún animal mostró signos de dolor, y, por tanto, los datos no han sido incluidos en el estudio.

Estudio descriptivo y comparativo del análisis de biomarcadores

El análisis de los biomarcadores séricos HA y C2C se llevó a cabo por medio de las pruebas ELISA TECO® TE1017-2 y IBEX® 60-1001-001 respectivamente, y los valores fueron expresados en ng/ml.

Ácido hialurónico

A continuación, en la tabla 7, se detallan los resultados obtenidos en los distintos grupos de tratamiento en cada uno de los tiempos de estudio.

Tabla 7. Evaluación de los niveles séricos de ácido hialurónico.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
BASAL	CT	635,67	76,64	21,25	589,35	681,98	487,70	733,51
	PRGF	625,18	114,26	31,69	556,13	694,22	455,67	789,22
	AMSCs	513,87	174,64	58,21	379,62	648,12	245,68	787,65
	PRGF+AMSC	592,13	86,56	28,85	525,59	658,67	435,00	730,70
28 DÍAS	CT	1319,04	524,36	151,37	985,87	1652,20	669,29	2624,82
	PRGF	1767,23	936,37	270,31	1172,28	2362,16	914,00	3156,07
	AMSCs	1513,78	716,37	238,79	963,13	2064,43	342,86	2950,96
	PRGF+AMSC	1408,60	533,21	177,74	998,74	1818,46	226,87	2077,06
56 DÍAS	CT	1234,96	391,68	113,07	986,11	1483,82	605,13	1813,35
	PRGF	770,99	104,67	29,03	707,73	834,23	505,14	933,87
	AMSCs	804,99	50,23	16,74	766,38	843,59	735,00	886,63
	PRGF+AMSC	757,93	46,12	15,37	722,48	793,38	703,70	828,83
84 DÍAS	CT	1333,54	265,19	100,23	1088,27	1578,80	1018,83	1782,86
	PRGF	821,89	43,29	14,42	788,62	855,17	741,17	867,36
	AMSCs	826,92	59,67	18,86	784,23	869,59	699,38	914,32
	PRGF+AMSC	610,05	64,45	20,37	563,95	656,15	507,36	702,20

CT: Control, PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: Células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras la descripción de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como podemos observar en la tabla 8.

Tabla 8. Estudio comparativo de los niveles séricos de ácido hialurónico entre grupos de tratamiento.

TTO		Sig. Basal	Sig. 28 días	Sig. 56 días	Sig. 84 días
CT	PRGF	1,00	,77	<,001	<,001
	AMSCs	,11	1,00	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	1,00	1,00	<,001	<,001
PRGF	CT	1,00	,77	<,001	<,001
	AMSCs	,19	1,00	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	1,00	1,00	1,00	,005
AMSCs	CT	,11	1,00	<,001	<,001
	PRGF	,19	1,00	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,94	1,00	1,00	,003
PRGF+AMSCs	CT	1,00	1,00	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00	1,00	,005
	AMSCs	,94	1,00	1,00	,003

CT: Control, PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: Células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Como se puede observar, no existen diferencias significativas entre grupos en los tiempos de estudio basal y 28 días tras la cirugía. Sin embargo, transcurridos 56 días, el grupo CT mostró resultados significativamente más altos que los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs. En este mismo tiempo de estudio, la concentración sérica de HA no

fue significativamente diferente en los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs. A los 84 días de la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs mostró niveles séricos de HA significativamente menores que el resto de los grupos, mientras que el grupo CT fue el que mostró los niveles significativamente más altos. Así mismo, no existen diferencias significativas entre el grupo PRGF y el grupo AMSCs.

En cuanto al estudio del factor tiempo, en el grupo CT se observaron valores séricos de HA significativamente más altos en los tiempos 28, 56 y 84 días tras la cirugía en comparación con los obtenidos en el tiempo basal. En lo que respecta a los grupos AMSCs y PRGF, 28 días tras la cirugía se produce un incremento significativo de la concentración sérica de HA en comparación con los niveles basales, mientras que a los 56 y 86 días se observa un descenso significativo, sin embargo, a los 84 días los valores séricos de HA continúan significativamente elevados en comparación con los niveles basales. Por último, en el grupo PRGF+AMSCs se observa un incremento significativo de la concentración sérica de HA, seguido de una disminución a los 56 días, y finalmente, 84 días después de la cirugía, no se observan diferencias significativas en comparación con la concentración basal (Tabla 9).

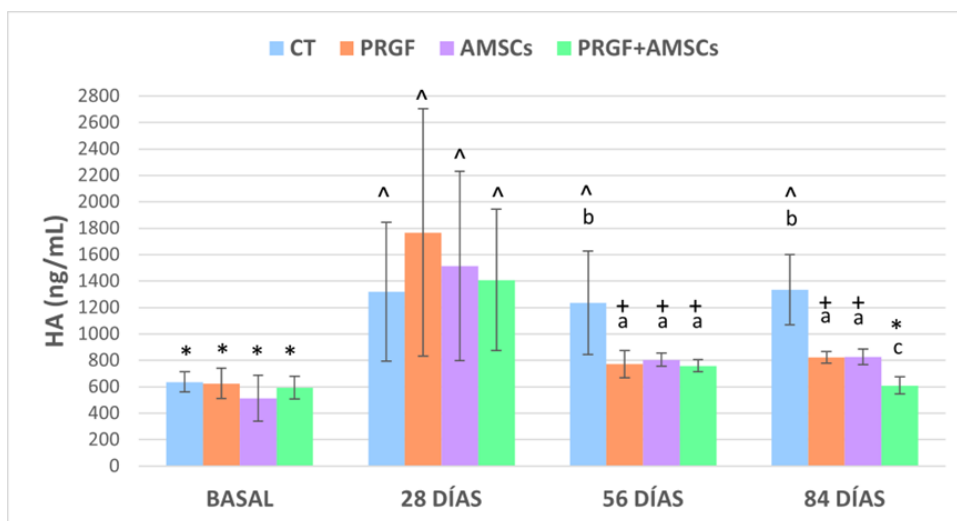
Tabla 9. Estudio comparativo de los niveles séricos de ácido hialurónico considerando el factor tiempo.

COMPARACIÓN ENTRE TIEMPOS		Sig. CT	Sig. PRGF	Sig. AMSCs	Sig. PRGF+AMSCs
Basal	28 días	<,001	<,001	<,001	<,001
	56 días	,001	,04	,02	,03
	84 días	,002	,04	,02	1,00
28 días	Basal	<,001	<,001	<,001	<,001
	56 días	,88	<,001	<,001	<,001
	84 días	,95	<,001	<,001	<,001
56 días	Basal	,001	,04	,02	,03
	28 días	,88	<,001	<,001	<,001
	84 días	1,00	1,00	1,00	1,00
84 días	Basal	<,001	,04	,02	1,00
	28 días	,95	<,001	,02	<,001
	56 días	1,00	1,00	1,00	,02

CT: Control, PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: Células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la Imagen 15 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 15. Evaluación de la concentración sérica de HA en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



HA: ácido hialurónico, CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Neopítopo C2C del colágeno

Los resultados de la concentración sérica del C2C en los distintos grupos de tratamiento y para cada uno de los tiempos de estudio se describen a continuación, en la tabla 10.

Tabla 10. Evaluación de los niveles séricos del neopéptido C2C del colágeno.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
BASAL	CT	19,80	2,46	,71	18,23	21,36	15,95	23,97
	PRGF	19,59	3,70	1,02	19,35	23,82	15,66	29,95
	AMSCs	23,27	4,70	1,56	16,67	23,87	14,21	28,61
	PRGF+AMSCs	21,66	2,54	,84	17,71	21,61	16,02	23,18
28 DÍAS	CT	63,98	3,92	1,24	61,13	66,74	55,73	55,73
	PRGF	59,16	3,65	1,05	56,83	61,4	54,18	54,18
	AMSCs	56,15	3,31	0,77	56,37	59,92	55,54	55,54
	PRGF+AMSCs	44,43	2,98	0,99	42,13	46,72	39,06	39,06
56 DÍAS	CT	51,75	3,44	,99	49,56	53,93	45,25	57,06
	PRGF	40,34	3,36	,96	38,20	42,47	37,16	46,91
	AMSCs	44,29	3,50	1,16	38,60	43,97	36,44	48,24
	PRGF+AMSCs	30,61	2,94	,98	28,34	32,87	25,87	34,38
84 DÍAS	CT	44,89	2,94	1,11	42,16	47,60	41,32	48,43
	PRGF	31,54	2,84	1,00	29,16	33,91	26,42	34,85
	AMSCs	33,82	4,02	1,27	28,32	34,08	22,89	36,21
	PRGF+AMSCs	18,66	3,17	1,00	16,39	20,93	12,01	21,90

CT: Control, PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: Células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras la descripción de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como podemos observar en la tabla 11.

Tabla 11. Estudio comparativo de los niveles séricos del neopéptido C2C del colágeno entre grupos de tratamiento.

TTO		Sig. Basal	Sig. 28 días	Sig. 56 días	Sig. 84 días
CT	PRGF	1,00	,009	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	,007	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	1,00	<,001	<,001	<,001
PRGF	CT	1,00	,009	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	,93	,93	,99
	PRGF+AMSCs	1,00	<,001	<,001	<,001
AMSCs	CT	1,00	,007	<,001	<,001
	PRGF	1,00	,93	,93	,99
	PRGF+AMSCs	1,00	<,001	<,001	<,001
PRGF+AMSCs	CT	1,00	<,001	<,001	<,001
	PRGF	1,00	<,001	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	<,001	<,001	<,001

CT: Control, PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: Células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En el análisis realizado a tiempo basal, no se aprecian diferencias significativas entre grupos, sin embargo, 28 días tras la cirugía se observan niveles séricos de C2C significativamente más altos en el grupo CT que en el resto de los grupos. Por el contrario, tanto a los 28 como a los 56 y los 84 días tras la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs mostró niveles significativamente más bajos que los grupos PRGF y

AMSCs, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los valores séricos de estos dos grupos.

En lo que respecta al estudio del factor tiempo, en el grupo CT se obtuvieron niveles séricos de C2C significativamente superiores a los reportados a tiempo basal en todos los tiempos de estudio, y esto mismo ocurrió en los grupos PRGF y AMSCs. Sin embargo, en el grupo PRGF+AMSCs, no se mostraron diferencias significativas entre la concentración sérica de C2C 84 días tras la cirugía y la concentración basal (Tabla 12).

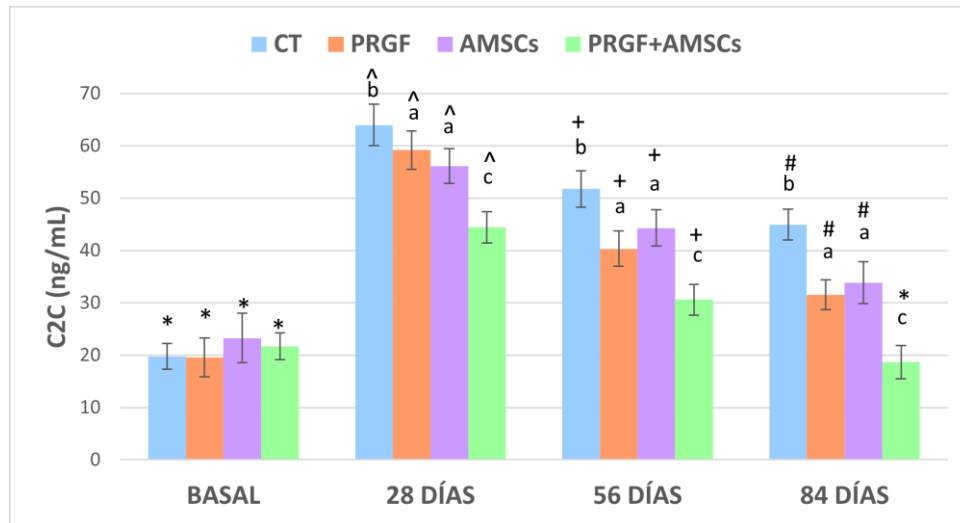
Tabla 12. Estudio comparativo de los niveles séricos de neoepítipo C2C del colágeno considerando el fator tiempo.

COMPARACIÓN ENTRE TIEMPOS		Sig. CT	Sig. PRGF	Sig. AMSCs	Sig. PRGF+AMSCS
Basal	28 días	<,001	<,001	<,001	<,001
	56 días	<,001	<,001	<,001	<,001
	84 días	<,001	<,001	<,001	,99
28 días	Basal	<,001	<,001	<,001	<,001
	56 días	<,001	<,001	<,001	<,001
	84 días	<,001	<,001	<,001	<,001
56 días	Basal	<,001	<,001	<,001	<,001
	28 días	<,001	<,001	<,001	<,001
	84 días	,02	<,001	<,001	<,001
84 días	Basal	<,001	<,001	<,001	,99
	28 días	<,001	<,001	<,001	<,001
	56 días	,02	<,001	<,001	<,001

CT: Control, PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: Células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 16 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 16. Evaluación de la concentración sérica de C2C en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



C2C: neopéptido C2C del colágeno, CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Estudio descriptivo y comparativo de la evaluación macroscópica

El estudio macroscópico de los defectos osteocondrales se llevó a cabo teniendo en cuenta las siguientes variables propuestas por Goebel *et al.* [550]:

- Color del tejido de reparación.
- Presencia de vasos sanguíneos en el tejido de reparación.
- Superficie del tejido de reparación.
- Llenado del defecto.
- Degeneración del AC adyacente.
- Valoración global del tejido de reparación

A cada una de las variables se le otorga una puntuación comprendida entre 0 (tejido de reparación ligeramente similar al AC sano) y 4 (tejido de reparación gravemente alterado).

Color del tejido de reparación

A continuación, en la tabla 13, se detallan los resultados obtenidos en los distintos grupos de tratamiento en cada uno de los tiempos de estudio.

Tabla 13. Evaluación del color del tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	2,11	0,69	0,19	1,67	2,55	0,67	3,00
	PRGF	1,21	0,48	0,17	0,82	1,60	0,67	2,00
	AMSCs	1,32	0,30	0,11	1,07	1,57	0,66	1,67
	PRGF+AMSCs	0,62	0,21	0,08	0,45	0,80	0,33	1,00
84 DÍAS	CT	1,55	0,57	0,13	1,27	1,84	0,33	3,00
	PRGF	0,87	0,52	0,15	0,58	1,15	,00	1,67
	AMSCs	0,98	0,44	0,14	0,66	1,30	0,33	1,67
	PRGF+AMSCs	0,44	0,27	0,09	0,25	0,63	,00	1,00

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras la descripción de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como podemos observar en la tabla 14.

Tabla 14. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable color del tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	,002	,001
	AMSCs	,008	,025
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	,002	,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,137	,22
AMSCs	CT	,008	,025
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,04	,01
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,137	,22
	AMSCs	,04	,01

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Trascurridos 56 días desde la cirugía, el grupo CT obtuvo una puntuación significativamente más alta que el resto de los grupos. El color del tejido de reparación de los animales incluidos en este grupo era en su mayoría traslúcido, mientras que en

el grupo PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs fue predominantemente blanco. No se observaron diferencias significativas entre el grupo PRGF y el grupo AMSCs, sin embargo, el grupo PRGF+AMSCs demostró ser significativamente superior al grupo AMSCs.

A los 84 días tras la cirugía, el grupo CT continuó mostrando resultados significativamente peores que el resto de los grupos, aunque se apreció una mejora significativa en cuanto al color, que en esta ocasión apareció predominantemente blanco. Al igual que en el tiempo de estudio anterior, no se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo PRGF y el grupo AMSCs, en los que el color del tejido de reparación apenas cambió con el transcurso del tiempo y continuó mostrándose predominantemente blanco, sin observarse diferencias significativas entre tiempos de estudio. Por otro lado, aunque el grupo PRGF+AMSCs fue el que mejores resultados obtuvo, se apreció una ligera mejoría en el color, cuya apariencia fue descrita como muy similar a la del cartílago hialino sano, sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre tiempos de estudio (Tabla 15).

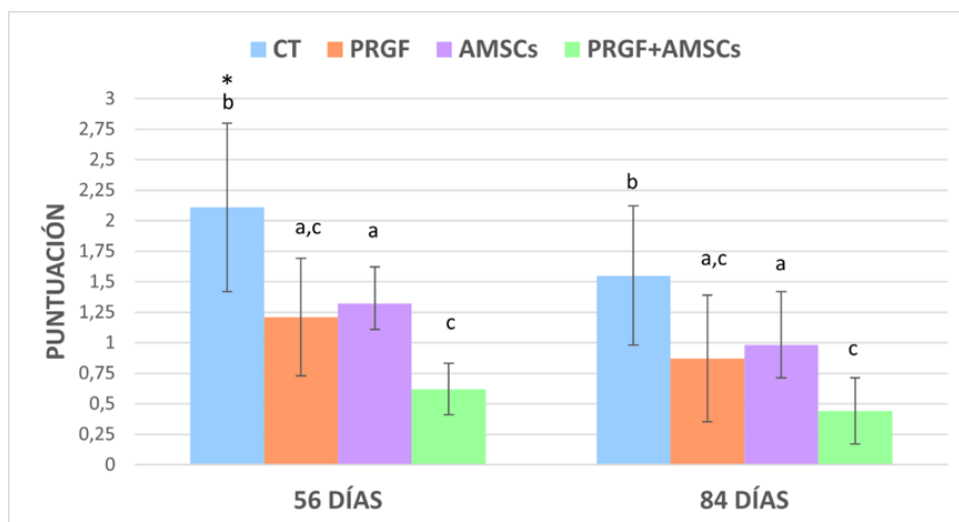
Tabla 15. Estudio comparativo entre tiempos de la variable color del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	2,11	0,69	0,19	1,67	2,55	0,67	3,00	,003
	84	1,55	0,57	0,13	1,27	1,84	0,33	3,00	
PRGF	56	1,21	0,48	0,17	0,82	1,60	0,67	2,00	,15
	84	0,87	0,52	0,15	0,58	1,15	,00	1,67	
AMSCs	56	1,32	0,30	0,11	1,08	1,57	0,66	1,67	,06
	84	0,98	0,44	0,14	0,66	1,30	0,33	1,67	
PRGF + AMSCs	56	0,62	0,21	0,08	0,45	0,80	0,33	1,00	,14
	84	0,44	0,27	0,09	0,25	0,63	,00	1,00	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 17 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 17. Evaluación del color del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Presencia de vasos sanguíneos en el tejido de reparación

En la tabla 16 se describen los resultados obtenidos en cada uno de los grupos de tratamiento y para cada tiempo de estudio.

Tabla 16. Evaluación de la presencia de vasos sanguíneos en el tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	0,92	0,99	0,29	0,28	1,55	,00	3,33
	PRGF	2,33	0,53	0,19	1,89	2,78	2,00	3,33
	AMSCs	1,25	0,46	0,16	0,86	1,64	1,00	2,00
	PRGF+AMSCs	1,62	0,52	0,18	1,19	2,06	1,00	2,00
84 DÍAS	CT	0,89	0,40	0,94	0,60	0,99	,00	1,33
	PRGF	0,69	0,57	0,12	0,64	1,13	0,33	1,67
	AMSCs	0,58	0,37	0,11	0,33	0,84	0,33	1,37
	PRGF+AMSCs	0,23	0,17	0,05	0,16	0,34	,00	0,37

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras la descripción de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como podemos observar en la tabla 17.

Tabla 17. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable presencia de vasos sanguíneos en el tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	1,00
	AMSCs	1,00	,94
	PRGF+AMSCs	,22	,002
PRGF	CT	<,001	1,00
	AMSCs	,02	,30
	PRGF+AMSCs	,33	<,001
AMSCs	CT	1,00	,94
	PRGF	,02	,30
	PRGF+AMSCs	1,00	,22
PRGF+AMSCs	CT	,22	,002
	PRGF	,33	<,001
	AMSCs	1,00	,22

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Pasados 56 días de la cirugía, el grupo PRGF fue el que mostró la puntuación significativamente más alta, seguido del grupo PRGF+AMSCs, mostrando vasos sanguíneos aproximadamente en el 25-50% del tejido de reparación. Sin embargo, el CT obtuvo la puntuación más baja, sin observarse diferencias significativas entre este grupo y el grupo AMSCs. En estos grupos, se apreciaron vasos sanguíneos en aproximadamente el 25% del tejido de reparación.

En cuanto a la evaluación realizada 84 días después de la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs mostró resultados significativamente mejores que el grupo CT y el grupo PRGF, mientras que no se observaron diferencias significativas con el grupo AMSCs. En estos grupos, la presencia de vasos sanguíneos fue prácticamente nula, mientras que en los grupos CT y PRGF se apreciaron vasos sanguíneos en aproximadamente el 25% de la superficie del defecto.

Al analizar el factor tiempo, se observa que tanto en el grupo PRGF, como en los grupos AMSCs y PRGF+AMSCs existe un descenso significativo en el porcentaje de vasos sanguíneos presentes en el tejido de reparación a medida que pasan los días, siendo mucho más evidente en el grupo PRGF, a pesar de que, a los 84 días tras la cirugía continúa siendo el grupo con la puntuación más alta (Tabla 18).

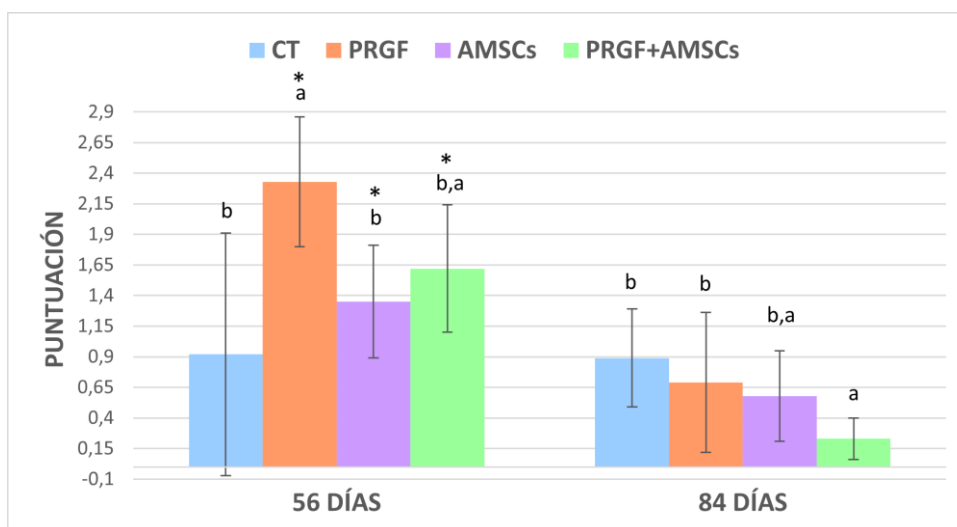
Tabla 18. Estudio comparativo entre tiempos de la variable presencia de vasos sanguíneos en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	0,92	0,99	0,29	0,28	1,55	,00	3,33	,16
	84	0,89	0,40	0,94	0,60	0,99	,00	1,33	
PRGF	56	2,33	0,53	0,19	1,89	2,78	2,00	3,33	<,001
	84	0,69	0,57	0,12	0,64	1,13	0,33	1,67	
AMSCs	56	1,25	0,46	0,16	0,86	1,64	1,00	2,00	,006
	84	0,58	0,37	0,11	0,33	0,84	0,33	1,37	
PRGF + AMSCs	56	1,62	0,52	0,18	1,19	2,06	1,00	2,00	<,001
	84	0,23	0,17	0,05	0,16	0,34	,00	0,37	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 18 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 18. Evaluación de la presencia de vasos sanguíneos en el tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Superficie del tejido de reparación

En la tabla 19 se describen los resultados obtenidos para la variable superficie del tejido de reparación.

Tabla 19. Evaluación de la superficie de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	2,31	1,07	0,31	1,63	2,99	,00	3,33
	PRGF	1,08	0,75	0,27	0,46	1,71	0,00	2,33
	AMSCs	1,62	0,28	0,10	1,40	1,86	1,00	2,00
	PRGF+AMSCs	0,79	0,35	0,12	0,49	1,09	0,33	1,33
84 DÍAS	CT	1,78	0,41	0,10	1,58	1,98	1,00	2,33
	PRGF	0,89	0,57	0,15	0,57	1,21	,00	1,67
	AMSCs	1,47	0,39	0,12	1,19	1,75	0,66	2,00
	PRGF+AMSCs	0,50	0,28	0,09	0,30	0,70	,00	1,00

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras la descripción de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como podemos observar en la tabla 20.

Tabla 20. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable superficie del tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	,007	<,001
	AMSCs	,31	,48
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	,007	<,001
	AMSCs	,95	,015
	PRGF+AMSCs	1,00	,21
AMSCs	CT	,31	,48
	PRGF	,95	,015
	PRGF+AMSCs	,20	<,001
PRGF+AMSCs	CT	<,01	<,001
	PRGF	1,00	,21
	AMSCs	,20	<,001

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

56 días después de la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs fue el que mejores resultados mostró, aunque solo se observaron diferencias significativas con el grupo CT. La superficie del tejido de reparación de los animales del grupo PRGF+AMSCs se describió principalmente como lisa, con ligeras irregularidades. A su vez, el grupo CT fue el que

peores resultados mostró, siendo estos significativamente peores que los obtenidos por el grupo PRGF y el grupo PRGF+AMSCs. La superficie del AC del grupo CT se describió mayoritariamente como fibrilada. Por último, no se observaron diferencias significativas entre el grupo PRGF y el grupo AMSCs, en estos grupos la superficie del tejido de reparación fue descrita como lisa y heterogénea.

Pasados 84 días, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo la puntuación más baja, siendo significativamente mejor que la obtenida por el grupo CT y el grupo AMSCs. Tanto para el grupo PRGF+AMSCs como para el grupo PRGF, la superficie del tejido de reparación tuvo una apariencia similar a la del AC sano, con algunas imperfecciones superficiales. No se observaron diferencias significativas entre el grupo CT y el grupo AMSCs, aunque el grupo CT obtuvo una puntuación más alta. En ambos grupos la superficie del defecto se consideró mayoritariamente lisa, con algunas irregularidades y fibrilaciones.

Tomando en consideración el factor tiempo, se observa que sólo en el grupo CT existen diferencias significativas entre la puntuación obtenida a los 54 días en comparación a la obtenida a los 84 días tras la cirugía (Tabla 21).

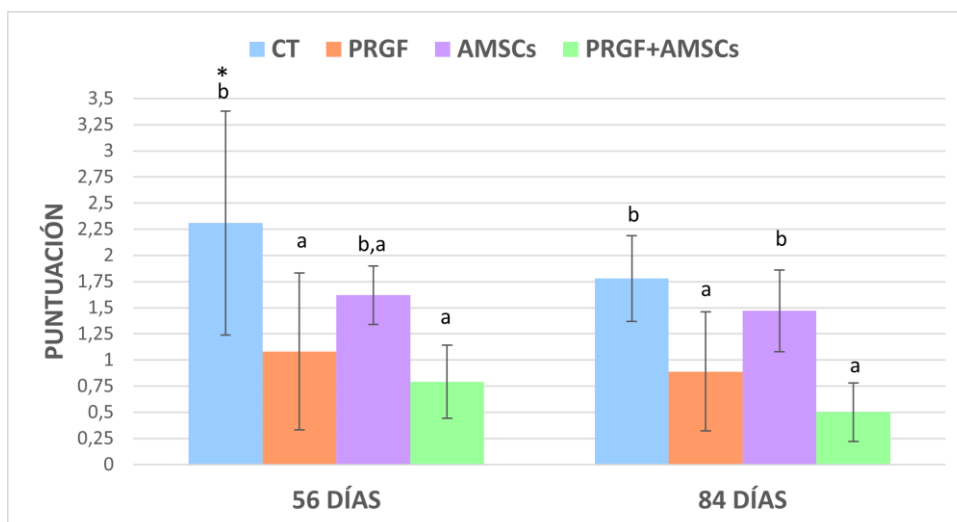
Tabla 21. Estudio comparativo entre tiempos de la variable superficie del defecto en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	2,31	1,07	0,31	1,63	2,99	,00	3,33	<,001
	84	1,78	0,41	0,10	1,58	1,98	1,00	2,33	
PRGF	56	1,08	0,75	0,27	0,46	1,71	0,00	2,33	0,86
	84	0,89	0,57	0,15	0,57	1,21	,00	1,67	
AMSCs	56	1,62	0,28	0,10	1,40	1,86	1,00	2,00	,27
	84	1,47	0,39	0,12	1,19	1,75	0,66	2,00	
PRGF+AMSCs	56	0,79	0,35	0,12	0,49	1,09	0,33	1,33	,07
	84	0,50	0,28	0,09	0,30	0,70	,00	1,00	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 19 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 19. Evaluación de la superficie del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Llenado del defecto

Los resultados obtenidos en los distintos grupos de tratamiento y en los dos tiempos de estudio para la variable relleno del defecto se detallan a continuación en la tabla 22.

Tabla 22. Evaluación del relleno del defecto.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	2,27	1,12	0,19	1,85	2,69	1,00	3,33
	PRGF	1,12	0,50	0,18	0,70	1,54	0,33	1,67
	AMSCs	1,83	0,25	0,09	1,62	2,04	1,67	2,33
	PRGF+AMSCs	0,83	0,19	0,06	0,68	0,98	0,66	1,00
84 DÍAS	CT	1,57	0,39	0,09	1,38	1,77	1,00	2,00
	PRGF	0,98	0,43	0,11	0,74	1,21	0,33	1,67
	AMSCs	1,53	0,36	0,10	1,28	1,79	1,00	2,00
	PRGF+AMSCs	0,51	0,34	0,07	0,26	0,76	,00	1,00

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras la descripción de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como podemos observar en la tabla 23.

Tabla 23. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable llenado del defecto.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	,30	1,00
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	,03	,006
	PRGF+AMSCs	1,00	,029
AMSCs	CT	,30	1,00
	PRGF	,03	,006
	PRGF+AMSCs	,001	<,001
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	,029
	AMSCs	,001	<,001

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

A los 56 días de la realización de la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo una puntuación significativamente más baja que el grupo CT y el grupo AMSCs. Por otro lado, el grupo CT fue el que mostró resultados más bajos, sin observarse diferencias significativas con el grupo AMSCs. En los grupos PRGF+AMSCs y PRGF se describió un llenado del defecto superior al 50% de su profundidad inicial, mientras que en los grupos CT y AMSCs este llenado fue inferior al 50% de la profundidad del defecto.

Pasados 84 días, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo resultados significativamente mejores que los obtenidos por los grupos CT, PRGF y AMSCs. Por otro lado, el grupo CT y el grupo AMSCs no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero obtuvieron una puntuación significativamente más alta que la del grupo PRGF y PRGF+AMSCs. En este tiempo de estudio, se describió que en el grupo PRGF+AMSCs el tejido de reparación estaba en la mayoría de los casos al mismo nivel que el cartílago adyacente, mientras que en el grupo PRGF se consideró que el llenado del defecto estaba alrededor del 75-80%. En los grupos CT y AMSCs se describió un llenado del defecto de alrededor del 60%.

En este caso, el factor tiempo tiene un efecto significativo en los grupos CT, AMSCs y PRGF+AMSCs, en los que se aprecia una puntuación significativamente más baja a los 84 días en comparación con la obtenida a los 56 días (Tabla 24).

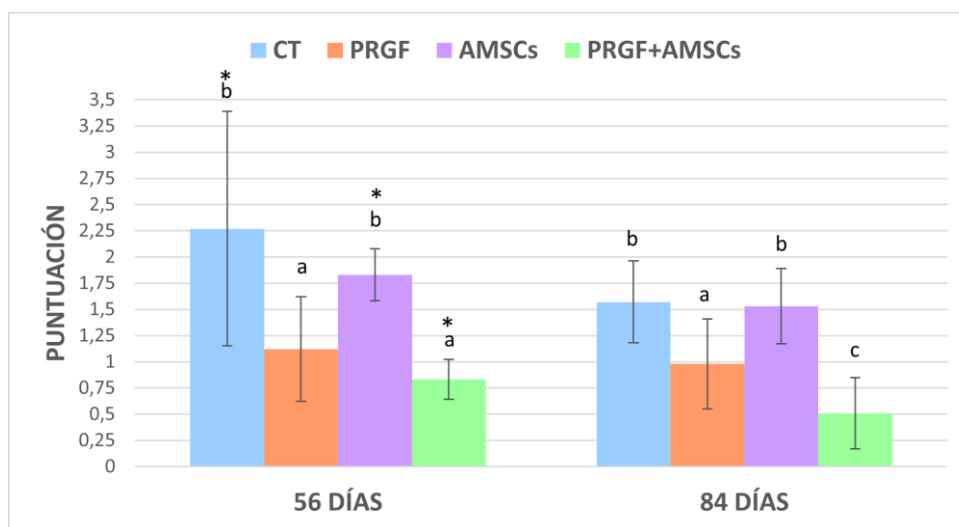
Tabla 24. Estudio comparativo entre tiempos de la variable llenado del defecto en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	2,27	1,12	0,19	1,85	2,69	1,00	3,33	<,001
	84	1,57	0,39	0,09	1,38	1,77	1,00	2,00	
PRGF	56	1,12	0,50	0,18	0,70	1,54	0,33	1,67	,31
	84	0,98	0,43	0,11	0,74	1,21	0,33	1,67	
AMSCs	56	1,83	0,25	0,09	1,62	2,04	1,67	2,33	0,04
	84	1,53	0,36	0,10	1,28	1,79	1,00	2,00	
PRGF + AMSCs	56	0,83	0,19	0,06	0,68	0,98	0,66	1,00	0,03
	84	0,51	0,34	0,07	0,26	0,76	,00	1,00	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 20 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 20. Evaluación del llenado del defecto en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Degeneración del cartílago adyacente

Los resultados obtenidos en los distintos grupos de tratamiento y en los dos tiempos de estudio para la variable degeneración del AC adyacente se detallan a continuación en la tabla 25.

Tabla 25. Evaluación del nivel de degeneración del cartílago articular adyacente.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	1,95	0,65	0,19	1,54	2,37	0,67	2,67
	PRGF	1,21	0,30	0,11	0,95	1,46	0,67	1,67
	AMSCs	1,41	0,23	0,08	1,22	1,61	1,00	1,67
	PRGF+AMSCs	0,99	0,44	0,15	0,63	1,36	0,33	1,67
84 DÍAS	CT	1,61	0,35	0,08	1,44	1,78	1,00	2,33
	PRGF	1,09	0,49	0,13	0,81	1,36	0,33	2,00
	AMSCs	1,23	0,22	0,07	1,07	1,39	1,00	1,67
	PRGF+AMSCs	0,57	0,47	0,15	0,23	0,90	,00	1,33

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras la descripción de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como podemos observar en la tabla 26.

Tabla 26. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable degeneración del cartílago adyacente.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	,009	,003
	AMSCs	,10	,12
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	,009	,003
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	1,00	,016
AMSCs	CT	,10	,12
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,50	,003
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	,016
	AMSCs	,50	,003

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Transcurridos 56 días tras la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs mostró los resultados más bajos, sin embargo, solo se obtuvieron diferencias significativas con el grupo CT. El grupo CT a su vez, obtuvo resultados significativamente peores que los obtenidos por

los grupos PRGF y PRGF+AMSCs. En los grupos PRGF+AMSCs y PRGF se observaron grietas superficiales en la zona de integración, mientras que en los grupos CT y AMSCs se observaron grietas profundas y fibrilación del AC adyacente al defecto, incluso en algunos casos se describieron cambios degenerativos difusos.

A los 84 días, el grupo PRGF+AMSCs mostró una puntuación significativamente más baja que el resto de los grupos. El grupo CT obtuvo la puntuación más alta, mostrando resultados significativamente peores que los obtenidos por los grupos PRGF y PRGF+AMSCs. No se observaron diferencias significativas entre el grupo PRGF y el grupo AMSCs. En el grupo PRGF+AMSCs, el cartílago adyacente se describió como normal en la mayoría de los casos, mientras que en los grupos AMSCs y PRGF se describió la presencia de grietas superficiales y en el grupo CT grietas de mayor profundidad.

Por otro lado, el factor tiempo solo ejerció un efecto sobre los grupos CT y PRGF+AMSCs, en los que se observa una mejora del AC adyacente a los 84 días en comparación con los 56 días tras la cirugía (Tabla 27).

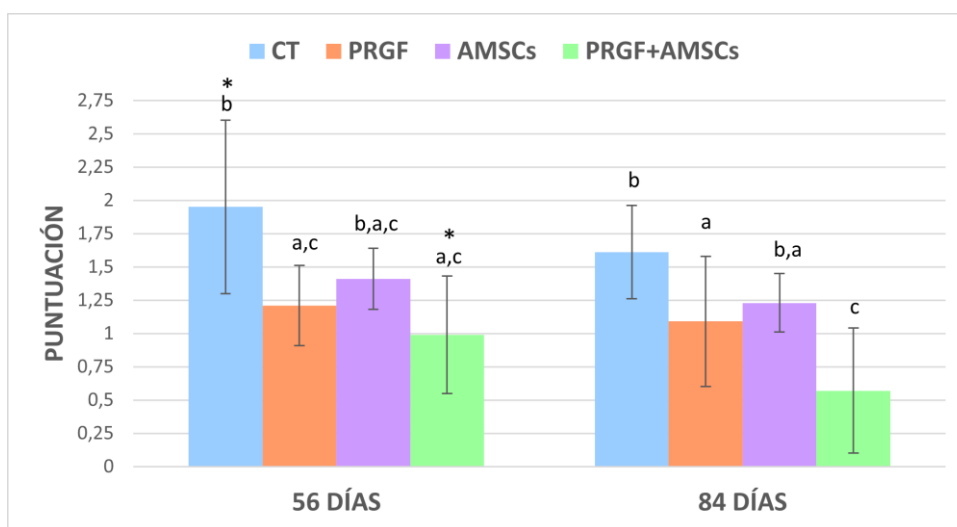
Tabla 27. Estudio comparativo entre tiempos de la variable degeneración del cartílago adyacente en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	1,95	0,65	0,19	1,54	2,37	0,67	2,67	,04
	84	1,61	0,35	0,08	1,44	1,78	1,00	2,33	
PRGF	56	1,21	0,30	0,11	0,95	1,46	0,67	1,67	,53
	84	1,09	0,49	0,13	0,81	1,36	0,33	2,00	
AMSCs	56	1,41	0,23	0,08	1,22	1,61	1,00	1,67	,59
	84	1,23	0,22	0,07	1,07	1,39	1,00	1,67	
PRGF + AMSCs	56	0,99	0,44	0,15	0,63	1,36	0,33	1,67	,04
	84	0,57	0,47	0,15	0,23	0,90	0,00	1,33	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 21 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 21. Evaluación del cartílago articular adyacente al defecto en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Valoración global

A continuación, en la tabla 28, se describen los resultados obtenidos en los distintos grupos de tratamiento y en los dos tiempos de estudio para la variable valoración global, que se calcula como la suma de las variables anteriormente descritas.

Tabla 28. Evaluación de la puntuación total.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	9,57	1,75	0,50	8,46	10,67	6,00	13,00
	PRGF	6,96	1,41	0,49	5,78	8,14	4,67	9,00
	AMSCs	7,44	0,71	0,25	6,85	8,04	6,33	8,33
	PRGF+AMSCs	4,87	0,47	0,17	4,48	5,26	4,33	5,66
84 DÍAS	CT	7,46	1,02	0,24	6,75	7,76	5,33	9,33
	PRGF	4,51	1,66	0,43	3,79	5,63	1,33	6,67
	AMSCs	5,79	0,82	0,26	5,20	6,38	4,32	6,67
	PRGF+AMSCs	2,24	0,99	0,31	1,53	2,95	0,99	4,00

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

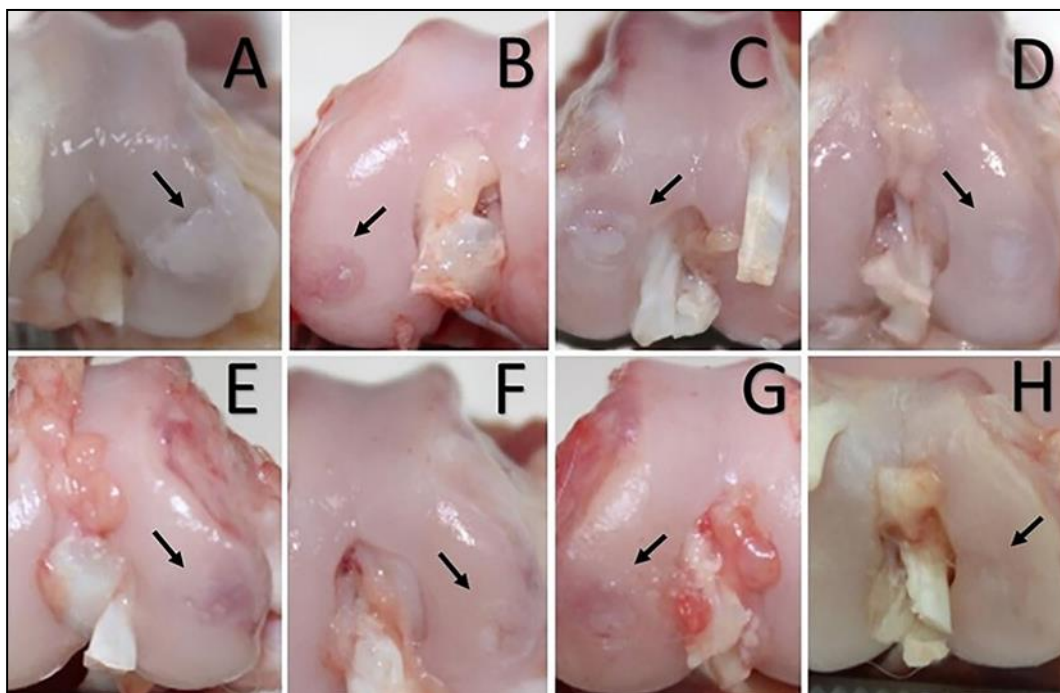
Tras la descripción de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como podemos observar en la tabla 29.

Tabla 29. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable puntuación total.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	,006	,02
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	,19
	PRGF+AMSCs	,016	<,001
AMSCs	CT	,006	,02
	PRGF	1,00	,19
	PRGF+AMSCs	,002	<,001
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,016	<,001
	AMSCs	,002	<,001

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tanto 56 como 84 días después de la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo una puntuación total significativamente más baja que el resto de los grupos. Por el contrario, el grupo CT mostró la puntuación total más alta significativamente, mientras que entre el grupo PRGF y el grupo AMSCs no se apreciaron diferencias significativas (Imagen 22).

Imagen 22. Evaluación macroscópica de los defectos osteocondrales 56 y 84 días tras la cirugía.

A y E: grupo control, 56 y 84 días tras la cirugía respectivamente. A, se aprecia un sobrecrecimiento del tejido de reparación, con color blanco intenso. E, se observa que prácticamente la totalidad de la profundidad del defecto está cubierta con tejido de reparación, sin embargo la superficie presenta erosiones y grandes irregularidades, además de ser evidente el aumento de vascularización. B y F: grupo Plasma Rico en Factores de Crecimiento, 56 y 84 días respectivamente. B, prácticamente la totalidad del defecto está cubierta con tejido de reparación similar al cartílago articular circundante, aunque se puede observar un aumento en la vascularización. F, el defecto está completamente relleno, en línea con el tejido adyacente aunque se observa una grieta en la superficie. C y G: Grupo Células Madre Mesenquimales Derivadas de la Grasa 56 y 84 días respectivamente. C, se observa un tejido de reparación heterogéneo, con grietas en la superficie, aunque el defecto aparece prácticamente cubierto. G, el defecto ha sido relleno por completo con tejido de reparación, que se encuentra en línea con el cartílago articular que lo rodea, aunque se aprecian algunas zonas de erosión alrededor del defecto. D y H: Grupo Plasma Rico en Factores de Crecimiento asociado con Células Madre Mesenquimales Derivadas de la Grasa. D, el tejido de reparación cubre la totalidad del defecto y se integra de forma adecuada con el cartílago adyacente, además, la coloración es muy similar a la del cartílago hialino. H, el tejido de reparación está completamente integrado con el cartílago circundante y es difícil detectar la zona del defecto.

En cuanto al factor tiempo, la variable puntuación total mostró resultados significativamente más bajos 84 días tras la cirugía en todos los grupos de tratamiento (Tabla 30).

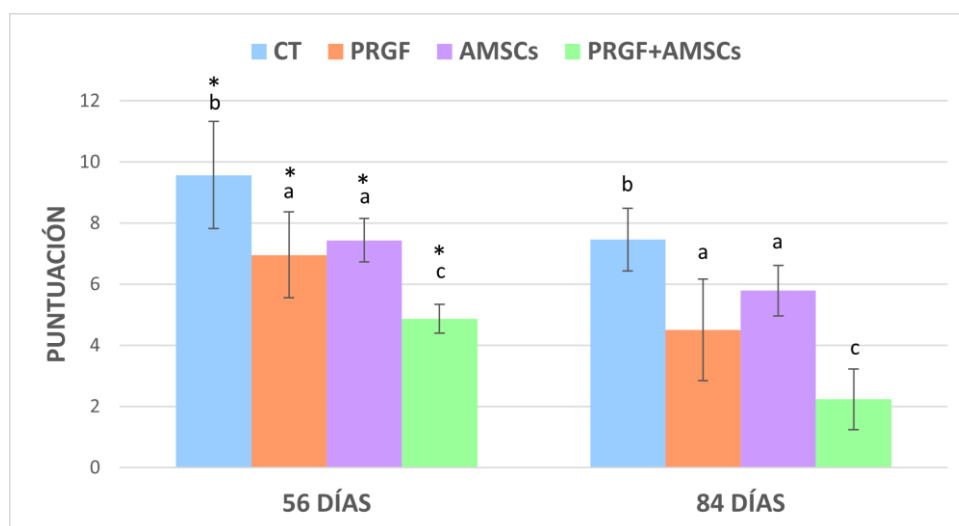
Tabla 30. Estudio comparativo entre tiempos de la variable puntuación total en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	9,57	1,75	0,50	8,46	10,67	6,00	13,00	<,001
	84	7,46	1,02	0,24	6,75	7,76	5,33	9,33	
PRGF	56	6,96	1,41	0,49	5,78	8,14	4,67	9,00	,002
	84	4,51	1,66	0,43	3,79	5,63	1,33	6,67	
AMSCs	56	7,44	0,71	0,25	6,85	8,04	6,33	8,33	<,001
	84	5,79	0,82	0,26	5,20	6,38	4,32	6,67	
PRGF + AMSCs	56	4,87	0,47	0,17	4,48	5,26	4,33	5,66	<,001
	84	2,24	0,99	0,31	1,53	2,95	0,99	4,00	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 23 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 23. Evaluación global del defecto a nivel macroscópico en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Estudio descriptivo y comparativo de la evaluación histológica

El análisis histológico se realizó siguiendo dos escalas, la escala propuesta por la OARSI para la evaluación de lesiones condrales experimentales en conejos [552], y la escala ICRS II [551].

Escala OARSI

La escala OARSI se divide en cinco parámetros entre los que se incluyen:

- Tinción con Safranina O- Verde rápido.
- Estructura del tejido de reparación.
- Densidad de los condrocitos.
- Formación de agrupaciones de condrocitos.

- Valoración global

La variable tinción con safranina O-Verde rápido puede obtener una puntuación comprendida entre 0 y 6. En cuanto a la variable estructura del tejido de reparación la puntuación está comprendida entre 0 y 11. Para la variable densidad de los condrocitos se describe una puntuación comprendida entre 0 y 4 puntos. Por último, para la variable densidad de los condrocitos, la puntuación estará comprendida entre 0 y 4 puntos. De este modo, la puntuación total obtenida por el defecto puede variar entre 0 y 24 puntos, siendo 24 lo menos deseable.

Tinción con Safranina O- Verde rápido

A continuación, en la tabla 31, se recogen los datos obtenidos para la variable tinción con safranina O- verde rápido en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 31. Evaluación de la tinción con safranina O- verde rápido.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	3,80	1,14	0,29	3,17	4,43	2	5
	PRGF	1,88	0,50	0,12	1,72	2,28	1	3
	AMSCs	2,25	0,77	0,19	1,84	2,66	1	4
	PRGF+AMSCs	1,38	0,50	0,12	1,11	1,64	1	2
84 DÍAS	CT	3,29	1,06	0,28	2,67	3,90	2	5
	PRGF	0,94	0,85	0,17	,70	1,42	0	2
	AMSCs	1,69	0,79	0,19	1,26	2,11	0	3
	PRGF+AMSCs	0,69	0,60	0,15	0,37	1,01	0	2

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras la descripción de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como se puede observar en la tabla 32.

Tabla 32. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable tinción con safranina O-verde rápido.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	,18
	PRGF+AMSCs	,15	1,00
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	,18
	PRGF+AMSCs	,013	,005
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,15	1,00
	AMSCs	,013	,005

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Se observa que, tanto a los 56 como a los 84 días tras la cirugía, el grupo CT mostró una puntuación significativamente más alta que el resto de los grupos, mientras que el grupo PRGF+AMSCs mostró una puntuación significativamente más baja que los grupos CT y AMSCs. Por otro lado, no se observan diferencias significativas entre los grupos PRGF+AMSCs y PRGF, o los grupos PRGF y AMSCs.

En el grupo CT, en ambos tiempos de estudio se describió pérdida de tinción en aproximadamente los 2/3 superiores del tejido de reparación, sin existir diferencias significativas entre los dos tiempos de estudio. Algo similar ocurre en el grupo AMSCs, para el que no existen diferencias significativas en función del tiempo de estudio. En este caso, se aprecia una pérdida de tinción difusa en la zona superficial del tejido de reparación. En el grupo PRGF existen diferencias significativas entre tiempos de estudio. Se apreció pérdida de tinción difusa en la zona superficial a los 56 días, mientras que a los 84 días se observó pérdida de tinción en algunas zonas más concretas del defecto. Así mismo, en el grupo PRGF+AMSCs, a los 56 días se describió pérdida de la tinción en zona superficial pero limitada a algunos focos concretos del tejido de reparación, sin embargo, a los 84 días la tinción fue prácticamente uniforme a lo largo de todo el defecto. En el grupo PRGF+AMSCs existen diferencias significativas entre los tiempos de estudio (Tabla 33).

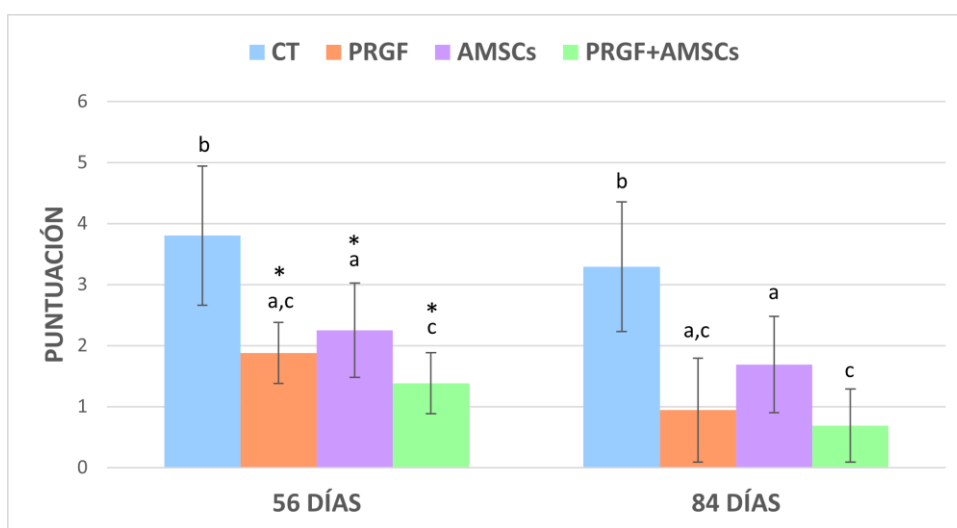
Tabla 33. Estudio comparativo entre tiempos de la variable tinción con safranina O- verde rápido en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	3,80	1,14	0,29	3,17	4,43	2	5	,22
	84	3,29	1,06	0,28	2,67	3,90	2	5	
PRGF	56	1,88	,50	0,12	1,72	2,28	1	3	<,001
	84	0,94	,85	0,17	0,70	1,42	0	2	
AMSCs	56	2,25	,77	0,19	1,84	2,66	1	4	,04
	84	1,69	,79	0,19	1,26	2,11	0	3	
PRGF + AMSCs	56	1,38	0,50	0,12	1,11	1,64	1	2	,001
	84	0,69	0,60	0,15	0,37	1,01	0	2	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 24 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 24. Evaluación de la tinción con safranina O -verde rápido en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Estructura del tejido de reparación

A continuación, en la tabla 34, se describen los datos obtenidos para la variable estructura del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 34. Evaluación de la estructura del tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	6,00	1,41	0,36	5,22	6,78	4	8
	PRGF	2,13	0,81	0,18	1,79	2,59	1	4
	AMSCs	2,44	0,62	0,15	2,10	2,77	2	4
	PRGF+AMSCs	1,63	0,61	0,15	1,30	1,95	1	3
84 DÍAS	CT	4,71	1,72	0,46	3,72	5,71	3	8
	PRGF	1,13	0,76	0,18	1,05	1,83	0	2
	AMSCs	1,38	0,71	0,18	0,99	1,76	0	2
	PRGF+AMSCs	0,75	0,68	0,17	0,39	1,11	0	2

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Una vez descritos los datos, se llevó a cabo un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como se puede observar en la tabla 35.

Tabla 35. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable estructura del tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,50	,38
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,08	,54
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,50	,38
	AMSCs	,08	,54

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tanto 56 como 84 días tras la cirugía, el grupo CT mostró una puntuación significativamente más alta que el resto de los grupos. Sin embargo, a pesar de que el

grupo PRGF+AMSCs obtuvo la menor puntuación, no se observaron diferencias significativas entre los grupos PRGF+AMSCs, PRGF o AMSCs.

En el grupo CT, no se observaron diferencias significativas entre los dos tiempos de estudio y en ambos casos se describió la presencia de erosiones que abarcaban los 2/3 superiores del espesor del tejido de reparación. En cuanto a los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs, todos ellos mostraron una puntuación significativamente más baja 84 días tras la cirugía en comparación con la obtenida 56 días tras la cirugía (Tabla 36). Transcurridos 56 días desde la cirugía, en los tres grupos se apreciaron fisuras en menos del 50% de la zona superficial del tejido de reparación, mientras que, a los 84 días, se apreció que la estructura del tejido de reparación era muy buena, con pequeñas irregularidades en la superficie.

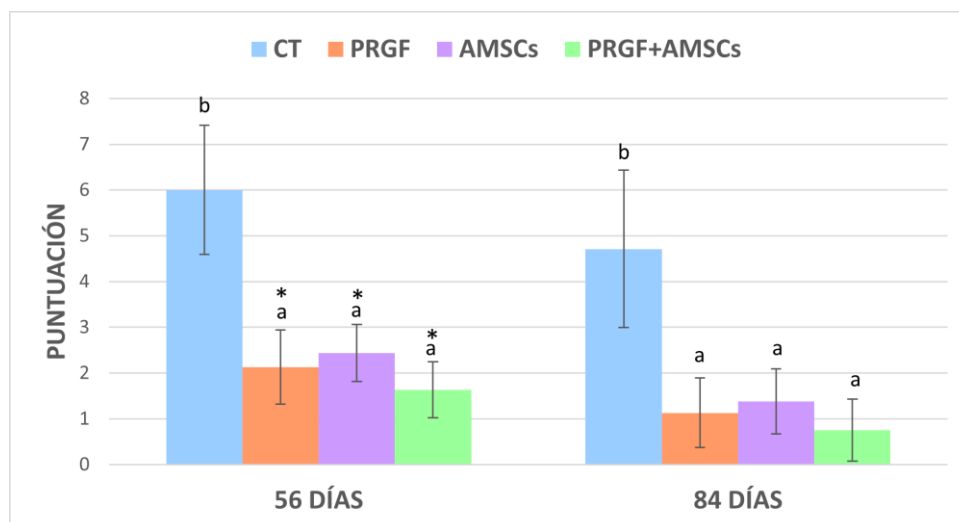
Tabla 36. Estudio comparativo entre tiempos de la variable estructura del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	6,00	1,41	0,36	5,22	6,78	4	8	,05
	84	4,71	1,72	0,46	3,72	5,71	3	8	
PRGF	56	2,13	0,81	0,18	1,79	2,59	1	4	<,001
	84	1,13	0,76	0,18	1,05	1,83	0	2	
AMSCs	56	2,44	0,62	0,15	2,10	2,77	2	4	<,001
	84	1,38	0,71	0,18	0,99	1,76	0	2	
PRGF + AMSCs	56	1,63	0,61	0,15	1,30	1,95	1	3	<,001
	84	0,75	0,68	0,17	0,39	1,11	0	2	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 25 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 25. Evaluación de la estructura del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Densidad de condrocitos

Los datos obtenidos para la variable densidad de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio se describen en la tabla 37.

Tabla 37. Evaluación de la densidad de condrocitos.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	3,40	0,98	0,25	2,85	3,95	2	5
	PRGF	1,31	0,87	0,17	1,39	2,11	1	3
	AMSCs	1,81	0,65	0,16	1,46	2,16	1	3
	PRGF+AMSCs	1,06	0,77	0,19	0,65	1,47	0	3
84 DÍAS	CT	2,79	0,97	0,26	2,22	3,35	1	4
	PRGF	1,13	0,62	0,17	0,89	1,61	0	3
	AMSCs	1,50	0,51	0,12	1,22	1,78	1	2
	PRGF+AMSCs	0,75	0,57	0,14	0,44	1,06	0	2

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Una vez descritos los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como se puede apreciar en la tabla 38.

Tabla 38. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable densidad de condrocitos.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,09	,28
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,05	,02
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,09	,28
	AMSCs	,05	,02

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

El grupo CT mostró una puntuación significativamente más alta que el resto de los grupos tanto 56 como 84 días tras la cirugía. Por otro lado, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo la puntuación más baja en ambos tiempos de estudio, sin embargo, no se observaron diferencias significativas con el grupo PRGF para ninguno de los tiempos, mientras que sí existieron diferencias significativas entre el grupo PRGF+AMSCs y el grupo AMSCs 84 días tras la cirugía. Además, no existieron diferencias significativas entre los grupos PRGF y AMSCs en ninguno de los tiempos de estudio.

En cuanto al factor tiempo, no se observan diferencias significativas en ninguno de los grupos de tratamiento entre los dos tiempos de estudio. Para el grupo CT, en ambos tiempos de estudio se describió un descenso de condrocitos multifocal y confluyente. A los 56 días, en los grupos PRGF y AMSCs, se apreció un descenso de condrocitos multifocal; por el contrario, en el grupo PRGF+AMSCs se describió descenso celular focal. Pasados 84 días de la cirugía, tanto en el grupo PRGF como en el grupo AMSCs se observó descenso focal de celularidad, y en el grupo PRGF+AMSCs se observó una ligera disminución de esta, sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Tabla 39).

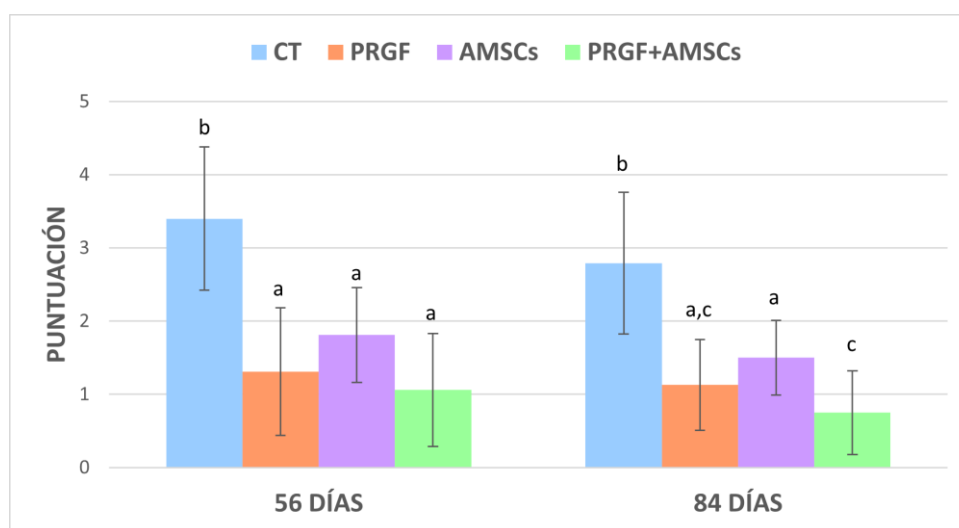
Tabla 39. Estudio comparativo entre tiempos de la variable densidad de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	3,40	0,99	0,25	2,85	3,95	2	5	,65
	84	2,79	0,97	0,26	2,22	3,35	1	4	
PRGF	56	1,31	0,87	0,17	1,39	2,11	1	3	,05
	84	1,13	0,62	0,17	0,89	1,61	0	3	
AMSCs	56	1,81	0,65	0,16	1,46	2,16	1	3	,14
	84	1,50	0,51	0,12	1,22	1,78	1	2	
PRGF+AMSCs	56	1,06	0,77	0,19	0,65	1,47	0	3	,21
	84	0,75	0,57	0,14	0,44	1,06	0	2	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 26 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 26. Evaluación de la densidad de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Formación de agrupaciones de condrocitos

A continuación, en la tabla 40, se detallan los datos obtenidos para la variable formación de agrupaciones, también denominados racimos, de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 40. Evaluación de la formación de agrupaciones de condrocitos.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	2,40	0,50	0,13	2,12	2,68	2	3
	PRGF	1,56	0,57	0,14	1,44	2,06	1	3
	AMSCs	1,88	0,51	0,12	1,72	2,28	1	3
	PRGF+AMSCs	1,38	0,68	0,12	1,11	1,64	1	2
84 DÍAS	CT	2,29	0,82	0,22	1,81	2,76	1	3
	PRGF	1,06	0,77	0,19	0,65	1,47	0	2
	AMSCs	0,89	0,75	0,12	1,16	1,71	1	2
	PRGF+AMSCs	0,44	0,63	0,15	0,16	0,84	0	2

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Realizada la descripción de los datos, se procede a realizar un estudio comparativo entre cada uno de los grupos de estudio como podemos observar en la tabla 41.

Tabla 41. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable formación de agrupaciones de condrocitos.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	,007	<,001
	AMSCs	,004	,009
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	,007	<,001
	AMSCs	1,00	,78
	PRGF+AMSCs	,29	,015
AMSCs	CT	,004	,009
	PRGF	1,00	,78
	PRGF+AMSCs	,008	,002
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,29	,015
	AMSCs	,008	,002

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Después de 56 días desde la realización de la cirugía, el grupo CT mostró una puntuación significativamente más alta que el resto de los grupos PRGF y PRGF+AMSCs, mientras que el grupo PRGF+AMSCs obtuvo una calificación

significativamente más alta que los grupos CT y AMSCs, pero no se observaron diferencias significativas con el grupo PRGF. Sin embargo, 84 días tras la cirugía, el grupo CT mostró resultados significativamente peores que los obtenidos por los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs. Por otro lado, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo una calificación significativamente más baja que los grupos CT, PRGF y AMSCs. No se observaron diferencias significativas entre el grupo PRGF y AMSCs en ninguno de los tiempos de estudio.

Tomando en consideración el factor tiempo, tanto en el grupo PRGF, como en el grupo AMSCs y PRGF+AMSCs la puntuación obtenida 84 días tras la cirugía es significativamente más baja en comparación con la obtenida 56 días después de la cirugía. En contraposición, en el grupo CT no existen diferencias significativas entre ambos tiempos de estudio (Tabla 42). En el grupo CT, en ambos tiempos de estudio se describen entre 4 y 8 racimos de condrocitos, al igual que en los grupos PRGF y AMSCs a los 56 días de la cirugía. Sin embargo, en el grupo PRGF+AMSCs, a los 56 días, se describen menos de 4 racimos de condrocitos en el tejido de reparación. No obstante, a los 84 días, en los grupos PRGF y AMSCs se describen menos de 4 agrupaciones de condrocitos en el tejido de reparación, mientras que en el grupo PRGF+AMSCs están prácticamente ausentes.

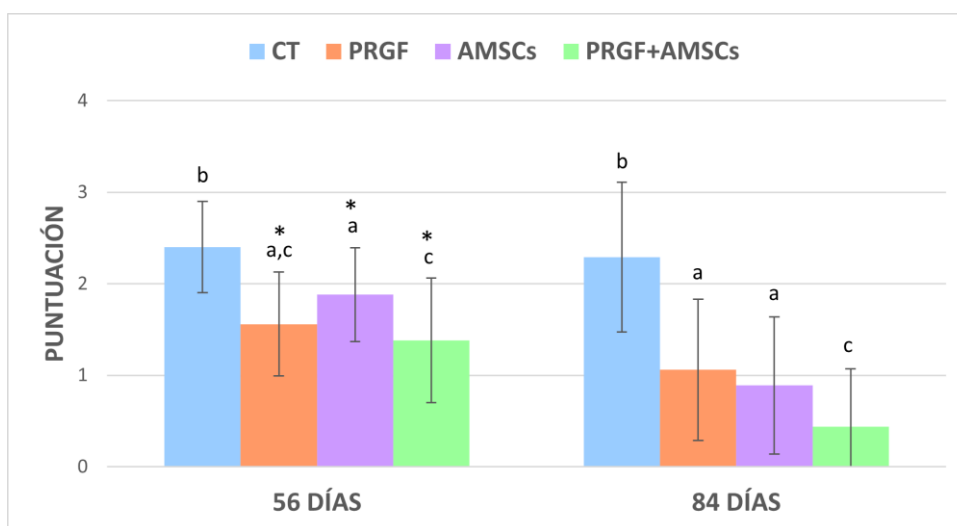
Tabla 42. Estudio comparativo entre tiempos de la variable formación de agrupaciones de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	2,40	0,50	0,13	2,12	2,68	2	3	,65
	84	2,29	0,82	0,22	1,81	2,76	1	3	
PRGF	56	1,56	0,57	0,14	1,44	2,06	1	3	,008
	84	1,06	0,77	0,19	0,65	1,47	0	2	
AMSCs	56	1,88	0,51	0,12	1,72	2,28	1	3	,004
	84	0,89	0,51	0,12	1,16	1,71	1	2	
PRGF+AMSCs	56	1,38	0,50	0,12	1,11	1,64	1	2	<,001
	84	0,44	0,63	0,15	0,16	0,84	0	2	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 27 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 27. Evaluación de la formación de agrupaciones de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Valoración global del tejido de reparación

Por último, en la tabla 43 se describen los datos obtenidos para la variable valoración global en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio, que se corresponde con la suma de la puntuación obtenida en los parámetros anteriormente descritos.

Tabla 43. Evaluación global del tejido reparación de los distintos grupos de tratamiento y en los distintos tiempos siguiendo la escala OARSI

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	15,60	2,41	0,62	14,26	16,94	12	19
	PRGF	6,88	1,63	0,44	6,74	8,64	5	12
	AMSCs	8,38	1,71	0,42	7,59	9,41	5	12
	PRGF+AMSCs	5,44	1,50	0,37	4,64	6,24	3	8
84 DÍAS	CT	13,07	2,73	0,73	11,49	14,65	8	18
	PRGF	4,26	1,94	0,48	3,78	5,85	1	8
	AMSCs	5,45	1,67	0,41	5,11	6,89	2	9
	PRGF+AMSCs	2,69	1,92	0,48	1,66	3,71	0	6

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras el estudio descriptivo, se realizó un estudio comparativo entre los distintos grupos de estudio como se puede observar en la tabla 44.

Tabla 44. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable valoración global del tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	,67
	PRGF+AMSCs	,007	,03
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	,67
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF+AMSCs	CT	<,001	,001
	PRGF	,007	,03
	AMSCs	<,001	<,001

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

El grupo CT muestra resultados significativamente más altos que los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs en todos los tiempos de estudio. Por el contrario, el grupo PRGF+AMSCs muestra resultados significativamente más bajos que el resto de los grupos en ambos tiempos de estudio, sin embargo, no existen diferencias significativas entre el grupo PRGF y el grupo AMSCs, aunque el grupo PRGF muestra resultados ligeramente mejores en todas las variables.

En cuanto al factor tiempo, todos los grupos de estudio muestran resultados significativamente más bajos 84 días después de la cirugía en comparación con los resultados obtenidos 56 días tras la cirugía.

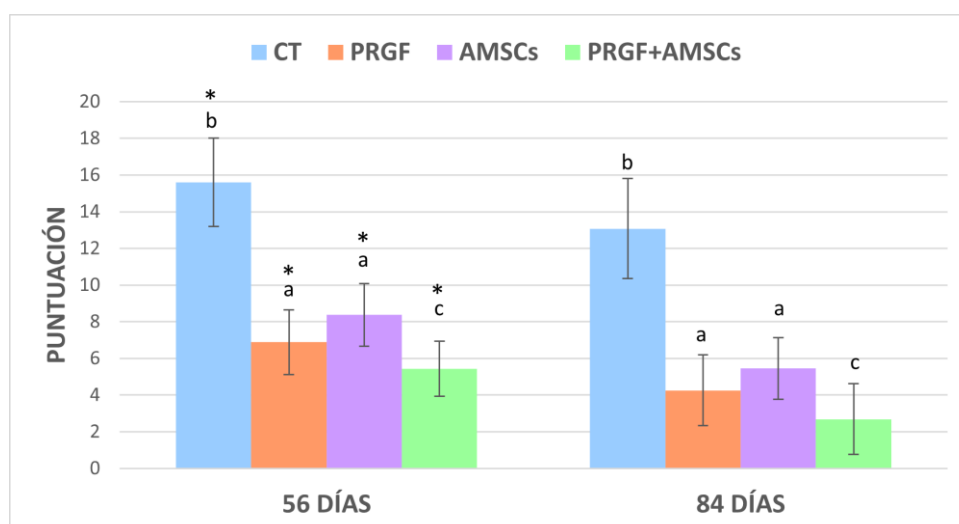
Tabla 45. Estudio comparativo entre tiempos de la variable valoración global en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	15,60	2,41	,62	14,26	16,94	12	19	<,001
	84	13,07	2,73	,73	11,49	14,65	8	18	
PRGF	56	6,88	1,63	,44	6,74	8,64	5	12	<,001
	84	4,26	1,94	,48	3,78	5,85	1	8	
AMSCs	56	8,38	1,71	,42	7,59	9,41	5	12	<,001
	84	5,45	1,67	,41	5,11	6,89	2	9	
PRGF+AMSCs	56	5,44	1,50	,37	4,64	6,24	3	8	<,001
	84	2,69	1,92	,48	1,66	3,71	0	6	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 28 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 28. Evaluación global del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio siguiendo la escala OARSI.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Escala ICRS II

La escala ICRS II se compone de trece parámetros entre los que se incluyen:

- Tinción de la matriz
- Morfología celular
- Formación de agrupaciones o racimos de condrocitos
- Arquitectura de la superficie
- Integración basal
- Formación de la línea de marea
- Anomalías en el hueso subcondral
- Inflamación
- Calcificación anómala
- Vascularización
- Valoración de la superficie
- Valoración de la zona media/profunda
- Valoración general

Cada parámetro se evalúa en base a la escala analógica visual obteniendo así una puntuación comprendida entre 0% (peor puntuación posible) y 100% (mejor puntuación posible).

Tinción de la matriz

A continuación, en la tabla 46, se describen los datos obtenidos para la variable tinción de la matriz en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 46. Evaluación de la tinción de la matriz en el tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	52,50	14,83	3,70	44,60	60,40	40	80
	PRGF	79,00	10,38	2,68	73,25	84,75	70	100
	AMSCs	75,00	9,68	2,34	70,02	79,98	60	90
	PRGF+AMSCs	84,38	8,92	2,23	79,62	89,13	70	100
84 DÍAS	CT	47,14	12,66	3,38	39,83	54,46	30	70
	PRGF	84,69	10,56	2,64	79,06	90,32	70	100
	AMSCs	80,67	9,34	2,41	78,49	88,84	70	100
	PRGF+AMSCs	90,63	7,71	1,93	86,51	94,74	80	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras el estudio descriptivo, se realizó un estudio comparativo entre los distintos grupos de estudio como se puede observar en la tabla 47.

Tabla 47. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable tinción de la matriz del tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	1,00	,62
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,12	,37
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	,62
	AMSCs	,12	,37

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Como se puede observar, el grupo CT mostró resultados significativamente más bajos que el resto de los grupos, significando esto que son peores, tanto 56 como 84 días tras la cirugía. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs en ninguno de los tiempos de estudio.

En el grupo CT se observó una pérdida de tinción con Safranina-O en la MEC, lo que implica una pérdida de proteoglicanos, que fue evidente en ambos tiempos de estudio, sin observarse diferencias significativas entre estos. Además, la tinción con hematoxilina-eosina puso de manifiesto una MEC eosinófila, con un tono más similar al fibrocartilago que al cartilago hialino. Por el contrario, en los grupos PRGF, AMSCs y

PRGF+AMSCs, 56 días tras la cirugía se observó una ligera pérdida de tinción del AC con la tinción Safranina-O, que mejoró significativamente a los 84 días tras la cirugía (Tabla 48). Con respecto a la tinción con hematoxilina-eosina, la MEC en estos grupos mostró un tono basófilo, similar al del cartílago hialino.

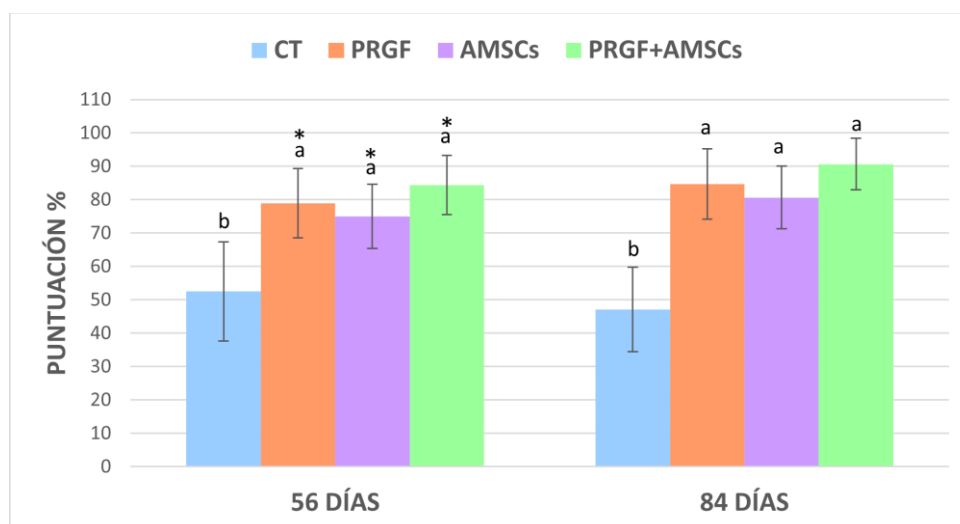
Tabla 48. Estudio comparativo entre tiempos de la variable tinción de la matriz en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	52,50	14,83	3,70	44,60	60,40	40	80	,30
	84	47,14	12,66	3,38	39,83	54,46	30	70	
PRGF	56	79,00	10,38	2,68	73,25	84,75	70	100	,04
	84	84,69	10,56	2,64	79,06	90,32	70	100	
AMSCs	56	75,00	9,68	2,34	70,02	79,98	60	90	,004
	84	80,67	9,34	2,41	78,49	88,84	70	100	
PRGF+AMSCs	56	84,38	8,92	2,23	79,62	89,13	70	100	,04
	84	90,63	7,71	1,93	86,51	94,74	80	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 29 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 29. Evaluación de la tinción de la matriz en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Morfología celular

En la tabla 49 se describen los datos obtenidos para la variable morfología celular en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 49. Evaluación de la morfología celular en el tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	40,00	9,66	2,41	34,85	45,15	30	60
	PRGF	72,00	10,82	2,79	66,01	77,99	50	90
	AMSCs	74,76	8,82	2,14	67,23	76,30	50	90
	PRGF+AMSCs	80,63	6,80	1,70	77,00	84,25	70	100
84 DÍAS	CT	53,57	13,36	3,57	45,86	61,29	30	70
	PRGF	85,00	8,94	2,23	80,23	89,77	70	100
	AMSCs	82,67	9,61	2,48	77,34	87,99	70	100
	PRGF+AMSCs	95,63	6,29	1,57	92,27	98,98	80	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Como se puede observar en la tabla 50, tras realizar el estudio descriptivo, se realizó un estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento.

Tabla 50. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable morfología celular en el tejido de reparación

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,06	,02
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,06	,003
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,06	,02
	AMSCs	,06	,003

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

El grupo CT obtuvo una puntuación significativamente más baja que el resto de los grupos en ambos tiempos de estudio. Pasados 56 días de la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo resultados significativamente más altos que el grupo CT, pero, no existieron diferencias significativas con los grupos PRGF y AMSCs. No obstante, 84 días tras la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs mostró resultados significativamente mejores

que los demás grupos, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los grupos PRGF y AMSCs.

A los 56 días, en el grupo CT, las células eran en su mayoría alargadas y planas. A medida que avanzó el proceso de reparación, fueron adquiriendo una forma más redondeada, y como se puede ver en la tabla 51, se apreciaron diferencias significativas entre los tiempos de estudio. En el resto de los grupos, la forma de los condrocitos fue principalmente redondeada u ovalada, asemejándose más a los condrocitos presentes en el AC sano. Del mismo modo, la morfología celular mejoró significativamente en los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs a medida que avanzó el proceso de reparación condral.

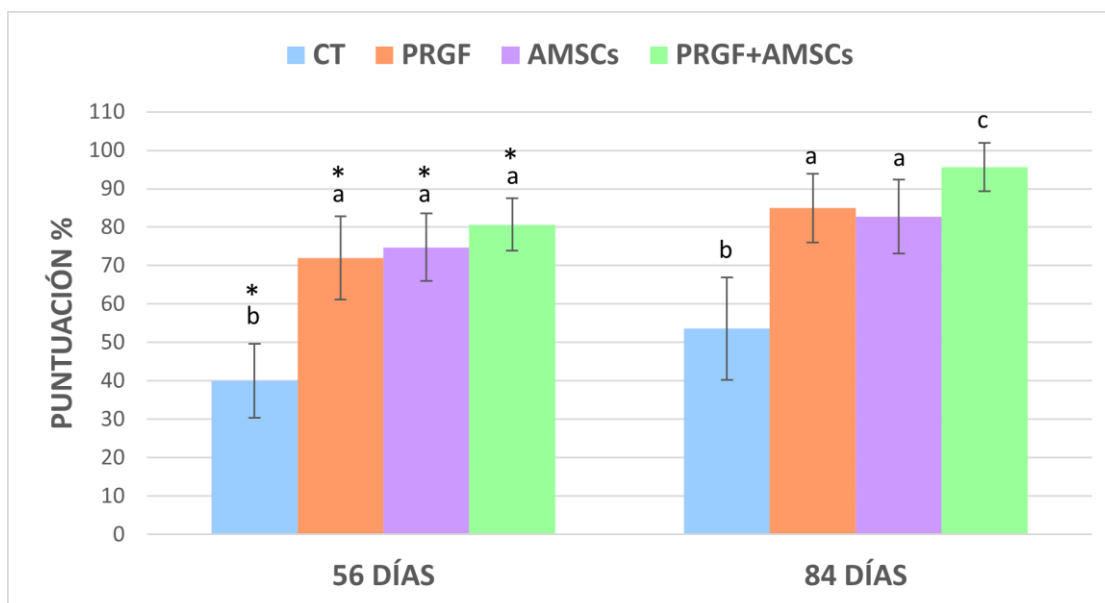
Tabla 51. Estudio comparativo entre tiempos de la variable morfología celular en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	40,00	9,66	2,41	34,85	45,15	30	60	0,003
	84	53,57	13,36	3,57	45,86	61,29	30	70	
PRGF	56	72,00	10,82	2,79	66,01	77,99	50	90	<,001
	84	85,00	8,94	2,23	80,23	89,77	70	100	
AMSCs	56	74,76	8,82	2,14	67,23	76,30	50	90	0,001
	84	82,67	9,61	2,48	77,34	87,99	70	100	
PRGF+AMSCs	56	80,63	6,80	1,70	77,00	84,25	70	100	<,001
	84	95,63	6,29	1,57	92,27	98,98	80	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 30 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 30. Evaluación de la morfología celular en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Formación de agrupaciones de condrocitos

En la tabla 52 se describen los datos obtenidos para la variable agrupación de los condrocitos en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 52. Evaluación de la agrupaciones de condrocitos en el tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	45,63	13,64	3,41	38,35	52,90	30	80
	PRGF	61,33	17,26	4,45	51,77	70,89	30	80
	AMSCs	55,18	14,41	3,49	53,76	68,59	30	80
	PRGF+AMSCs	80,63	9,28	2,32	75,68	85,57	60	90
84 DÍAS	CT	47,14	18,15	4,85	36,66	57,63	20	80
	PRGF	85,00	10,95	2,73	79,16	90,84	70	100
	AMSCs	88,67	10,60	2,73	78,80	90,54	70	100
	PRGF+AMSCs	96,88	6,02	1,50	93,67	100,08	80	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras realizar el estudio descriptivo, como se puede observar en la tabla 53, se llevó a cabo un estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento.

Tabla 53. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable agrupaciones de condrocitos en el tejido de reparación

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	,02	<,001
	AMSCs	,01	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	,02	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,002	,04
AMSCs	CT	,01	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,001	,04
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,002	,04
	AMSCs	,001	,04

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Para la variable agrupaciones de condrocitos, el grupo CT mostró una puntuación significativamente más baja que los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs en ambos tiempos de estudio. Así mismo, el grupo PRGF+AMSCs mostró resultados significativamente más altos que el resto de los grupos, tanto 56 como 84 días tras la cirugía. No se observaron diferencias significativas entre los grupos PRGF y AMSCs en ninguno de los tiempos de estudio.

En el grupo CT no se observaron diferencias significativas en la cantidad de racimos de condrocitos entre los distintos tiempos de estudio. Sin embargo, en el resto de los grupos se apreciaron significativamente menos agrupaciones de condrocitos 84 días tras la cirugía en comparación con 56 días tras la cirugía (Tabla 54).

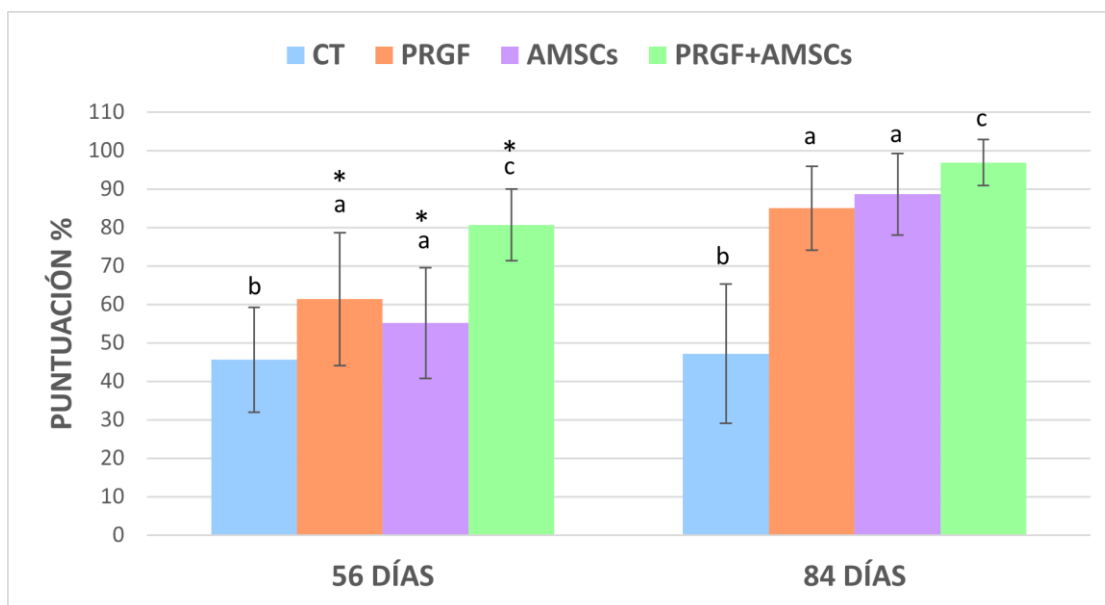
Tabla 54. Estudio comparativo entre tiempos de la variable agrupaciones de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	45,63	13,64	3,41	38,35	52,90	30	80	,79
	84	47,14	18,15	4,85	36,66	57,63	20	80	
PRGF	56	61,33	17,26	4,45	51,77	70,89	30	80	<,001
	84	85,00	10,95	2,73	79,16	90,84	70	100	
AMSCs	56	55,18	14,419	3,49	53,76	68,59	30	80	<,001
	84	88,67	10,60	2,73	78,80	90,54	70	100	
PRGF+AMSCS	56	80,63	9,28	2,32	75,68	85,57	60	90	<,001
	84	96,88	6,02	1,50	93,67	100,08	80	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa

En la imagen 31 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 31. Evaluación de la formación de agrupaciones de condrocitos en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Arquitectura de la superficie

A continuación, en la tabla 55, se describen los datos obtenidos para la variable arquitectura de la superficie en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 55. Evaluación de la arquitectura de la superficie en el tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	45,63	14,12	3,53	38,10	53,15	20	70
	PRGF	68,00	9,41	2,43	62,79	73,21	60	80
	AMSCs	63,06	9,69	2,35	62,08	72,04	50	80
	PRGF+AMSCs	78,13	11,08	2,77	72,22	84,03	60	90
84 DÍAS	CT	56,07	11,12	2,97	49,65	62,49	40	80
	PRGF	78,75	8,66	2,16	74,14	83,36	70	90
	AMSCs	77,00	7,51	1,94	73,84	82,16	70	90
	PRGF+AMSCs	95,00	6,32	1,58	91,63	98,37	80	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Posteriormente, como se puede observar en la tabla 56, se realizó un estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento.

Tabla 56. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable arquitectura de la superficie del tejido de reparación

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,09	<,001
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,03	<,001
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,09	<,001
	AMSCs	,03	<,001

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

El grupo CT obtuvo una puntuación significativamente más baja que el resto de grupos en ambos tiempos de estudio. Por otro lado, 56 días tras la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs mostró resultados significativamente mejores que los grupos CT y AMSCs, pero no presentó diferencias significativas con el grupo PRGF. Por el contrario,

84 días tras la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo resultados significativamente mejores que el resto de los grupos. En ninguno de los tiempos de estudio se observaron diferencias significativas entre el grupo AMSCs y PRGF.

En el grupo CT, la superficie del defecto se apreció con grandes irregularidades y pérdida de continuidad. Además, se observaron fisuras que llegaban hasta el SB. En algunos animales, incluso se describió pérdida completa del AC. En los grupos AMSCs y PRGF se observó una superficie irregular, con erosiones y pequeñas grietas, mientras que en el grupo PRGF+AMSCs se observó una superficie articular prácticamente intacta, con ligeras irregularidades. En todos los grupos se observó una puntuación significativamente más baja 56 días tras la cirugía que transcurridos 84 días desde la cirugía (Tabla 57).

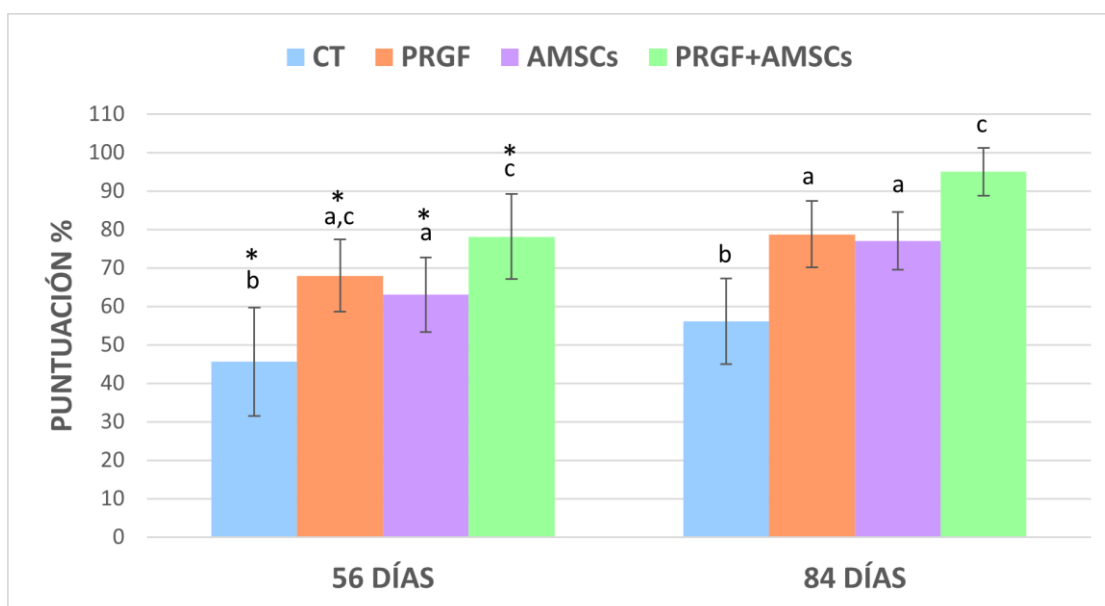
Tabla 57. Estudio comparativo entre tiempos de la variable arquitectura de la superficie en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	45,63	14,12	3,53	38,10	53,15	20	70	,02
	84	56,07	11,12	2,97	49,65	62,49	40	80	
PRGF	56	68,00	9,41	2,43	62,79	73,21	60	80	,002
	84	78,75	8,66	2,16	74,14	83,36	70	90	
AMSCs	56	63,06	9,69	2,35	62,08	72,04	50	80	,002
	84	77,00	7,51	1,94	73,84	82,16	70	90	
PRGF+AMSCs	56	78,13	11,08	2,77	72,22	84,03	60	90	<,001
	84	95,00	6,32	1,58	91,63	98,37	80	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 32 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 32. Evaluación de la arquitectura de la superficie del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Integración basal

En la tabla 58 se detallan los datos obtenidos para la variable morfología celular en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 58. Evaluación de la integración basal en el tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	28,13	21,04	5,26	16,91	39,34	20	70
	PRGF	75,33	13,55	3,50	67,83	82,84	50	100
	AMSCs	70,59	9,66	2,34	65,62	75,56	50	90
	PRGF+AMSCs	80,63	9,28	2,32	75,68	85,57	60	100
84 DÍAS	CT	61,43	10,99	2,93	55,08	67,78	50	80
	PRGF	81,25	10,87	2,72	75,45	87,05	70	100
	AMSCs	80,00	10,00	2,58	74,46	85,54	70	100
	PRGF+AMSCs	90,63	8,53	2,13	86,07	95,18	80	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Una vez llevado a cabo el estudio descriptivo, se procedió a realizar un estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento (Tabla 59).

Tabla 59. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable integración basal del tejido de reparación

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	1,00	,06
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,27	,03
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	,06
	AMSCs	,27	,03

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

El grupo CT obtuvo una puntuación significativamente más baja que el resto de los grupos en los dos tiempos de estudio evaluados. Por otro lado, 56 días tras la cirugía, no se observaron diferencias significativas entre los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs; sin embargo, 84 días tras la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo una puntuación significativamente más alta que los grupos CT y AMSCs, sin apreciarse diferencias significativas con el grupo PRGF.

En el grupo CT, especialmente 56 días tras la cirugía el tejido neoformado no se encontraba integrado con el cartílago sano circundante ni con el SB subyacente, sin embargo, en el resto de los grupos se apreció una buena integración del tejido de reparación con el AC y el SB adyacente, que mejoró a medida que avanzó el proceso de reparación y regeneración. Todos los grupos, independientemente del grupo de tratamiento, obtuvieron una puntuación significativamente más alta transcurridos 84 días de la cirugía (Tabla 60).

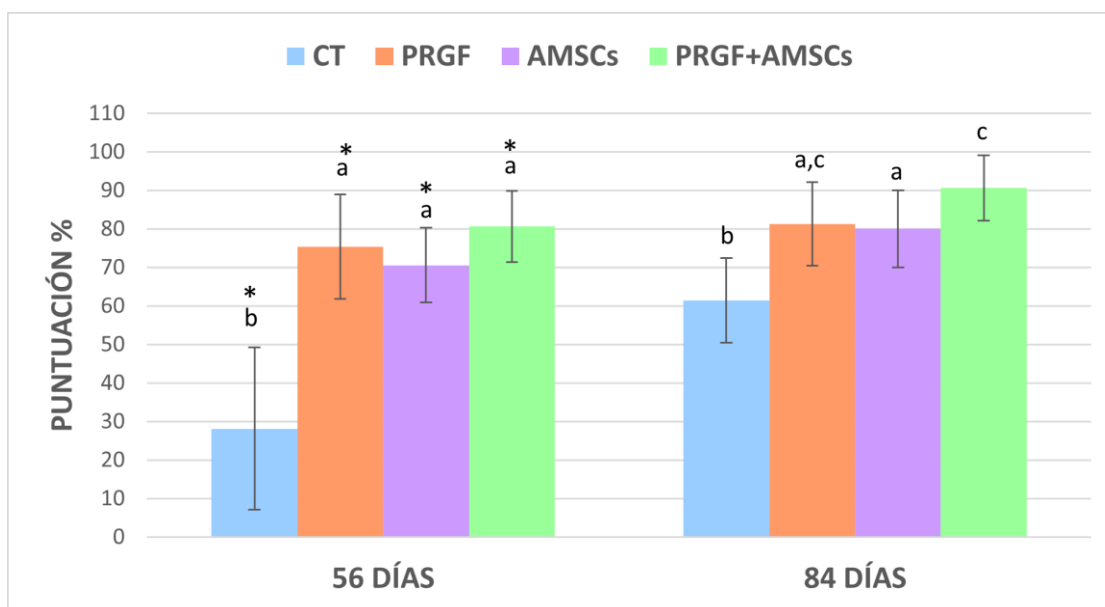
Tabla 60. Estudio comparativo entre tiempos de la variable integración basal en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	28,13	21,04	5,26	16,91	39,34	10	70	<,001
	84	61,43	10,99	2,93	55,08	67,78	50	80	
PRGF	56	75,33	13,55	3,50	67,83	82,84	50	100	0,03
	84	81,25	10,87	2,72	75,45	87,05	70	100	
AMSCs	56	70,59	9,66	2,34	65,62	75,56	50	90	0,02
	84	80,00	10,00	2,58	74,46	85,54	70	100	
PRGF+AMSCs	56	80,63	9,28	2,32	75,68	85,57	60	90	0,003
	84	90,63	8,53	2,13	86,07	95,18	80	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 33 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 33. Evaluación de la integración basal del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Formación de la línea de marea

Los datos obtenidos para la variable formación de la línea de marea o “tidemark” se detallan en la tabla 61.

Tabla 61. Evaluación de la formación de tidemark en el tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	23,75	8,85	2,21	19,03	28,47	10	40
	PRGF	68,00	13,73	3,54	60,40	75,60	50	90
	AMSCs	68,82	15,76	3,82	60,72	76,93	50	100
	PRGF+AMSCs	83,75	10,87	2,72	77,95	89,55	60	100
84 DÍAS	CT	35,00	14,14	3,78	26,83	43,17	15	60
	PRGF	80,00	11,54	2,88	73,85	86,15	60	100
	AMSCs	76,67	10,46	2,70	70,87	82,46	60	100
	PRGF+AMSCs	93,13	8,73	2,18	88,47	97,78	80	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Una vez realizado el estudio descriptivo, se llevó a cabo el estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento (Tabla 62).

Tabla 62. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable formación de tidemark en el tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSC	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,006	,01
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,007	,001
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,006	,01
	AMSCs	,007	,001

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

El grupo CT mostró resultados significativamente más bajos que el resto de los grupos, mientras que el grupo PRGF+AMSCs obtuvo una puntuación significativamente

más alta que el resto, tanto 56 como 84 días tras la cirugía. No se observaron diferencias significativas entre los grupos AMSCs y PRGF en ninguno de los tiempos de estudio.

Como se muestra en la tabla 63, se observaron resultados significativamente más altos 84 días tras la cirugía en comparación con los obtenidos 56 días tras la cirugía en todos los grupos de tratamiento.

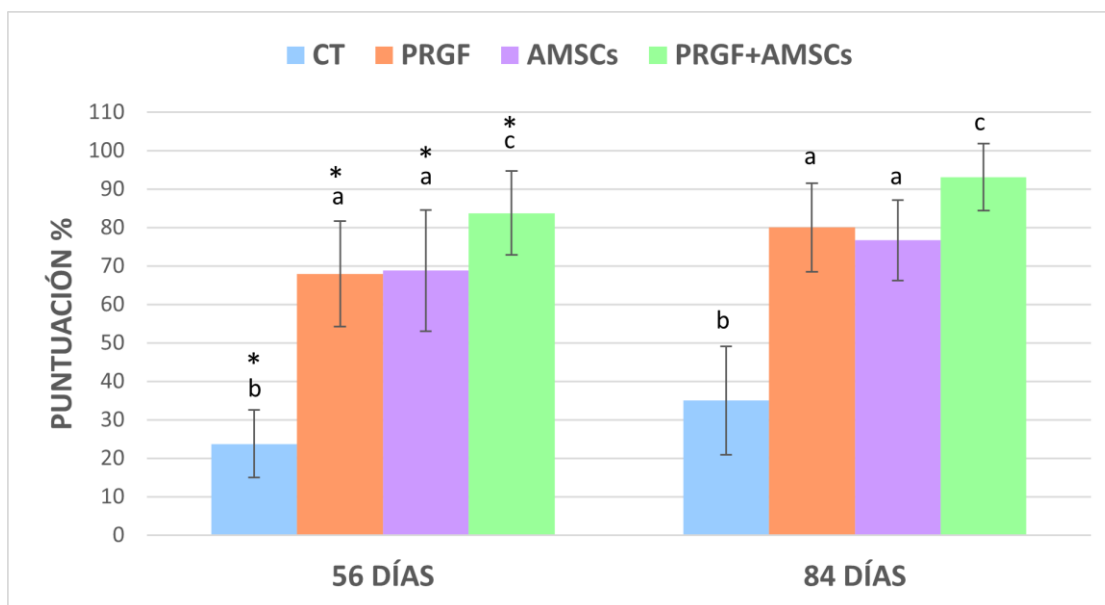
Tabla 63. Estudio comparativo entre tiempos de la variable formación de tidemark en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	23,75	8,85	2,21	19,03	28,47	10	40	,005
	84	35,00	14,14	3,78	26,83	43,17	15	60	
PRGF	56	68,00	13,73	3,54	60,40	75,60	50	90	,04
	84	80,00	11,54	2,88	73,85	86,15	60	100	
AMSCs	56	68,82	15,76	3,82	60,72	76,93	50	100	,04
	84	76,67	10,46	2,70	70,87	82,46	60	100	
PRGF + AMSCs	56	83,75	10,87	2,72	77,95	89,55	60	100	,01
	84	93,13	8,73	2,18	88,47	97,78	80	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 34 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 34. Evaluación de la formación de la línea de marea en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Anomalías en el hueso subcondral

A continuación, en la tabla 64, se describen los datos obtenidos para la variable anomalías del SB en los distintos grupos de tratamiento, tanto 56 como 84 días tras la cirugía.

Tabla 64. Evaluación de las anomalías en el hueso subcondral.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	43,75	9,57	2,39	38,65	48,85	30	60
	PRGF	83,33	11,12	2,87	77,17	89,50	60	100
	AMSCs	78,24	13,33	3,23	71,38	85,09	50	100
	PRGF+AMSCs	86,88	8,73	2,18	82,22	91,53	70	100
84 DÍAS	CT	60,00	10,37	2,77	54,01	65,99	50	80
	PRGF	81,88	9,81	2,45	76,65	87,10	70	100
	AMSCs	81,33	9,15	2,36	76,26	86,40	70	100
	PRGF+AMSCs	95,00	8,16	2,04	90,65	99,35	70	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Seguidamente, se realizó un estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 65.

Tabla 65. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable anomalías en el hueso subcondral

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	1,00	,001
AMSCs	CT	<,00	<,001
	PRGF	1,000	1,00
	PRGF+AMSCs	,15	,001
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	,001
	AMSCs	,15	,001

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tanto 56 como 84 días tras la cirugía, el grupo CT obtuvo una puntuación significativamente más baja que el resto de los grupos. Pasados 56 días desde la cirugía, no se observaron diferencias significativas entre los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs; por el contrario, transcurridos 84 días, el grupo PRGF+AMSCs mostró resultados significativamente mejores que el resto de los grupos.

Tomando en consideración el factor tiempo, el grupo CT y el grupo PRGF+AMSCs mostraron resultados significativamente más bajos 84 días tras la cirugía en comparación con los obtenidos 56 días después de la cirugía. Sin embargo, en el grupo PRGF y AMSCs no se observaron diferencias entre tiempos de estudio (Tabla 66).

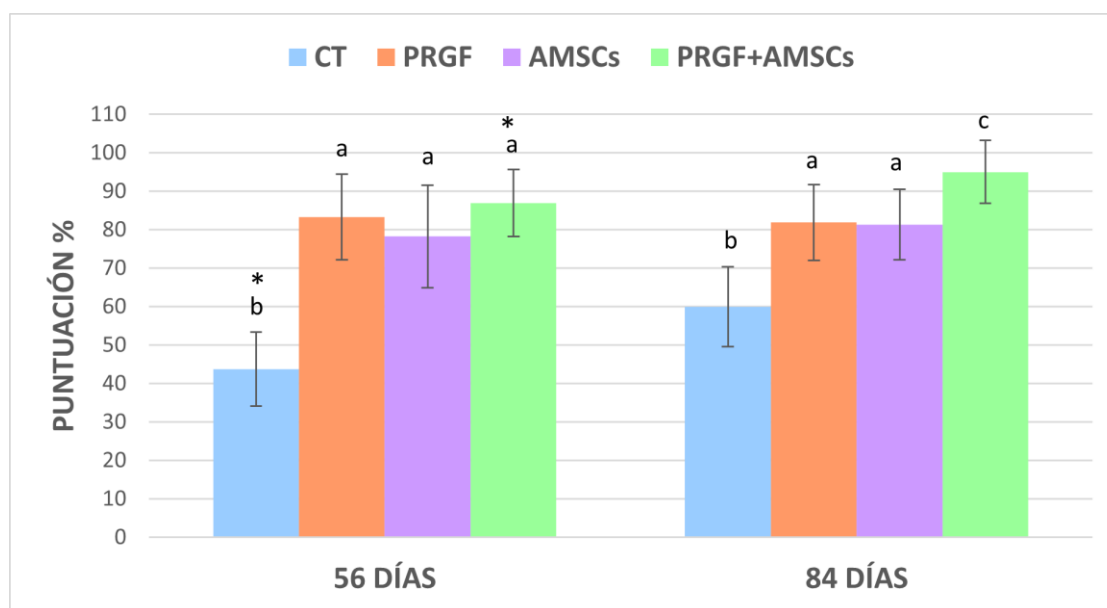
Tabla 66. Estudio comparativo entre tiempos de la variable anomalías en el hueso subcondral en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	43,75	9,57	2,39	38,65	48,85	30	60	<,001
	84	60,00	10,37	2,77	54,01	65,99	50	80	
PRGF	56	83,33	11,12	2,87	77,17	89,50	60	100	0,86
	84	81,88	9,81	2,45	76,65	87,10	70	100	
AMSCs	56	78,24	13,33	3,23	71,38	85,09	50	100	0,87
	84	81,33	9,15	2,36	76,26	86,40	70	100	
PRGF + AMSCs	56	86,88	8,73	2,18	82,22	91,53	70	100	0,01
	84	95,00	8,16	2,04	90,65	99,35	70	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 35 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 35. Evaluación de las anomalías del hueso subcondral en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Inflamación

Los datos obtenidos para la variable inflamación en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio se describen en la tabla 67.

Tabla 67. Evaluación de la inflamación en el tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	65,00	16,73	4,18	56,08	73,92	30	90
	PRGF	86,00	8,28	2,13	81,41	90,59	70	100
	AMSCs	84,41	7,47	1,81	75,57	83,26	70	90
	PRGF+AMSCs	91,88	6,55	1,63	88,38	95,37	80	100
84 DÍAS	CT	58,57	28,51	7,62	42,11	75,04	0	100
	PRGF	94,06	7,57	1,89	90,03	98,10	80	100
	AMSCs	90,31	7,98	2,06	86,24	95,09	80	100
	PRGF+AMSCs	98,75	3,41	,85	96,93	100,57	90	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras realizar el estudio descriptivo se realizó un estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento (Tabla 68).

Tabla 68. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable inflamación en el tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	,50	1,00
	PRGF+AMSCs	,76	1,00
AMSCs	CT	,001	<,001
	PRGF	,50	1,00
	PRGF+AMSCs	,06	,80
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,76	1,00
	AMSCs	,06	,80

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Como se puede apreciar, el grupo CT obtuvo una puntuación significativamente más baja que los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs tanto 56 como 84 días tras la cirugía. En cuanto al resto de grupos, no existen diferencias significativas entre ellos para ningún tiempo.

En el grupo CT se observó un contenido celular inflamatorio tanto 56 como 84 días tras la cirugía, que no mejoró a medida que avanzó el proceso de cicatrización. En este grupo no se observaron diferencias significativas en el infiltrado inflamatorio entre los tiempos de estudio. Sin embargo, en los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs a los 56 días se observó una ligera infiltración de células inflamatorias en el tejido de

reparación que prácticamente desapareció por completo a los 84 días, observándose diferencias significativas entre los dos tiempos de estudio (Tabla 69).

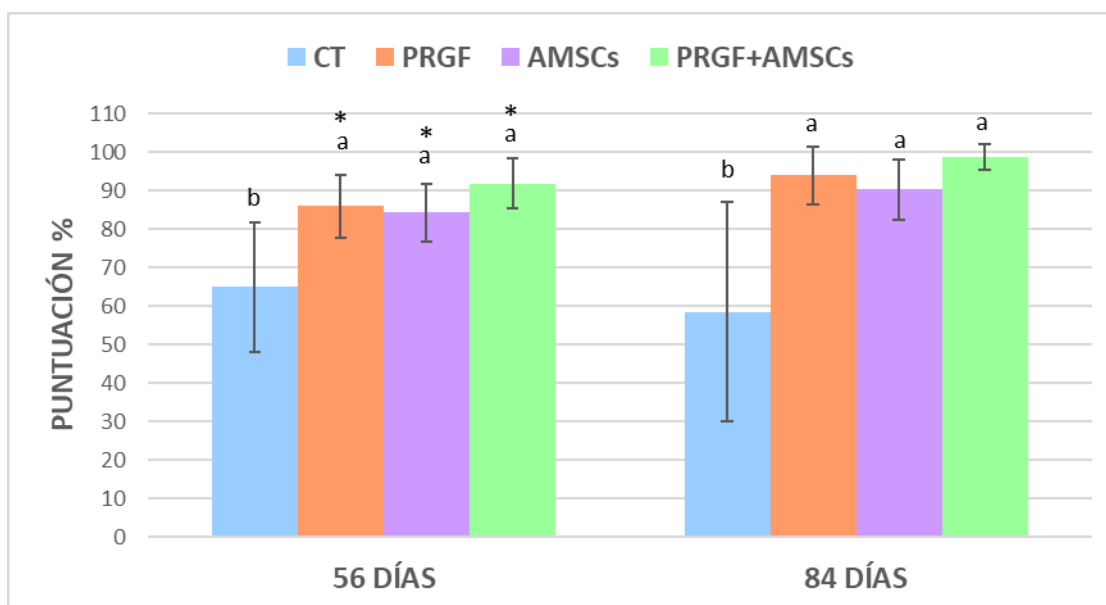
Tabla 69. Estudio comparativo entre tiempos de la variable inflamación en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	65,00	16,73	4,18	56,08	73,92	30	90	,45
	84	58,57	28,51	7,62	42,11	75,04	30	100	
PRGF	56	86,00	8,28	2,13	81,41	90,59	70	100	,008
	84	94,06	7,57	1,89	90,03	98,10	80	100	
AMSCs	56	84,41	7,47	1,81	75,57	83,26	70	90	<,001
	84	90,31	7,98	2,06	86,24	95,09	80	100	
PRGF+AMSCs	56	91,88	6,55	1,63	88,38	95,37	80	100	<,001
	84	98,75	3,41	,85	96,93	100,57	90	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 36 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 36. Evaluación de la inflamación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Calcificación anómala

A continuación, en la tabla 70, se detallan los datos obtenidos para la variable calcificación anómala en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 70. Evaluación de la calcificación en el tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	67,50	16,93	4,23	58,48	76,52	30	90
	PRGF	87,50	10,14	2,61	82,38	93,62	70	100
	AMSCs	85,88	8,70	2,11	81,41	90,36	70	100
	PRGF+AMSCs	89,38	5,73	1,43	86,32	92,43	80	100
84 DÍAS	CT	71,43	19,15	5,10	60,37	82,49	30	100
	PRGF	98,75	3,41	,85	96,93	100,57	90	100
	AMSCs	95,18	6,39	1,65	91,79	98,88	80	100
	PRGF+AMSCs	98,13	4,03	1,00	95,98	100,27	90	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras realizar el estudio descriptivo, se realizó un estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento como se puede observar en la tabla 71.

Tabla 71. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable calcificación en el tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	1,00	1,00
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	1,00	1,00
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	AMSCs	1,00	1,00

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

El grupo CT obtuvo una puntuación significativamente más baja que el resto de los grupos tanto 56 como 84 días tras la cirugía. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs en ninguno de los tiempos de estudio.

En el grupo CT no se producen cambios significativos en la puntuación obtenida a los 84 días en comparación con la obtenida a los 56 días tras la cirugía. Sin embargo, en el resto de los grupos se observa una puntuación significativamente más alta transcurridos 84 días tras la cirugía.

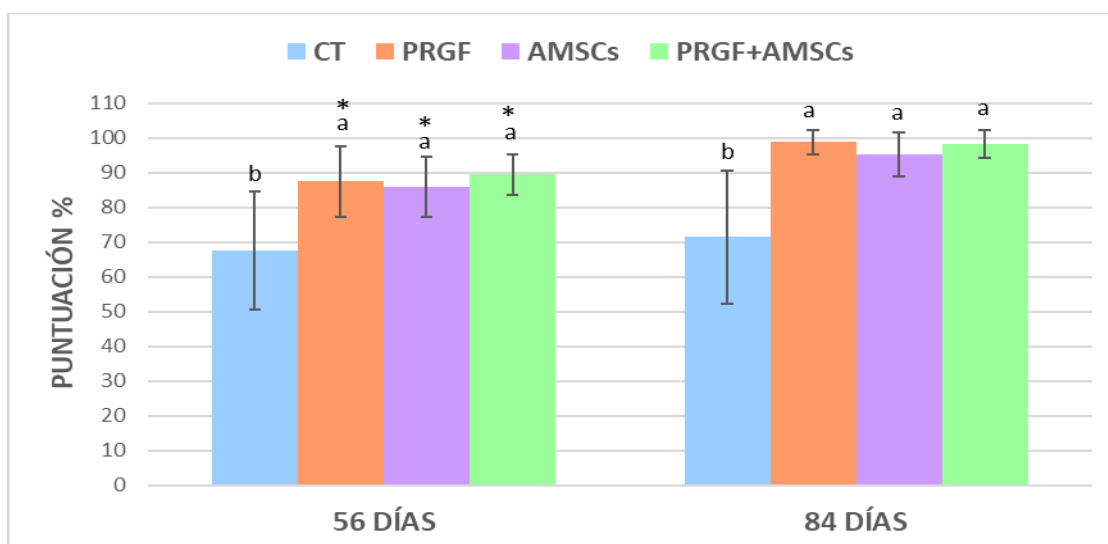
Tabla 72. Estudio comparativo entre tiempos de la variable calcificación en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	67,50	16,93	4,23	58,48	76,52	30	90	0,55
	84	71,43	19,15	5,12	60,37	82,49	30	100	
PRGF	56	87,50	10,14	2,61	82,38	93,62	70	100	<,001
	84	98,75	3,41	,85	96,93	100,57	90	100	
AMSCs	56	85,88	8,70	2,11	81,41	90,36	70	100	<,001
	84	95,18	6,39	1,65	91,79	98,88	80	100	
PRGF+AMSCs	56	89,38	5,73	1,43	86,32	92,43	80	100	<,001
	84	98,13	4,03	1,00	95,98	100,27	90	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 37 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 37. Evaluación de la calcificación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Vascularización

En la tabla 73 se describen los datos obtenidos para la variable vascularización en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 73. Evaluación de la presencia de vascularización en el tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Mín.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	60,63	16,91	4,23	51,61	69,64	20	70
	PRGF	50,33	6,67	1,72	46,64	54,03	40	60
	AMSCs	51,88	7,71	1,87	53,09	61,03	50	70
	PRGF+AMSCs	51,28	6,02	1,50	53,67	60,08	50	70
84 DÍAS	CT	67,14	13,82	3,69	59,16	75,13	50	100
	PRGF	78,44	8,10	2,02	74,12	82,76	70	95
	AMSCs	78,75	7,98	2,06	74,91	83,76	70	90
	PRGF+AMSCs	96,25	5,00	1,25	93,59	98,91	90	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Posteriormente, se realizó un estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento, como puede observarse en la tabla 74.

Tabla 74. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable vascularización en el tejido de reparación

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	,04	,008
	AMSCs	,03	,004
	PRGF+AMSCs	,03	<,001
PRGF	CT	,04	,008
	AMSCs	,42	1,00
	PRGF+AMSCs	,50	<,001
AMSCs	CT	,03	,004
	PRGF	,42	1,00
	PRGF+AMSCs	1,00	<,001
PRGF+ AMSCs	CT	,03	<,001
	PRGF	,50	<,001
	AMSCs	1,00	<,001

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

El grupo CT obtuvo una puntuación significativamente más alta que el resto de los grupos 56 días tras la cirugía, sin embargo, 84 días después de la cirugía, obtuvo una puntuación significativamente más baja que el resto de los grupos. 56 días tras la cirugía, no se observaron diferencias significativas en la presencia de vasos sanguíneos

entre los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs; sin embargo, 84 días tras la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo una puntuación significativamente más baja que el resto de los grupos, sin observarse diferencias significativas entre los grupos PRGF y AMSCs.

56 días tras la cirugía, en los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs se observó un incremento de vasos sanguíneos más evidente que en el grupo CT. Sin embargo, transcurridos 84 días desde la cirugía, en los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs se produjo un descenso en la vascularización del tejido de reparación de reparación, siendo mucho más evidente en el grupo PRGF+AMSCs, en el que apenas se vieron vasos sanguíneos. Por el contrario, en el grupo CT no se observó esta disminución en la cantidad de vasos sanguíneos a medida que avanzó el proceso de regeneración. En el grupo CT no existen diferencias significativas entre tiempos de estudio, mientras que los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs obtuvieron una puntuación significativamente más alta 84 días tras la cirugía en comparación con la obtenida 56 días tras la cirugía (Tabla 75).

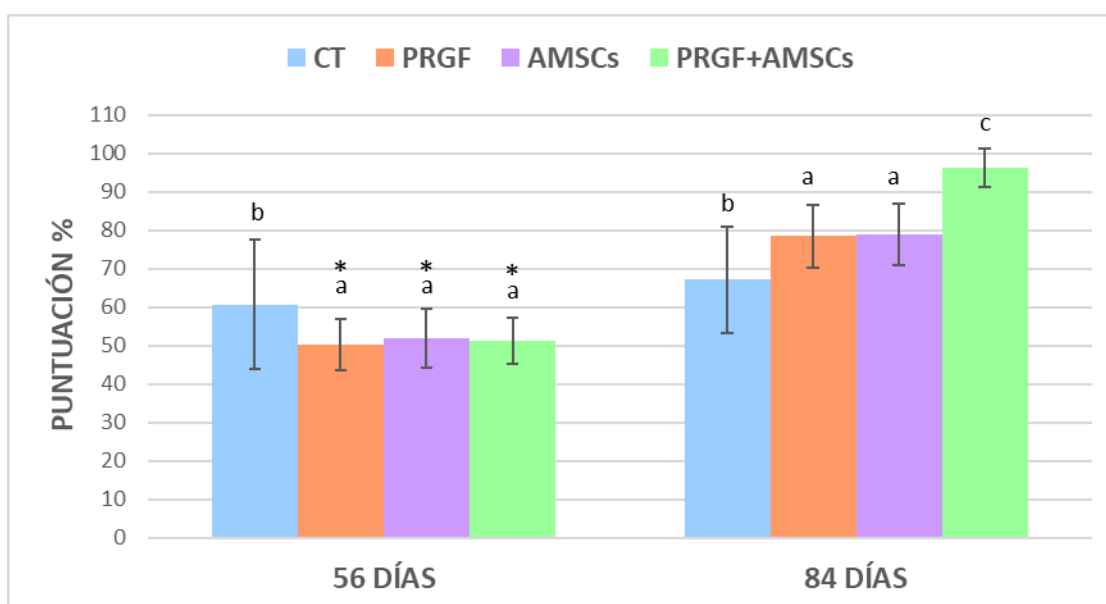
Tabla 75. Estudio comparativo entre tiempos de la variable vascularización en el tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	60,63	16,91	4,23	51,61	69,64	20	70	,26
	84	67,14	13,82	3,69	59,16	75,13	50	100	
PRGF	56	50,33	6,67	1,72	46,64	54,03	40	60	<,001
	84	78,44	8,10	2,02	74,12	82,76	70	95	
AMSCs	56	51,88	7,71	1,87	53,09	61,03	50	70	<,001
	84	78,75	7,98	2,06	74,91	83,76	70	90	
PRGF+AMSCs	56	51,28	6,02	1,50	53,67	60,08	50	70	<,001
	84	96,25	5,00	1,25	93,59	98,91	90	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 38 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 38. Evaluación de la vascularización en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Valoración de la zona superficial

En la tabla 76 se describen los datos obtenidos para la variable valoración de la superficie en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 76. Evaluación de la superficie del tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	42,81	14,60	3,65	35,03	50,59	10	60
	PRGF	69,00	6,03	1,55	65,66	72,34	60	80
	AMSCs	67,65	6,40	1,55	64,36	70,94	60	80
	PRGF+AMSCs	82,50	9,30	2,32	77,54	87,46	70	100
84 DÍAS	CT	53,57	12,77	3,41	46,20	60,95	30	70
	PRGF	80,00	7,30	1,82	76,11	83,89	70	90
	AMSCs	78,00	6,76	1,74	74,26	81,74	70	90
	PRGF+AMSCs	92,50	7,74	1,93	88,37	96,63	80	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

A continuación, se realizó el estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento como se puede observar en la tabla 77.

Tabla 77. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable valoración de la superficie del tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	,002	,001
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	,002	,001
	AMSCs	<,001	<,001

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En cuanto a la valoración general de la zona superficial del tejido de reparación, el grupo CT mostró una puntuación significativamente más baja que el resto de los grupos tanto 56 como 84 días tras la cirugía. Por el contrario, el grupo PRGF+AMSCs mostró resultados significativamente mejores que los grupos CT, PRGF y AMSCs en ambos tiempos de estudio, mientras que no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos PRGF y AMSCs.

En términos generales, en el grupo CT se apreciaron grietas y fisuras en el tejido de reparación que profundizaban hasta el SB. Además, se apreció una falta de integración con el AC circundante, así como erosiones en la zona de cartílago sano adyacente a la lesión. En los casos más extremos, se observó una falta completa del relleno del defecto, quedando expuesto el SB. En los grupos PRGF y AMSCs se apreció una buena superficie de reparación, con pequeñas grietas y cierta laminación del tejido de reparación. La integración del tejido del defecto con la zona de cartílago adyacente fue buena, aunque continuaba siendo visible en bastantes casos. En el grupo PRGF+AMSCs se apreció una superficie de reparación prácticamente lisa y homogénea, en línea con el tejido circundante sano. En cuanto al estudio del factor tiempo, existen diferencias significativas entre los tiempos de estudio en todos los grupos de tratamiento, observándose una puntuación mejor a medida que avanza el proceso de cicatrización (Tabla 78).

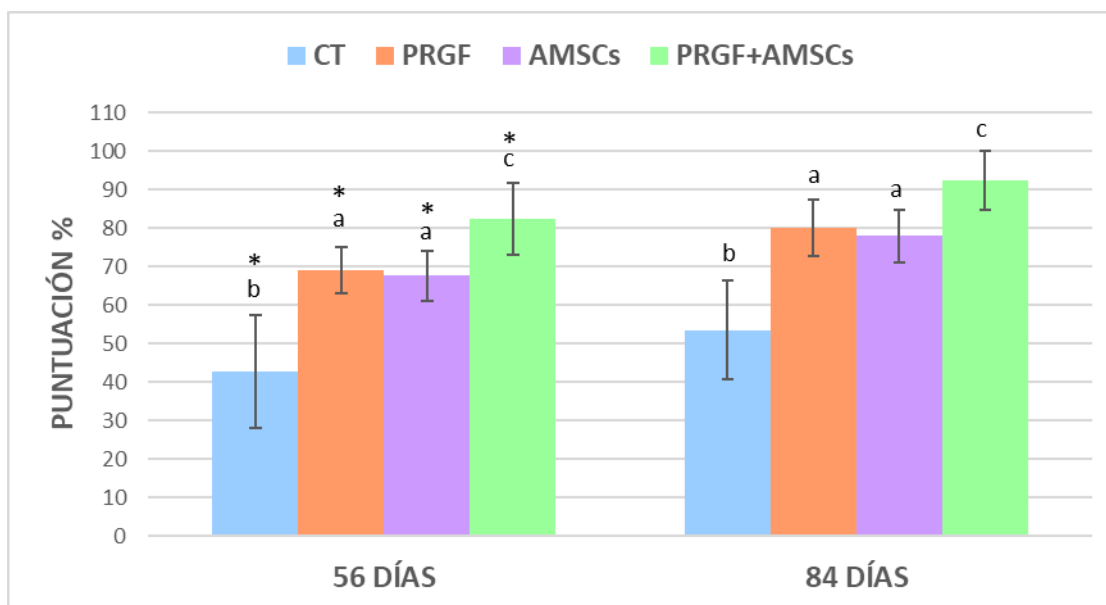
Tabla 78. Estudio comparativo entre tiempos de la variable valoración de la superficie del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	42,81	14,60	3,65	35,03	50,59	10	60	,036
	84	53,57	12,77	3,41	46,20	60,95	30	70	
PRGF	56	69,00	6,03	1,55	65,66	72,34	60	80	<,001
	84	80,00	7,30	1,82	76,11	83,89	70	90	
AMSCs	56	67,65	6,40	1,55	64,36	70,94	60	80	<,001
	84	78,00	6,76	1,74	74,26	81,74	70	90	
PRGF+AMSCs	56	82,50	9,30	2,32	77,54	87,46	70	100	,002
	84	92,50	7,74	1,93	88,37	96,63	80	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 39 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 39. Valoración de la zona superficial en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Valoración de la zona media y profunda

A continuación, en la tabla 79 se detallan los datos obtenidos para la variable morfología celular en los distintos grupos de tratamiento y en ambos tiempos de estudio.

Tabla 79. Valoración de la zona media y profunda del tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	34,06	4,90	1,22	31,45	36,68	30	40
	PRGF	65,67	10,83	2,79	59,67	71,67	50	80
	AMSCs	63,53	11,14	2,70	57,80	69,26	50	80
	PRGF+AMSCs	82,50	7,74	1,93	78,37	86,63	70	100
84 DÍAS	CT	52,86	11,38	3,04	46,28	59,43	40	70
	PRGF	79,38	6,80	1,70	75,75	83,00	70	90
	AMSCs	77,33	7,98	2,06	72,91	81,76	60	90
	PRGF+AMSCs	94,38	6,29	1,57	91,02	97,73	80	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras realizar el estudio descriptivo, se realizó un estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento. Los resultados se exponen en la tabla 80.

Tabla 80. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable valoración de la zona media y profunda del tejido de reparación.

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En cuanto a la valoración de la zona media y profunda del tejido de reparación, el grupo CT mostró una puntuación significativamente más baja que el resto de los grupos en los dos tiempos de estudio. En contraposición, tanto 56 como 84 días tras la

cirugía, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo una puntuación significativamente más alta que los demás grupos, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los grupos AMSCs y PRGF.

En el grupo CT, en la zona media se observó pérdida de tinción tanto con la safranina O como con la hematoxilina y eosina. Por otro lado, se observó una gran cantidad de agrupaciones de condrocitos, junto con una disminución de densidad de estos. Además, se observaron anomalías en el SB compatibles con quistes óseos y una falta de formación de la línea de marea. En los casos más extremos, se observó una falta completa del tejido. En los grupos AMSCs y PRGF se observaron menos agrupaciones de condrocitos, y, aunque se apreció pérdida de densidad de los mismos, estaba limitada a pequeños focos. Los condrocitos estaban principalmente dispuestos en hilera y la morfología de estos era la adecuada. En el grupo PRGF+AMSCs no se observó pérdida de tinción a lo largo de la matriz. La densidad de condrocitos era la apropiada y estos presentaban una forma redondeada u ovalada. La línea de marea estaba presente en la mayoría de los casos y no se describieron alteraciones del SB.

En cuanto al estudio del factor tiempo, existen diferencias significativas entre los tiempos de estudio en todos los grupos de tratamiento, mostrando una puntuación más alta a medida que avanza el proceso de reparación del defecto (Tabla 81).

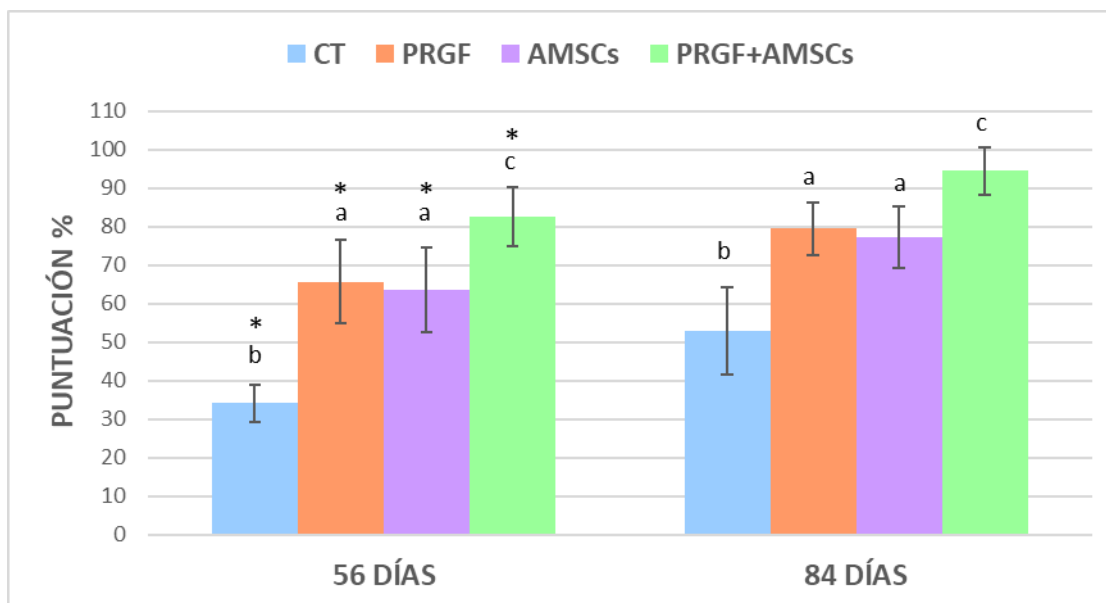
Tabla 81. Estudio comparativo entre tiempos de la variable valoración de la zona media y profunda del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	34,06	4,90	1,22	31,45	36,68	30	40	<,001
	84	52,86	11,38	3,04	46,28	59,43	40	70	
PRGF	56	65,67	10,83	2,79	59,67	71,67	50	80	<,001
	84	79,38	6,80	1,70	75,75	83,00	70	90	
AMSCs	56	63,53	11,14	2,70	57,80	69,26	50	80	<,001
	84	77,33	7,98	2,06	72,91	81,76	60	90	
PRGF + AMSCs	56	82,50	7,74	1,93	78,37	86,63	70	100	<,001
	84	94,38	6,29	1,57	91,02	97,73	80	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 40 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 40. Valoración de las zonas media y profunda del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Valoración general

A continuación, en la tabla 82, se exponen los datos obtenidos para la variable valoración general del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento y para los dos tiempos de estudio.

Tabla 82. Valoración global del tejido de reparación.

	GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Min.	Máx.
					Inf.	Sup.		
56 DÍAS	CT	38,44	5,07	1,26	35,73	41,14	30	50
	PRGF	71,00	11,37	2,93	64,70	77,30	50	90
	AMSCs	67,41	8,81	2,13	64,88	73,95	50	80
	PRGF+AMSCs	83,75	8,85	2,21	79,03	88,47	70	100
84 DÍAS	CT	53,57	10,08	2,69	47,75	59,39	40	70
	PRGF	81,88	8,34	2,08	77,43	86,32	70	90
	AMSCs	79,33	7,03	1,81	75,44	83,23	70	90
	PRGF+AMSCs	95,00	7,30	1,82	91,11	98,89	80	100

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

Tras realizar el estudio descriptivo, se procedió a realizar el estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento y los resultados se detallan en la tabla 83.

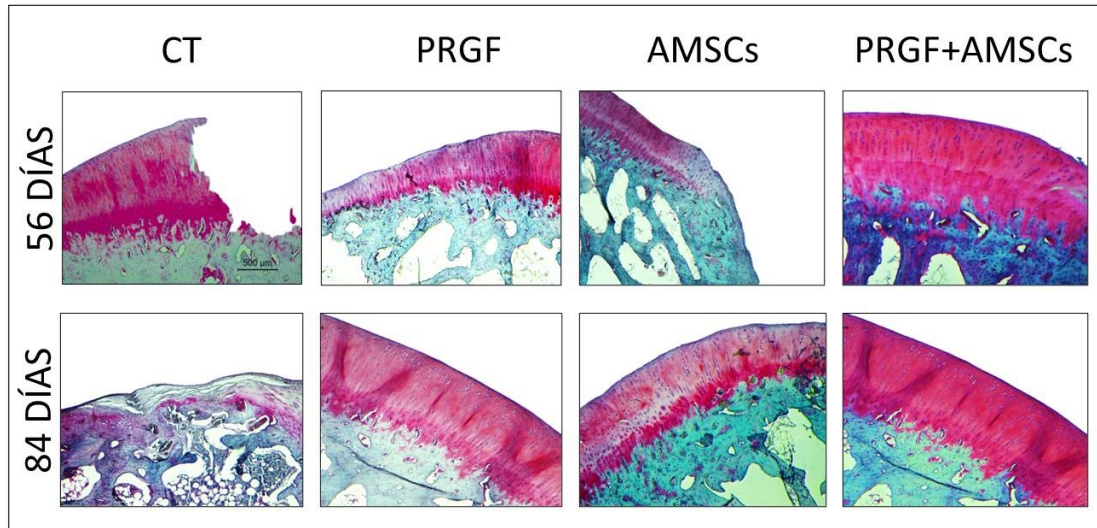
Tabla 83. Estudio comparativo entre grupos de tratamiento de la variable valoración global del tejido de reparación

TTO		Sig. 56 DÍAS	Sig. 84 DÍAS
CT	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF	CT	<,001	<,001
	AMSCs	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	1,00	1,00
	PRGF+AMSCs	<,001	<,001
PRGF+AMSCs	CT	<,001	<,001
	PRGF	<,001	<,001
	AMSCs	<,001	<,001

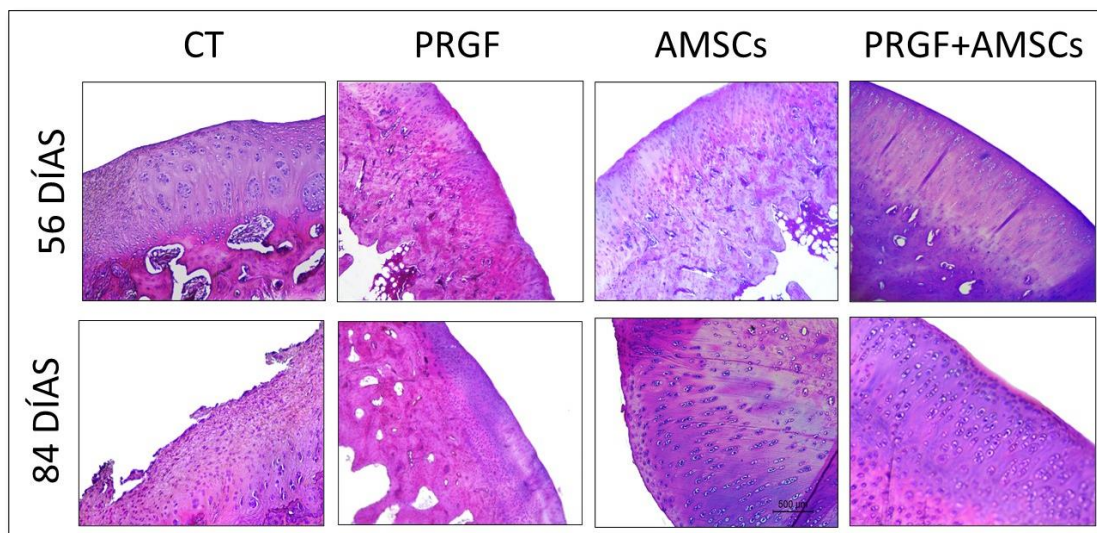
CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En cuanto a la valoración general del tejido de reparación, el grupo CT mostró una puntuación significativamente más baja que el resto de los grupos en los dos tiempos de estudio. Por el contrario, tanto 56 como 84 días tras la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo una puntuación significativamente más alta que los demás grupos, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los grupos AMSCs y PRGF en ninguno de los tiempos de estudio.

En líneas generales, el tejido de reparación en el grupo CT se describió como un tejido con características más propias del fibrocartílago que del cartílago hialino, aunque en algunos animales se observó un tejido de reparación de muy buena calidad. Así mismo, se observó una disminución del ancho del AC. Por el contrario, los animales en los grupos AMSCs, PRGF y PRGF+AMSCs presentaron un tejido que se asemejaba en gran medida al cartílago hialino sano, especialmente en los animales del grupo PRGF+AMSCs 84 días tras la cirugía, en los que el tejido del defecto reunía las mismas características que el AC adyacente sano (Imagen 41 y 42).

Imagen 41. Apariencia histológica del tejido de reparación teñido con Safranina O-Verde rápido.

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. En el grupo CT, a los 56 días se observa una pérdida completa del tejido de reparación, mientras que a los 84 días se aprecia un tejido de apariencia fibrosa rellenando la zona del defecto. En el grupo PRGF, a los 56 días se aprecia disminución del grosor del cartílago articular y falta de tinción con Safranina O, lo que indica una pérdida de proteoglicanos. A los 84 días se aprecia un tejido de reparación con el espesor apropiado y la superficie homogénea, sin embargo, se pueden apreciar algunas zonas de descenso celular. En el grupo AMSCs a los 56 días se aprecia una falta de relleno del defecto y pérdida de tinción con Safranina-O, mientras que a los 84 días se aprecia un relleno completo del defecto con mejor tinción de la matriz, aunque la metacromasia no es completa. En el grupo PRGF+AMSCs a los 56 días se observa una buena tinción de la matriz y la zona superficial se presenta lisa y homogénea, aunque se aprecian algunas zonas de descenso celular focal. A los 84 días la tinción de la matriz es completa, el grosor del cartílago articular el apropiado y la superficie regular, con una buena densidad de condrocitos.

Imagen 42. Apariencia histológica del tejido de reparación teñido con Hematoxilina-Eosina

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. En el grupo CT, a los 56 días se observan una superficie con erosiones, grandes agrupaciones de condrocitos y un tejido con una organización similar al fibrocartilago. A los 84 días se aprecia una falta de relleno del defecto, y el tejido neoformado presenta una conformación similar a la del fibrocartilago. En los grupos PRGF y AMSCs, a los 56 días se observa un relleno del defecto completo, con pequeñas irregularidades en la superficie y disminución en la densidad de los condrocitos. A los 84 días, se aprecia un tejido de reparación que rellena por completo el defecto, condrocitos dispuestos en hileras, aunque se observan algunos racimos de condrocitos y ligera pérdida de densidad de estos. En el grupo PRGF+AMSCs a los 56 días se observa una buena distribución de los condrocitos, que son redondeados y forman hileras, se aprecian áreas focales de descenso de condrocitos. La superficie es lisa y homogénea. A los 84 días, se observan condrocitos aplanados en la superficie y redondos formando hileras. La celularidad es la apropiada y el tejido tiene características de cartilago hialino sano.

En cuanto al estudio del factor tiempo, existen diferencias significativas entre los tiempos de estudio en todos los grupos de tratamiento, mostrando una puntuación más alta a medida que avanza el proceso de reparación del defecto (Tabla 84).

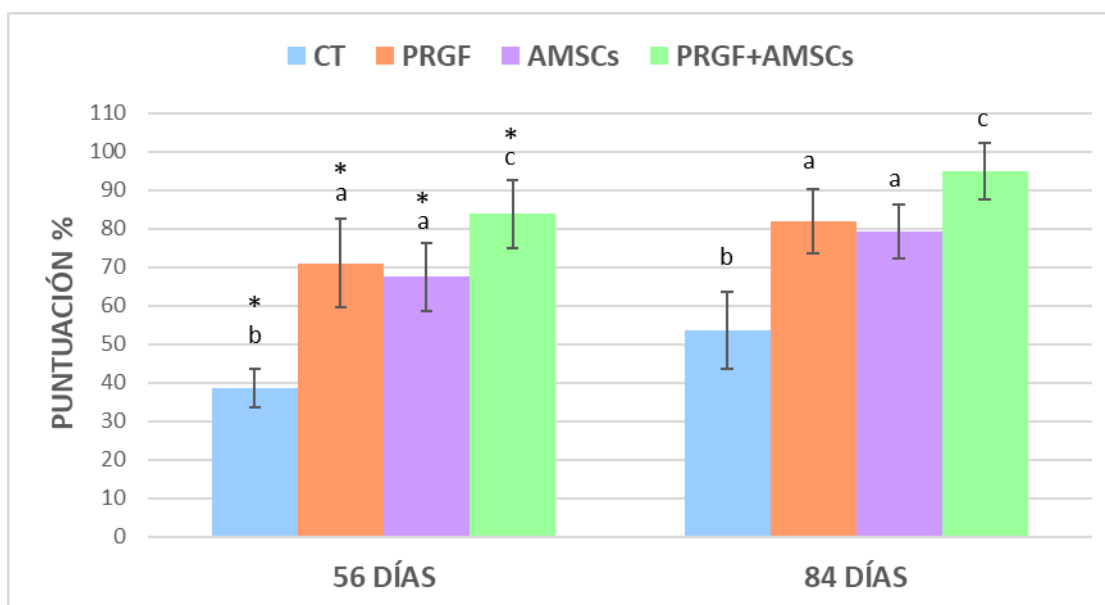
Tabla 84. Estudio comparativo entre tiempos de la variable valoración global del tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento.

	Días	Media	Desviación estándar	Error estándar	IC 95%		Min.	Máx.	p-valor
					Inf.	Sup.			
CT	56	38,44	5,07	1,26	35,73	41,14	30	50	<,001
	84	53,57	10,08	2,69	47,75	59,39	40	70	
PRGF	56	71,00	11,37	2,93	64,70	77,30	50	90	,006
	84	81,88	8,34	2,08	77,43	86,32	70	90	
AMSCs	56	67,41	8,81	2,13	64,88	73,95	50	80	,001
	84	79,33	7,03	1,81	75,44	83,23	70	90	
PRGF+AMSCs	56	83,75	8,85	2,21	79,03	88,47	70	100	<,001
	84	95,00	7,30	1,82	91,11	98,89	80	100	

CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: asociación de plasma rico en factores de crecimiento y células madre mesenquimales derivadas de la grasa.

En la imagen 43 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.

Imagen 43. Valoración general tejido de reparación en los distintos grupos de tratamiento en los diferentes tiempos de estudio.



CT: control, PRGF: plasma rico en factores de crecimiento, AMSCs: células madre mesenquimales derivadas de la grasa, PRGF+AMSCs: plasma rico en factores de crecimiento asociado a células madre mesenquimales derivadas de la grasa. Símbolos diferentes implican diferencias significativas entre los tiempos de estudio, letras diferentes implican diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

Discusión

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Discusión

A continuación, se expone la discusión de los diferentes apartados objeto de estudio en la tesis doctoral.

Defectos condrales y osteoartritis

En nuestro estudio, se ha evaluado la efectividad de la aplicación IO de PRGF, AMSCs y la combinación de ambas terapias en el tratamiento de defectos condrales. El AC es un tejido avascular y alinfático, además, los condrocitos poseen una actividad mitótica escasa, por lo que la capacidad intrínseca de regeneración es muy limitada [553]. Las lesiones cartilaginosas pequeñas pueden cicatrizar de forma espontánea, sin embargo,

los defectos más grandes, si no son tratados, pueden desencadenar la destrucción progresiva del AC y, finalmente, a la aparición de OA [554].

En la actualidad, la OA es la enfermedad musculoesquelética con mayor prevalencia y morbilidad debido al aumento de la esperanza de vida y a la tendencia creciente de la obesidad. Esta enfermedad afecta a millones de personas en todo el mundo. Actualmente, en Estados Unidos, el 25% de la población con más de 21 años o más de 50 millones de personas padecen OA, mientras que, en Europa, se estima que alrededor de 100 millones de personas sufren la enfermedad [555]. Aunque la OA afecta en mayor medida a personas mayores de 65 años, los traumatismos o las lesiones en el ámbito del deporte pueden desencadenar OA postraumática en aproximadamente el 20-50% de los pacientes, independientemente de la edad [556].

La OA supone también un grave problema en medicina veterinaria, principalmente en pequeños animales. Afecta alrededor del 20% de la población canina, mientras que, en gatos mayores de 12 años, la prevalencia alcanza el 90% [85,89,557].

La patología se caracteriza por los cambios estructurales progresivos en los tejidos articulares, especialmente el AC, el SB, la membrana sinovial y el SF, lo que da lugar a la formación de osteofitos, disminución del espacio articular y lesiones medulares en el SB. El metabolismo de condrocitos también se ve alterado, produciendo cambios en la composición de la ECM y favoreciendo la síntesis de marcadores proinflamatorios. Todo esto, desencadena la aparición de signos clínicos, entre los que se incluyen dolor articular crónico, pérdida de movilidad, inestabilidad y rigidez articular [558]. Se han descrito numerosos factores de riesgo asociados con la enfermedad, como la predisposición genética, la edad, la obesidad, el sexo y lesiones traumáticas previas, sin embargo, la patogénesis de la OA continúa sin estar del todo clara [559].

A pesar del elevado impacto socioeconómico de la OA, las opciones terapéuticas son mínimas. Los tratamientos disponibles persiguen aliviar el dolor, reducir la rigidez articular para mantener así la funcionalidad, y en general, mejorar la calidad de vida de los pacientes [98]. Actualmente, no existe ningún tratamiento convencional que permita regenerar los tejidos articulares, y el manejo de la OA, queda restringido al alivio sintomático hasta que, generalmente, se realiza una artroplastia de reemplazo. En

consecuencia, en los últimos años se ha realizado un enorme esfuerzo para introducir estrategias más efectivas en el tratamiento de la OA [560].

Evaluación del modelo experimental

La elevada prevalencia, junto con el impacto que ocasiona esta patología en la calidad de vida de los pacientes y la carga financiera asociada a gastos médicos y bajas laborales, ha ocasionado que la comunidad científica esté cada vez más interesada en aprender sobre la patogénesis de la OA, así como en encontrar nuevas estrategias terapéuticas que permitan regenerar los tejidos articulares y para ello, son imprescindibles los modelos animales [555].

El principal objetivo de los modelos animales es reproducir las patologías humanas, y dada la gran heterogeneidad de la OA en humanos, se deben emplear distintos modelos animales. Para elegir el mejor modelo, se debe considerar que el curso de la enfermedad ha de ser similar al que se produce en humanos, y reproducible en un plazo de tiempo limitado. Además, la patología debe ser progresiva, para que se pueda evaluar la patogénesis y los efectos de los distintos tratamientos tanto en fases tempranas, como intermedias o tardías de la enfermedad. Adicionalmente, la especie animal debe pertenecer a la clase mamíferos, e idealmente deben ser económicos, fáciles de mantener y manejar y lo suficientemente grandes como para poder llevar a cabo todos los análisis necesarios. Por último, se debe tener en cuenta que los animales empleados sean esqueléticamente maduros, ya que los animales en crecimiento tienen una mejor capacidad de regeneración tisular que los adultos [561,562].

Entre las especies que han sido empleadas como modelos de OA se incluyen ratones, ratas, hámsteres, conejos, cobayas, perros, ovejas, cerdos y caballos. La elección de la especie depende de varios factores, como el diseño y la duración del experimento, los costes asociados al mantenimiento, la facilidad de manejo y los análisis que se quieren realizar. Por todo ello, en líneas generales, los pequeños animales son los más empleados [563].

Tanto en animales como en personas, la OA puede ser primaria o secundaria. El modelo animal más típico para el estudio de la OA primaria es la cobaya albina Dunkin

Hartley, ya que desarrollan lesiones muy similares a las de los humanos de forma espontánea a partir de los tres meses de edad. Los hámsteres sirios también son comúnmente usados en el estudio de la OA primaria, ya que desarrollan la patología de forma espontánea debido a varios factores como la luxación de rótula, anomalías de varo y valgo y mutaciones en los genes asociados a la producción de colágeno tipo II. Se ha mostrado también que algunas líneas de ratones, como los STR/ort o los C57BL/6, presentan mayor predisposición genética a desarrollar OA primaria, incluso en animales muy jóvenes, y la enfermedad tiene una progresión muy similar a la que ocurre en humanos. Otros modelos animales, en los que se puede estudiar la OA primaria incluyen los perros, ovejas, caballos y pequeños primates, aunque están menos documentados que los anteriores y su uso presenta problemas éticos [564,565].

Por otro lado, en cuanto a la OA secundaria existen varios tipos de modelos animales en función del modo en el que se produzca la lesión: modelos de inducción química o modelos de inducción quirúrgica. Los modelos en los que la OA se induce químicamente se llevan a cabo mediante la inyección IA de un componente tóxico o inflamatorio como la papaína, monoiodo acetato de sodio, quinolonas o colagenasas. Aunque estos modelos son menos invasivos que los quirúrgicos, la patogénesis y el desarrollo de la enfermedad no se correlaciona con la de la OA postraumática, por lo que su uso queda limitado a la evaluación del efecto de un fármaco en el proceso de inflamación o en el dolor. Por el contrario, los modelos de inducción quirúrgica, además de ser útiles en la evaluación de la respuesta a un determinado tratamiento, permiten evaluar la patogénesis de la OA postraumática, especialmente los cambios producidos en el SB. Los modelos de OA inducida quirúrgicamente más estudiados incluyen las ratas, cobayas, conejos y perros [555,563].

En esta Tesis Doctoral se ha optado por animales de la especie cunícola, ya que se trata de un modelo ampliamente referenciado y útil para el tipo de estudio realizado. Además, el grupo investigador tiene amplia experiencia en su uso, son animales con un manejo relativamente sencillo y tienen un tamaño adecuado, tanto para poder realizar el procedimiento quirúrgico anteriormente expuesto, como para la obtención de las muestras (principalmente sangre para la preparación del PRGF). El conejo, especialmente el conejo de Nueva Zelanda, es un modelo estandarizado para la

evaluación de la OA y ha sido empleado para valorar el proceso de reparación condral y el tratamiento de los defectos osteocondrales por numerosos autores [561,566-569]. Está ampliamente documentado que, la realización de una lesión en el cóndilo femoral medial provoca cambios degenerativos similares a los observados en humanos con OA postraumática. Estas lesiones pueden realizarse con el uso de punch de biopsias, taladros o ganchos quirúrgicos. Existen otros modelos en los que, en lugar de realizar una lesión osteocondral, se provoca la degeneración del cartílago mediante la sección del ligamento cruzado anterior o por medio de una meniscectomía parcial. Algunos autores han estimado que los estudios deben tener una duración mínima de 6 semanas tras la cirugía para poder evaluar el efecto de la lesión en la pérdida de condrocitos y proteoglicanos, así como en la fibrilación de la superficie articular [554,564], mientras que, si el objetivo es evaluar el efecto de un tratamiento, se ha propuesto una duración mínima comprendida entre 6 y 12 semanas [570,571]. Por este motivo, en nuestro trabajo optamos por un periodo de supervivencia comprendido entre los 56 y los 84 días tras la cirugía, con el fin de poder evaluar el efecto de los distintos tratamientos a medio plazo. En cuanto a la creación del defecto osteocondral, optamos por realizarlo en el cóndilo femoral medial mediante el uso de un taladro quirúrgico ya que este modelo está validado por la guía F2451-05 de la Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales: “*Standard Guide for In Vivo Assessment of Implantable Devices Intended to Repair or Regenerate Articular Cartilage*” [572]. Por otro lado, en la literatura se ha reportado que idealmente los defectos osteocondrales deben tener de 2 a 5 mm de diámetro y entre 1 y 5 mm de profundidad [573]. En base a estos datos, en nuestro estudio decidimos realizar una lesión de 4 mm de diámetro y 5 mm de profundidad.

Biomarcadores húmedos de OA

Aunque durante muchos años la OA se ha descrito como una enfermedad meramente degenerativa del AC, actualmente se describe como una patología con un importante componente inflamatorio que afecta a todas las estructuras IA, como el AC, el SB, la membrana sinovial, el SF y los ligamentos periarticulares [574]. Durante el curso de la patología existe una sobreproducción de mediadores proinflamatorios que dan lugar a un balance a favor del metabolismo catabólico del AC. El estado inflamatorio en la

articulación lleva a la apoptosis de los condrocitos, de forma que se altera la composición de la MEC, que se caracteriza principalmente por la degradación del colágeno tipo II y la disminución en el contenido de proteoglicanos [575]. Durante este proceso, se liberan productos de la degradación del colágeno tipo II, así como diversos mediadores pro- y antiinflamatorios, de forma que su concentración puede aumentar o disminuir en fluidos biológicos como el suero, el SF o la orina [165].

Estas moléculas, denominadas biomarcadores húmedos, pueden medirse en los distintos fluidos de los pacientes con OA y resultan de gran utilidad en el diagnóstico temprano de la enfermedad, ya que su concentración sufre cambios en estadios iniciales de la patología, incluso antes de que el paciente presente dolor o de que se puedan apreciar cambios radiográficos o mediante RM [576,577]. Además de ser útiles en el diagnóstico temprano de la patología, tienen también un elevado factor pronóstico y permiten detectar pacientes con riesgo de padecer la enfermedad, así como predecir el curso y la progresión de esta [194,578-580]. Adicionalmente, son apropiados para monitorizar la respuesta del paciente a un determinado tratamiento, sobre todo en estudios en los que se desea evaluar la eficacia de terapias o fármacos modificadores de la OA [164].

Los biomarcadores solubles identificados hasta la fecha pueden ser moléculas relacionadas con el proceso de inflamación, como por ejemplo las IL, el TNF- α , las adipocinas y el HA, moléculas encargadas de la degradación de los componentes de la MEC, como las MMP, o productos derivados de la degradación del colágeno tipo II, como el C2C [581].

En nuestro estudio hemos optado por evaluar la concentración sérica de C2C, para valorar el efecto de las distintas terapias aplicadas de forma IO sobre el proceso de degeneración del colágeno; y el HA para valorar el grado de inflamación sinovial. La decisión para analizar estos biomarcadores se ha basó en que la "*Foundation for the National Institutes of Health*" (FNIH) publicó en el año 2017 un estudio en el que se incluyeron los biomarcadores bioquímicos válidos para diagnosticar la OA de forma temprana y evaluar la respuesta al tratamiento, y tanto el C2C como el HA estaban incluidos [582].

El colágeno tipo II es uno de los componentes más abundantes del cartílago articular y, durante la OA, las colagenasas se encargan de su desnaturalización, produciéndose una liberación y consiguiente aumento de sus productos de degradación en orina, suero o SF [176,185]. Entre estos productos de la degradación del colágeno se encuentra el C2C.

La utilidad de la evaluación de la concentración de C2C para monitorizar la progresión de la enfermedad, o la respuesta al tratamiento, ha sido reportada en varios modelos animales entre los que se incluyen perros [583-585], ovejas [586], caballos [587], ratones [176], cobayas [588] y conejos [589]. Al igual que en nuestro estudio, en todos ellos se observó un aumento de C2C relacionado con un empeoramiento de la patología a nivel clínico o histológico. Por el contrario, Hayashi et al., no encontraron un aumento significativo de la concentración de C2C en perros con OA de rodilla [590].

Por otro lado, a nivel clínico, Conrozier et al. mostraron que los niveles séricos de C2C están elevados en pacientes con OA de cadera, y, además, existe una correlación entre su concentración y el JSN [591]. Tamm et al. observaron que niveles elevados de C2C en orina se correlacionan con un peor estado clínico (más dolor y menor funcionalidad) de los pacientes, así como lesiones más graves del AC evaluadas mediante radiografía [183]. Más recientemente, un estudio clínico muy similar puso de manifiesto que el incremento de la concentración de C2C urinario en pacientes con OA de rodilla se correlaciona con el empeoramiento de las lesiones macroscópicas del cartílago evaluadas mediante artroscopia, y la presencia de osteofitos y el aumento de JSN evaluados mediante radiografía [186].

Otro biomarcador de OA ampliamente estudiado es el HA. Se trata de un glicosaminoglicano sintetizado por los condrocitos y los fibroblastos sinoviales, y constituye el principal componente del SF, cuya principal función es lubricar el AC y participar en la absorción y distribución de las fuerzas mecánicas [592]. Los niveles séricos y sinoviales de HA están correlacionados tanto con la progresión radiográfica como con la gravedad clínica de la OA. La concentración sérica de HA refleja la magnitud de la sinovitis, que acelera la progresión de la patología al inducir la producción de proteasas y citocinas proinflamatorias [209].

La utilidad del HA como un biomarcador bioquímico de la OA se ha estudiado tanto en modelos animales como en humanos. Nuestros resultados muestran que los niveles séricos de HA aumentan cuando se obtienen peores resultados macroscópicos e histológicos del AC, de modo que se correlacionan los niveles séricos de HA con la gravedad del daño articular. Estos resultados concuerdan con los observados en un estudio experimental llevado a cabo en conejos con OA secundaria a la rotura del ligamento cruzado anterior. El aumento de la concentración sérica de HA mostró estar correlacionado con la gravedad de los daños observados en el cartílago tanto macroscópica como histológicamente [593]. El HA también ha sido evaluado como un biomarcador de OA en perros con displasia de cadera, y la concentración sérica de este biomarcador se mostró aumentada con respecto a los animales con displasia de cadera, pero sin presencia de OA [594]. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por Vilar *et al.* se reportó un aumento en la concentración sérica de HA en perros con OA asociada a displasia de cadera [583].

En cuanto a los estudios clínicos realizados en humanos, Pavelka *et al.* llevaron a cabo un estudio con pacientes con OA de rodilla durante un periodo de 2 años. Al comienzo del estudio se realizó un análisis de la concentración sérica de HA junto con un estudio radiográfico en el que se midió el JSN. Al finalizar el estudio se observó que los pacientes con una concentración basal de HA más alta sufrieron una progresión de la OA más rápida y agresiva que aquellos que mostraron unos niveles iniciales más bajos [595]. Sasaki *et al.* pusieron de manifiesto que, la concentración sérica de HA aumenta en pacientes con OA, y este aumento es especialmente significativo en casos de OA de rodilla o dedos [206]. Por otro lado, en un estudio reciente llevado a cabo por Kotaska *et al.*, la concentración de HA en el SF se correlaciona positivamente con la presión osmótica, por lo que se consideró un indicador de la gravedad de la enfermedad. Así mismo, el estudio demostró que los niveles de HA se mantuvieron más altos en pacientes que habían sido sometidos a un tratamiento artroscópico que en aquellos en los que se había llevado a cabo una artroplastia de reemplazo [596].

Uso del Plasma Rico en Factores de Crecimiento

El PRP es una preparación biológica y autóloga que concentra un número de plaquetas de 2 a 4 veces mayor que la de la sangre periférica. Se prepara mediante la extracción de sangre venosa periférica del mismo individuo y la posterior centrifugación, en uno o dos pasos. Por último, las plaquetas presentes en el PRP deben activarse por medio de métodos físicos o químicos para que se produzca su degranulación y liberen así los GF contenidos en los gránulos- α . El PRP contiene también proteínas que desempeñan una función importante durante el proceso de regeneración condral, como la fibronectina, vitronectina y fibrinógeno [510,597].

El término PRP engloba un gran número de preparados sanguíneos autólogos obtenidos a partir de distintos protocolos de extracción, centrifugación, pipeteado y activación de las plaquetas. Esto hace que las preparaciones difieran en la concentración plaquetaria, y la presencia de leucocitos y eritrocitos [512]. Estas distinciones, tanto cualitativas como cuantitativas en la composición de los distintos preparados de PRP, pueden estar asociadas a respuestas biológicas diferentes y, por tanto, influenciar de manera muy diversa el proceso de reparación tisular [598]. En esta tesis doctoral hemos optado por emplear PRGF, un tipo de PRP que fue descrito por Anitua *et al.* y que hace referencia a un producto autólogo, elaborado a partir de la sangre del propio paciente tras una única centrifugación y en el que se emplea citrato sódico como anticoagulante y cloruro cálcico como activador de las plaquetas [548].

Una de las principales ventajas que nos ofrece el PRGF frente a otras preparaciones de PRP es que se define como un producto libre de leucocitos. Este hecho es de vital importancia para el proceso de regeneración condral, ya que la serie blanca podría provocar una mayor respuesta inflamatoria en el tejido a tratar [543]. Además, los neutrófilos polimorfonucleares presentes en la fracción leucocitaria son importantes productores de MMP-8 y MMP-9, enzimas que participan en el proceso de degeneración del AC [599]. Sin embargo, algunos autores han reportado que la presencia de leucocitos en el PRP (L-PRP) no provoca inflamación local o dolor en pacientes con OA [544] y que el L-PRP es capaz de disminuir la expresión de genes relacionados con el proceso inflamatorio en la OA en igual medida que el P-PRP [524].

Otra de las características del PRGF es que presenta una concentración moderada de plaquetas, de entre 2 y 3 veces la concentración de la sangre periférica. Esto ha sido relacionado con un óptimo efecto biológico, ya que, concentraciones de plaquetas más bajas están asociadas a efectos subóptimos, mientras que concentraciones más altas se asocian con un efecto inhibitorio [599]. En conejos, la concentración de plaquetas óptima que promueve la regeneración ósea y condral se encuentra entre 503.000 y 1.729.000 plaquetas/ μ l. Concentraciones de plaquetas más bajas, entre 164.000 y 373.000 plaquetas/ μ l, tienen efectos subóptimos; mientras que, concentraciones más altas, entre 1.845.000 y 3.200.000 plaquetas/ μ l, tienen efectos inhibitorios [600].

Los GF presentes en los gránulos- α de las plaquetas son macromoléculas solubles y difusibles que poseen acciones específicas sobre el crecimiento, diferenciación y fenotipo de numerosos tipos celulares, entre ellos los condrocitos y los osteocitos. Estas moléculas actúan sobre los receptores de la membrana celular generando una cascada de reacciones que termina en la regulación de la expresión génica [601]. Entre los GF presentes en el PRP y que han demostrado ser importantes en la reparación del cartílago se encuentran el TGF- β , que estimula la síntesis de ECM por parte de los condrocitos, favoreciendo la producción de proteoglicanos y colágeno tipo II; el IGF-1, que estimula la síntesis de colágeno tipo II y proteoglicanos y disminuye la presencia de colágeno tipo I; el FGF-2, que tiene un efecto mitogénico estimulando así la proliferación de los condrocitos; y el PDGF, que aumenta la proliferación celular y la síntesis de proteoglicanos [520,602-605].

En cuanto a la aplicación clínica del PRP en pacientes con OA, se ha observado que este produce una aceleración de los procesos fisiológicos de regeneración y reparación que suceden tras la lesión del cartílago. El PRP tiene potencial para cubrir los defectos condrales para mejorar así la reparación del cartílago, aminorando los síntomas de la patología y mejorando la función articular [606]. Este proceso se basa fundamentalmente en el efecto condroprotector y condrorregenerativo que ejercen los GF y otras citocinas anabólicas. Más concretamente, los GF estimulan las MSCs del entorno favoreciendo la diferenciación condrogénica. Además, previenen la apoptosis de los condrocitos, y los estimulan promoviendo la síntesis de proteoglicanos y colágeno

tipo II. Por último, disminuyen los efectos catabólicos de las citocinas inflamatorias como las MMPs y la IL-1 β [607].

En el tratamiento de pacientes con OA, el PRP se ha aplicado con inyecciones IA durante décadas ofreciendo muy buenos resultados clínicos [10,608]. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados reportados hasta la fecha, algunos autores consideran que la administración IA podría tener un efecto limitado en pacientes con OA grave en los que el SB está afectado. Con el fin de alcanzar todos los tejidos involucrados en la patología, Sánchez *et al.* propusieron la combinación de la infiltración IA de PRP con la infiltración IO [17]. Hasta donde sabemos no existen estudios experimentales que evalúen la eficacia de la infiltración IO de PRP de forma objetiva, por lo que en nuestro estudio hemos decidido emplear esta vía de administración para poder valorar su efecto en el proceso de regeneración osteocondral.

Uso de las Células Madre Mesenquimales Derivadas de la Grasa

La seguridad y la eficacia de las MSCs en el tratamiento de enfermedades asociadas a las articulaciones o lesiones en el cartílago han sido estudiadas de forma exhaustiva durante las últimas décadas. Simultáneamente, la prevalencia de las lesiones condrales ha aumentado también de forma significativa durante este periodo, habiéndose triplicado desde 1996 hasta 2011 [609,610]. A pesar de la elevada prevalencia, no existe ningún tratamiento que permita reparar de forma efectiva el cartílago dañado. Las características de las MSCs hacen pensar que las terapias basadas en MSCs podrían considerarse una estrategia efectiva menos invasiva que las opciones quirúrgicas actuales en el tratamiento de los defectos condrales [611].

Las Células Madre son células indiferenciadas con capacidad de autorrenovación, división de forma indefinida y producción de células especializadas [612], lo que las hace de especial interés para el tratamiento de las lesiones del AC. Según su origen, las células madre se pueden clasificar en embrionarias (ESCs), adultas (ASCs) y células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) [613,614]. Adicionalmente, considerando la fase del desarrollo y diferenciación, se pueden clasificar en totipotentes, pluripotentes o multipotentes [615].

En nuestro estudio optamos por el uso de ASCs, puesto que son más accesibles que las ESCs, ya que están disponibles en mayores cantidades y plantean menos problemas éticos, siendo idóneas para la aplicación en regeneración tisular [616]. Las ASCs se han identificado en numerosos tejidos y órganos adultos, y en el tratamiento de la OA se han empleado dichas células de distintos orígenes entre los que se incluyen la médula ósea [617,618], el hueso trabecular [619], el tejido adiposo [620], el SF [621], la membrana sinovial [622] y la sangre periférica [623]. Las MSCs de distintas fuentes tienen distintas capacidades de diferenciación y diferentes beneficios clínicos, por lo que es importante elegir la fuente apropiada para obtener los resultados terapéuticos deseados. Las BMSCs, seguidas de las AMSCs son las más estudiadas en procesos de reparación condral [624].

Las BMSCs fueron las primeras en ser aisladas y expandidas, y su seguridad y efectividad se ha confirmado en numerosos estudios clínicos. Se caracterizan por poseer un potencial de diferenciación muy marcado, especialmente en líneas osteogénicas, sin embargo, el proceso de obtención es complejo y se obtienen en bajas concentraciones celulares [431,432]. En cambio, las AMSCs pueden ser extraídas en grandes cantidades al estar muy concentradas en el tejido adiposo por medio de un procedimiento relativamente sencillo. Las AMSCs poseen el mismo potencial de diferenciación que las BMSCs siendo capaces de someterse a procesos de osteogénesis, condrogénesis y miogénesis [442], pero, además, algunas características como la capacidad para formar colonias y el mantenimiento de la capacidad proliferativa durante su cultivo, parece superior en comparación con las BMSCs [625].

En nuestro estudio hemos escogido las AMSCs por la abundancia de tejido adiposo que existe de forma fisiológica en el organismo del animal adulto y que, por tanto, permite una recolección sencilla de las mismas haciéndolas más asequibles. Además, al tratarse de células que provienen de la misma especie, los pacientes no deben tratarse previamente con terapias inmunosupresoras al no existir problemas de rechazo, a diferencia de lo que sucede con las ESCs, que requieren la inmunosupresión del paciente previo a la terapia con las ESCs [626]. Adicionalmente, las AMSCs son células procedentes de un organismo adulto, por lo que plantean menos problemas éticos que las ESCs [627].

En medicina humana, el tejido adiposo para el cultivo celular se recolecta por medio de procedimientos de liposucción, sobre todo de grasa de la zona abdominal y glútea. Es una técnica sencilla y que produce pocas molestias en los pacientes [628]. En cambio, en medicina veterinaria el tejido adiposo se obtiene a partir de procedimientos quirúrgicos abiertos o laparoscópicos. Más concretamente, en el caso de los conejos, el tejido adiposo se suele obtener de la zona inguinal mediante técnicas quirúrgicas abiertas, ya que se ha observado que la grasa de esta región posee un elevado rendimiento celular, con un mayor número de células viables por gramo [629].

Junto con la capacidad de diferenciación y autorrenovación de las AMSCs, estas poseen propiedades paracrinas que las hacen especialmente indicadas para el tratamiento de la OA. Las AMSCs secretan IL-10, HGF, VEGF, IGF-1 y TGF- β que inhiben la proliferación y la secreción de citocinas proinflamatorias en la articulación [630,631]; además, inducen la transición en los macrófagos desde el fenotipo proinflamatorio hacia el fenotipo antiinflamatorio [632]. De este modo, las AMSCs ralentizan la degradación del AC en pacientes con OA. Así mismo, se ha observado que las AMSCs son capaces también de promover la proliferación y el metabolismo anabólico de los condrocitos, favoreciendo el proceso de regeneración del tejido tras la lesión [459]. En definitiva, las AMSCs interactúan con los distintos tejidos articulares, regulando así, el metabolismo de la MEC promoviendo la angiogénesis, produciendo moléculas antiinflamatorias, exhibiendo efectos antiapoptóticos (que previenen la muerte de los condrocitos) y modulando el sistema inmune [633].

Existe discrepancia y falta de estandarización en cuanto a los métodos de administración de las AMSCs. En la literatura se ha descrito su administración tanto por medio de inyecciones IA como en forma de hidrogeles en los que las AMSCs se combinan con otros biomateriales. Algunos autores, postulan que la infiltración IA promueve la regeneración del cartílago mediante la diferenciación directa de las MSCs en condrocitos y la consiguiente producción de la MEC por parte de éstos [472]. Sin embargo, otros autores abogan por la necesidad de una estructura tridimensional que facilite la interacción de las AMSCs con la MEC y les permita adaptarse a su nuevo ambiente más fácilmente. Las estructuras tridimensionales más comúnmente empleadas son los hidrogeles, formados por distintos polímeros capaces de retener

grandes cantidades de agua imitando la naturaleza del AC promoviendo así la diferenciación condrogénica de las AMSCs [492,634,635]. Por otro lado, más recientemente, algunos autores han propuesto la inyección IO de BMSCs para tratar las lesiones de la médula ósea del SB asociadas a la OA, o la OA secundaria a la osteonecrosis de la rodilla y, han demostrado, que esta vía de administración es segura y proporciona mejores resultados que la IA en el control del dolor [15,16,509]. Sin embargo, en la literatura no existen datos sobre la administración IO de AMSCs. Dado que las propiedades de las AMSCs son muy similares a las de las BMSCs, y considerando que la aplicación IO de BMSCs es una técnica segura y efectiva en el manejo de la OA, en nuestro estudio optamos por la administración IO de AMSCs para evaluar el efecto de estas células sobre el proceso de regeneración osteocondral.

Asociación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento con Células Madre Mesenquimales Derivadas de la Grasa

Durante los últimos años, las terapias celulares han demostrado tener un buen potencial en el tratamiento de muchas enfermedades, incluida la OA. Las MSCs son capaces de diferenciarse en condrocitos y osteoblastos, por lo que desempeñan un papel muy importante en el tratamiento de la OA [636,637]. Por otro lado, el PRP contiene grandes cantidades de GF que intervienen en el proceso de reparación del AC [638,639]. En cuanto a la combinación de estas dos terapias, estudios *in vitro* han demostrado que el PRP puede promover la proliferación y diferenciación de las MSCs hacia líneas condrogénicas [640,641]. Hace unos años, Ramezanifard *et al.* llevaron a cabo un estudio en el que cultivaron las MSCs en dos tipos de medios, uno de ellos enriquecido con PRP y el otro el medio convencional empleado para promover la diferenciación condrogénica de estas células. Los autores confirmaron que el medio enriquecido con PRP mostró un potencial condrogénico mayor, además de ser capaz de suprimir la hipertrofia de las MSCs. Por otro lado, el PRP ayudó a disminuir la expresión de TNF- α e incrementar la expresión de VEGF por parte de las MSCs [641]. Otro estudio *in vitro* llevado a cabo por Zhu *et al.* demostró que el PRP estimula la migración, adhesión y proliferación de las MSCs, mejora su diferenciación condrogénica y estimula la síntesis de glicosoaminoglicanos por parte de los condrocitos [642].

Además, modelos animales *in vivo* han confirmado que la combinación de PRP y MSCs favorecen la cicatrización de defectos óseos y osteocondrales en conejos, en mayor medida que las MSCs o el PRP por sí solos, lo que implicaría que la asociación de estos induce la diferenciación condrogénica y osteogénica de las MSCs en gran medida [643,644]. Lee *et al.* llevaron a cabo un estudio *in vivo* en conejos a los que les realizaron un defecto osteocondral y los dividieron en tres grupos de tratamiento: control, PRP y PRP+MSCs. A las 4, 12 y 24 semanas tras la aplicación del tratamiento se realizó una evaluación macroscópica, histológica e inmunohistoquímica que puso de manifiesto que, la asociación de PRP+MSCs fue capaz de rellenar el defecto con cartílago hialino y restaurar la integridad del SB, mientras que en el grupo PRP se observó una regeneración incompleta del SB y una superficie articular irregular [644]. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio, en el que, el análisis macroscópico e histológico puso de manifiesto un tejido de reparación de mejor calidad cuando se asocia el PRGF con las AMSCs.

A pesar de que la existencia o no de un efecto sinérgico entre el PRP y MSCs ha llamado la atención de muchos investigadores durante los últimos años, la eficacia y seguridad de esta terapia en el tratamiento de pacientes con OA continúa estando sujeta a controversia, y se considera que existe una falta de evidencia clínica que apoyen los resultados obtenidos a nivel experimental [645].

En cuanto al uso de PRP asociado a MSCs para el tratamiento de la OA en medicina veterinaria, algunos autores han reportado mejores resultados cuando se combinan ambas terapias que cuando se infiltran individualmente. Vilar *et al.* llevaron a cabo un estudio en el que emplearon una combinación de PRGF+AMSCs para tratar perros con OA de cadera y demostraron un aumento significativo del PVF y del VI 180 días tras la infiltración, en comparación de los resultados obtenidos previo a la infiltración [646]. Estos resultados concuerdan con los publicados por Cuervo, quien reportó mejores resultados clínicos, biomecánicos y en el análisis de biomarcadores de OA en perros con OA de cadera tratados con una combinación de PRGF+AMSCs, que en aquellos que habían sido tratados con PRGF o AMSCs por sí solos [647]. Recientemente, Arican *et al.* han publicado los resultados de un estudio en el que han comparado el efecto del PRP, MSCs o la combinación de PRP+MSCs en los niveles de marcadores inflamatorios y varias

encimas colagenasas en el SF de perros con OA. Los resultados demuestran que, el PRP+AMSCs disminuyó los niveles de los biomarcadores estudiados en mayor medida. Además, el examen clínico y radiográfico llevado a cabo 15, 30, 60 y 90 días tras la infiltración, mostró mejores resultados en este mismo grupo [648].

Los resultados observados en los estudios experimentales anteriormente mencionados, así como en los estudios clínicos realizados en medicina veterinaria apoyan nuestros resultados. Hemos observado que la asociación de PRGF y AMSCs tiene un efecto sinérgico, por lo que producen una cicatrización de las lesiones del AC más rápida y eficiente que cuando se emplean por separado, y esto se ve reflejado en el grado de sinovitis y degradación del colágeno tipo II; en la apariencia macroscópica del defecto, que aparece completamente relleno y en línea con el AC sano circundante y con un color similar al del cartílago hialino sano; y en la estructura y morfología histológica, siendo muy similar a la del cartílago hialino. En nuestro estudio, tanto los resultados del análisis de C2C y HA séricos, como los resultados de las escalas macroscópica e histológicas son significativamente mejores en el grupo PRGF+AMSCs que en el resto de los grupos en todos los tiempos de estudio.

Sin embargo, los estudios clínicos realizados en humanos muestran resultados contradictorios. Koh *et al.* llevaron a cabo un estudio con pacientes que presentaban deformidad angular en las articulaciones de la rodilla. Estos pacientes fueron tratados mediante una osteotomía tibial, junto con la infiltración de PRP o de PRP+MSCs y se evaluó el dolor y la funcionalidad articular por medio de las escalas KOOS y VAS. El grupo de pacientes tratados con PRP+AMSCs obtuvo mejores resultados clínicos que los tratados únicamente con PRP, además, en el momento de la retirada de la placa, se observó que el 50% de los pacientes tratados con PRP+MSCs presentaba una cobertura total del defecto, frente al 10% de los pacientes tratados con PRP [649]. Sin embargo, en varios estudios llevados a cabo por Bastos *et al.* en pacientes con OA de rodilla, no se ha observado que el PRP asociado a las BMSCs proporcione mejores resultados en cuanto al control del dolor y mejora de la funcionalidad articular 12 meses tras la administración del tratamiento que la inyección de BMSCs por sí sola [650,651]. Por otro lado, Lamo-Espinosa *et al.* compararon la administración IA de PRGF con la administración IA de BMSCs+PRGF. Los pacientes fueron evaluados 12 meses después de la infiltración

mediante las escalas VAS y WOMAC, y además se realizó una radiografía y RM para valorar el daño articular. Ambos tratamientos mejoraron la sintomatología de los pacientes, y aunque no mostraron diferencias significativas entre ellos, solo los pacientes tratados con BMSCs+PRGF se consideran que respondieron al tratamiento según los criterios establecidos por la OARSI. No se observaron cambios radiográficos ni mediante RM en ninguno de los dos grupos [652].

Importancia del Hueso Subcondral en la Osteoartritis

El SB es la capa ósea que se encuentra bajo el cartílago hialino y anatómicamente puede dividirse en dos partes: la SBP y el STB. La SBP es una capa fina de hueso cortical que aporta resistencia mecánica, sirviendo de apoyo al AC gracias a su densa estructura. Por otro lado, presenta canales de entre 10 y 160 μm de diámetro que permiten el intercambio de nutrientes y moléculas entre el cartílago y el hueso [104]. Sin embargo, el STB es más poroso y metabólicamente activo, adicionalmente, es capaz de modificar su estructura en respuesta a fuerzas mecánicas locales [105].

Aunque hace años se pensaba que la capa de cartílago calcificado entre el AC y el SB no permitía el transporte de moléculas desde el SB hacia el AC, estudios relativamente recientes han descubierto que moléculas pequeñas pueden penetrar en el AC desde el SB. En condiciones fisiológicas, el intercambio molecular desde el SB hacia el AC a través de la línea de marea es crucial para el metabolismo del AC, que carece de vasos sanguíneos y linfáticos. Sin embargo, estas conexiones directas entre el SB y el AC podrían aumentar en pacientes con OA, lo que sugiere que el microambiente del SB está implicado en la degradación del AC [653].

El SB sufre cambios morfológicos muy notables durante el proceso de OA. En los estadios iniciales de la OA se produce una pérdida de masa ósea, seguida de un aumento en el grosor trabecular, y por último, en estadios muy avanzados, el colapso del hueso esponjoso [654,655]. En cuanto a la SBP, la porosidad y el grosor de esta aumenta en etapas iniciales de la enfermedad, mientras que cuando la OA avanza, la SBP pierde su grosor [656]. Al igual que ocurre con el cartílago, el SB responde a los cambios mecánicos y trata de equilibrar su estado fisiológico a través de la remodelación ósea

[107]. A pesar de que la remodelación ósea permite la adaptación del SB a las nuevas cargas mecánicas, supone también la base de la OA a nivel del SB [106,657]. En condiciones fisiológicas, la remodelación del SB mantiene un equilibrio dinámico mediado por la actividad osteogénica de los osteoblastos y la actividad de degradación de los osteoclastos, sin embargo, durante la OA, este equilibrio se altera, la actividad de los osteoblastos cambia y se producen cambios estructurales en el SB [95]. La remodelación del SB incluye un aumento del recambio óseo, la presencia de microfracturas y en última instancia, neovascularización y osteoesclerosis [109].

El proceso de remodelación ósea da lugar a la aparición de SBMLs. Estas lesiones afectan a un elevado número de pacientes con OA, y su presencia está correlacionada con la agresividad con la que progresa la OA [109,110]. Las SBMLs exhiben una gran actividad metabólica y causan inflamación. Además, promueven la angiogénesis, facilitando la migración de macrófagos y otras células inflamatorias, y el crecimiento de nervios que invaden el AC, por lo que, generalmente están asociadas con dolor en los pacientes [112].

Durante años, estas SBMLs se han tratado por medio de una técnica llamada subcondroplastia, que consiste en la inyección IO de fosfato cálcico que, al entrar en contacto con el SB se solidifica aportando al hueso una resistencia superior. Esta técnica ha mostrado buenos resultados en cuanto a la reducción del dolor y presenta pocos riesgos para el paciente, sin embargo, no consigue la regeneración del tejido dañado [658-661].

Teniendo en cuenta estas consideraciones, algunos autores han propuesto la aplicación IO de PRP o MSCs para favorecer la homeostasis tanto en el AC como en el SB y conseguir regenerar estos tejidos de manera satisfactoria [17,509], y al igual que en nuestro estudio, se han observado mejores resultados cuando estas terapias se aplican de forma IO. Los mejores resultados pueden deberse a que, el PRP y las MSCs infiltrados podrían ejercer su acción durante más tiempo al quedar “retenidos” en el SB durante periodos más largos. En contraposición, cuando se realiza la inyección IA, el PRGF o las MSCs quedan libres en el SF, que intercambia sus constituyentes de forma rápida con el plasma durante el movimiento [547].

Variables del estudio

Tal y como se ha detallado en el apartado de materiales y métodos, en nuestro estudio se ha realizado un análisis de biomarcadores séricos, y los defectos osteocondrales fueron evaluados macro y microscópicamente.

Los resultados del análisis de la concentración sérica de C2C muestran que la infiltración IA de PRGF, combinada con la infiltración IO de PRGF, AMSCs o la asociación de PRGF+AMSCs es capaz de frenar la degradación del colágeno tipo II de forma más efectiva que la infiltración IA de PRGF por sí sola. Los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs mostraron una concentración sérica de C2C significativamente más baja que el grupo CT 28, 56 y 84 días tras la creación del defecto condral. El grupo PRGF+AMSCs mostró niveles séricos de C2C significativamente más bajos que los grupos CT, PRGF y AMSCs. Sin embargo, aunque los grupos PRGF y AMSCs mostraron resultados significativamente mejores que el grupo CT, no se observaron diferencias significativas entre ellos en ninguno de los tiempos de estudio. Por otro lado, 84 días tras la cirugía, no se observaron diferencias significativas en la concentración sérica de C2C en el grupo PRGF+AMSCs en comparación con la concentración basal; mientras que, en el resto de los grupos, a los 84 días los niveles seguían elevados con respecto a los basales.

Por otro lado, el análisis de la concentración sérica de HA muestra que la infiltración IA de PRGF, combinada con la infiltración IO de PRGF, AMSCs o la asociación de PRGF+AMSCs es capaz de disminuir el grado de inflamación sinovial en mayor medida que la infiltración IA de PRGF por sí sola. Los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs mostraron resultados significativamente mejores que el grupo CT, tanto 56 como 84 días tras la cirugía, mientras que a los 28 días no se observaron diferencias entre grupos. El grupo PRGF+AMSCs mostró niveles séricos de HA significativamente más bajos que el grupo CT tanto a los 56 como a los 84 días tras la cirugía. Por otro lado, mientras que el grupo PRGF+AMSCs a los 56 días, no mostró diferencias significativas con los grupos PRGF y AMSCs, a los 84 días mostró una concentración sérica de HA significativamente más baja. Además, al comparar la concentración sérica de HA en el grupo PRGF+AMSCs, 84 días tras la cirugía, se comprobó que no existían diferencias significativas con la concentración obtenida a tiempo basal en este mismo grupo de tratamiento; mientras

que, en el resto de los grupos, los niveles seguían elevados con respecto a los basales, lo que nos hace pensar que la asociación de PRGF+AMSCs ejerce efectos condroprotectores y antiinflamatorios durante un periodo de tiempo más prolongado.

Nuestros resultados indican que el PRGF y las AMSCs infiltradas de forma IO ejercen un efecto importante en la disminución del estado inflamatorio de la articulación y la consiguiente reducción del daño de la MEC, que se ve reflejado en una concentración sérica menor de HA y C2C respectivamente que en el grupo CT, que solo recibió una inyección IA de PRGF. Además, los resultados apuntan a que la infiltración IO de PRGF+AMSCs ejerce un efecto sobre la sinovitis y el proceso de degeneración del colágeno tipo II durante, al menos, 84 días. Estos resultados son similares a los reportados por Sánchez et al. [662] y Muñoz-López et al. y serán discutidos posteriormente [546].

En cuanto a la escala macroscópica descrita por Goebel et al. [550], los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs mostraron una puntuación significativamente más baja que el grupo CT en la valoración global, tanto 56 como 84 días tras la cirugía. El grupo PRGF+AMSCs mostró resultados significativamente mejores que los grupos PRGF y AMSCs, mientras que no se observaron diferencias significativas entre estos dos. Sin embargo, cabe destacar que los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs obtuvieron una puntuación más alta, y por tanto, peor según esta escala, que el grupo CT para el parámetro “vasos sanguíneos en el tejido de reparación” 56 días tras la cirugía, siendo especialmente significativo en el grupo PRGF. Este aumento en la presencia de vasos sanguíneos se debe al efecto angiogénico del PRP, que viene regulado por el PDGF, junto con otros mediadores como el FGF-2 y el TGF- β , que estimulan las células endoteliales para que produzcan nuevos vasos sanguíneos [663]. Por otro lado, el efecto angiogénico de las AMSCs viene regulado por la síntesis de VEGF por parte de estas [631]. Se considera que este proceso de neovascularización es imprescindible para que el AC pueda soportar los elevados requerimientos metabólicos a los que se ve sometido durante el proceso de reparación [664]. En líneas generales, la apariencia macroscópica del tejido de reparación en los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs fue muy buena, tanto 56 como 84 días tras la cirugía, siendo mejores los resultados reportados a medida que avanzó el periodo de cicatrización y en el grupo PRGF+AMSCs.

Los resultados macroscópicos concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis histológico de las lesiones. En este caso, los resultados de ambas escalas (OARSI e ICRS II) [551,552] fueron significativamente mejores en los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs en comparación con en el grupo CT, tanto 56 como 84 días tras la cirugía. Tomando en conjunto todos los parámetros evaluados en estas escalas, se puede observar que el PRGF, las AMSCs y la combinación de PRGF+AMSCs administrados de forma IO ejercen un efecto condroprotector favoreciendo la síntesis de la MEC que rellena el defecto de forma uniforme y con características similares al cartílago hialino sano, sobre todo en el grupo PRGF+AMSCs. En este caso, cabe destacar que, al igual que ocurrió en la evaluación macroscópica, a nivel microscópico también se apreciaron más vasos sanguíneos en los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs que en el grupo CT 56 días tras la cirugía, siendo mucho más evidente la neovascularización en el grupo PRGF. Por otro lado, a nivel histológico, se observó que los animales incluidos en el grupo CT presentaron en el tejido de reparación un infiltrado celular inflamatorio más abundante que el observado en los animales de los grupos PRGF, AMSCs, y PRGF+AMSCs, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el análisis de biomarcadores. Esta disminución en el grado de inflamación en los animales tratados con PRGF o AMSCs de forma IO está mediada por la acción antiinflamatoria del PRP, que es capaz de disminuir los efectos catabólicos de las citocinas inflamatorias como las MMPs y la IL-1 β [607]; o por la acción de las MSCs, que secretan IL-10, HGF, VEGF, IGF-1 y TGF- β inhibiendo así la proliferación y la secreción de citocinas proinflamatorias en la articulación [630,631], e inducen la transición en los macrófagos desde el fenotipo proinflamatorio hacia el fenotipo antiinflamatorio [632].

Actualmente, en la literatura no existe ningún estudio experimental en el que se compare la infiltración IA de PRP por sí sola con la combinación de la infiltración IA de PRP y la infiltración IO de PRP, AMSCs o una asociación de PRGF+AMSCs tal y como se ha llevado a cabo en nuestro estudio. Sin embargo, existen algunos estudios clínicos en los que se analizan principalmente los resultados clínicos recogidos a partir de escalas subjetivas, por lo que resulta complicado discutir nuestros resultados comparándolos con los descritos por otros autores. Sin embargo, debemos señalar que, en nuestro estudio, al igual que se ha reportado en los estudios clínicos, los grupos en los que la

infiltración IA de PRGF se acompañó de una infiltración IO de PRGF, AMSCs o la asociación de PRGF+AMSCs obtuvieron mejores resultados tanto en el análisis de biomarcadores como en las evaluaciones macro y microscópicas que el grupo CT, en el que sólo se realizó la infiltración IA de PRGF.

En el año 2014, Sánchez et al. describieron una técnica novedosa en la que se combinaba la inyección IA con la inyección IO de PRP en pacientes con OA de rodilla grave, en los que el SB estaba gravemente afectado, ofreciendo a estos pacientes una alternativa a la artroplastia de reemplazo [17]. Tras la descripción de la técnica, este mismo grupo de investigación realizó un estudio con pacientes con OA grave de rodilla. La inyección IA combinada con la inyección IO de PRP disminuyó significativamente el grado de dolor y mejoró significativamente la funcionalidad de la articulación 24 semanas tras la infiltración [662]. Resultados similares obtuvieron Su *et al.* en su estudio en el que compararon el efecto de la inyección IA de HA o PRP, con la combinación de la inyección IA e IO de PRP en pacientes con OA de rodilla. El grupo en el que se combinó la infiltración IA e IO de PRP mostró resultados significativamente mejores en las escalas WOMAC y VAS que los otros grupos en todos los tiempos de estudio, comprendidos entre 1 y 18 meses tras la infiltración [665]. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los recientemente publicados por Barman *et al.* En su estudio se incluyeron 50 pacientes con OA de rodilla y la mitad de ellos fueron tratados con PRP IO+IA, mientras que los restantes fueron tratados solo con PRP IA. 6 meses después de la infiltración, ambos grupos mostraron una mejoría significativa en cuanto al alivio del dolor y la funcionalidad articular, sin observarse diferencias significativas entre los dos grupos [666].

La OA de cadera también puede ser tratada mediante infiltraciones IO de PRP. Fiz et al. describieron la técnica en la que se combina la inyección IA de PRP con dos inyecciones IO de PRP, una de ellas en el acetábulo y la otra en la cabeza femoral [18]. Posteriormente, este mismo grupo de trabajo publicó un estudio clínico en el que se incluyeron pacientes con OA de cadera que habían sido tratados previamente con una inyección IA de PRP y esta había fracasado. Los resultados clínicos se evaluaron 2, 6 y 12 meses después de las infiltraciones IO empleando la escala "Hip Osteoarthritis Outcome Score" (HOOS) y la escala WOMAC. La combinación de la administración IA junto con IO

de PRP produjo mejoras significativas, tanto en el dolor como en la funcionalidad articular, que perduraron hasta 12 meses tras la administración del tratamiento [667].

Por otro lado, Lychagin et al. investigaron la efectividad de la infiltración IO por sí sola, sin combinarla con PRP IA en pacientes con OA de rodilla. Los pacientes mostraron resultados significativamente mejores en las escalas WOMAC, VAS y KOOS que los obtenidos previo al tratamiento tanto 3 meses después de la inyección IO de PRP [668], como un año después [669].

La respuesta inflamatoria tras la infiltración IO de PRP fue también evaluada por Sánchez *et al.* mediante la cuantificación de las MSCs presentes en el SF antes y 1 semana tras la infiltración con PRP y los resultados mostraron una disminución significativa con respecto a la concentración basal de MSCs en el SF [662]. Siguiendo esta línea de trabajo, Muñoz-López et al. realizaron un estudio en el que compararon el efecto de la administración IA de PRP frente al de la combinación de la administración IA e IO en el contenido celular del SF de pacientes con OA. Para ello, se obtuvo una muestra de SF antes de la inyección del PRP y 1 semana después, y se determinó la cantidad de MSCs, monocitos y linfocitos. La infiltración IA combinada con la IO indujo la reducción de la población de MSCs, monocitos y linfocitos en el SF; mientras que en el grupo que sólo recibió la administración IA no se observaron diferencias entre los valores basales y los obtenidos 1 semana tras la inyección [546]. Estudios previos han asociado los niveles de SFSCs con la gravedad de la OA y el daño articular, y la reducción de MSCs en el SF sugiere mejoras clínicas [670,671]. Por lo tanto, estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio de biomarcadores, en el que el nivel sérico de HA y C2C disminuyó notablemente en los grupos tratados con PRGF, AMSCs o PRGF+AMSCs de forma IO en comparación con el grupo CT. Además, en nuestro estudio, a nivel histológico, se observó menos infiltración celular inflamatoria en los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs que en el grupo CT, siendo el grupo PRGF+AMSCs el que mejores resultados mostró. Este resultado podría deberse al papel inmunomodulador y a los efectos tróficos del PRP sobre la membrana sinovial, el AC, el SF y el SB, que dan lugar a una menor concentración de citocinas inflamatorias en todos los tejidos involucrados en la patología y a la consiguiente restauración de la homeostasis articular, originando un ambiente más favorable que permitiría la diferenciación condrogénica y

osteogénica de las MSCs. En contraposición a estos resultados, recientemente Barman et al., han reportado que tanto la inyección IA de PRP como la combinación IA e IO de PRP reducen los niveles de proteína C reactiva y de CTX-II en pacientes con OA de rodilla a las 12 semanas de la infiltración, sin observarse diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, cabe destacar que, en este mismo estudio, sólo los pacientes tratados con PRP IA+IO mostraron una reducción significativa de la efusión sinovial y de la bursitis infrarrotuliana, así como una reducción en los niveles de telopéptido-N terminal del colágeno tipo I [672].

Más recientemente, un estudio llevado a cabo por Ganguly et al. ha investigado los cambios que se producen en las BMSCs del SB después de la infiltración IO de PRP. Los resultados muestran que la infiltración IO de PRP favorece las propiedades proliferativas y de resistencia al estrés de las MSCs, especialmente en los pacientes más mayores [547]. Resultados similares se obtuvieron en un estudio llevado a cabo por Philippart et al., en el que se administró PRP en la cresta iliaca y 3 días después de la infiltración se observó un incremento de MSCs en el SB, con un potencial de diferenciación muy marcado hacia líneas osteogénicas [673]. Esto, podría explicar los resultados obtenidos en nuestro estudio a nivel histológico, en el que se aprecia mayor densidad de condrocitos, así como mejor estructura del SB en los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs que en el grupo CT.

En cuanto a la aplicación IO de MSCs, se trata de una técnica descrita más recientemente y poco estudiada. Fue descrita por primera vez por Hernigou *et al.* en un estudio en el que compararon la artroplastia de sustitución con la inyección IO de MSCs en pacientes con OA secundaria a osteonecrosis de rodilla. Se incluyeron un total de 60 pacientes con OA bilateral, y en una rodilla se realizó una artroplastia de sustitución mientras que en la contralateral se llevó a cabo la infiltración IO de BMSCs. Menos rodillas tratadas con las MSCs necesitaron ser reintervenidas en comparación con las que fueron tratadas con la artroplastia de reemplazo, además, 21 de los 30 pacientes reportaron sentir menos dolor y mejor movilidad en la rodilla tratada con la infiltración IO de BMSCs [509]. Años más tarde llevó a cabo un estudio similar en el que se incluyeron más pacientes y los resultados fueron similares a los anteriormente descritos, concluyendo que la inyección IO de BMSCs ejerce un efecto significativo en cuanto a la

disminución del dolor, de modo que se consigue postponer o incluso evitar la artroplastia de sustitución a largo plazo [15]. Siguiendo esta misma metodología, estos autores evaluaron también el dolor y la funcionalidad articular usando la escala KSS, y realizaron revisiones mediante RM a los dos años tras la infiltración IO de BMSCs. Las rodillas tratadas con la infiltración IO mostraron mejores resultados en la escala KOOS y en la evaluación mediante RM que las rodillas en las que se realizó la artroplastia de sustitución [16].

La principal limitación de la infiltración IO es que requiere la sedación y anestesia local del paciente, lo que hace que este procedimiento sea más largo y caro. Además, requiere el entrenamiento del traumatólogo, y debe realizarse siempre con la ayuda de un fluoroscopio o un ecógrafo. Por otro lado, el incremento de presión en el interior del hueso podría causar dolor en las 48 horas posteriores a la aplicación del tratamiento [674]. En nuestro estudio no pudimos comparar si la infiltración IO causa más dolor que la infiltración IA debido al aumento de la presión en el interior del hueso, ya que, todos los animales incluidos recibieron una infiltración IO de 0,5 ml de suero salino fisiológico, PRGF, AMSCs o PRGF+AMSCs dependiendo del grupo de tratamiento al que perteneciesen. Sin embargo, las escalas Grimace realizadas tras la cirugía muestran que muy pocos animales presentaron dolor postoperatorio intenso que requiriese analgesia de rescate.

Conclusiones

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y bajo las condiciones empleadas en nuestro estudio, podemos alcanzar las siguientes conclusiones

1. La infiltración IA de PRGF, combinada con la infiltración IO de PRGF, AMSCs o la asociación de PRGF+AMSCs es más efectiva en el manejo de lesiones osteocondrales que la infiltración IA por sí sola.
2. La infiltración IA de PRGF, combinada con la infiltración IO de PRGF, AMSCs o la asociación de PRGF+AMSCs reduce el estado inflamatorio en la cavidad articular.

3. La infiltración IA de PRGF, combinada con la infiltración IO de PRGF, AMSCs o la asociación de PRGF+AMSCs ralentiza el proceso de degeneración del cartílago articular, disminuyendo la degeneración de los componentes de la MEC, entre ellos el colágeno tipo II.
4. La infiltración IA de PRGF, combinada con la infiltración IO de PRGF, AMSCs o la asociación de PRGF+AMSCs proporciona un llenado completo del defecto osteocondral con tejido de reparación con una apariencia macroscópica muy similar al cartílago articular sano.
5. La infiltración IA de PRGF, combinada con la infiltración IO de PRGF, AMSCs o la asociación de PRGF+AMSCs da lugar a la formación de tejido de reparación con las características histológicas propias del cartílago hialino.
6. Debido al efecto sinérgico de la combinación de PRGF con AMSCs, la infiltración IO de PRGF+AMSCs proporciona mejores resultados que la infiltración IO de PRGF o AMSCs por sí solas, y, además, su efecto perdura más en el tiempo.
7. El PRGF y las AMSCs administradas de forma IO ejercen efectos muy similares sobre el proceso de reparación osteocondral.

Limitaciones

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Limitaciones del estudio

Desde un punto de vista crítico, es necesario revisar la metodología de trabajo empleada en el estudio para identificar las posibles limitaciones, que deben ser tomadas en consideración para plantear mejoras de cara a futuros trabajos de investigación en esta línea.

Una de las limitaciones del estudio es que se emplearon AMSCs alogénicas, procedentes de un único conejo donante, cuando en la clínica diaria suelen emplearse MSCs de origen autólogo. En cuanto al PRGF, en la especie cunícola no existen estudios que determinen la composición de la concentración de los diferentes GF que lo componen, por lo que futuros estudios deberían profundizar en esta cuestión. Por otro

lado, nuestro modelo analiza una lesión aguda del cartílago y SB. Clínicamente se correspondería con una lesión aguda precursora de procesos degenerativos posteriores. Este modelo no es completamente extrapolable a situaciones de OA, pero permite evaluar la respuesta y capacidad de reparación mediante el uso de terapias regenerativas por vía IO, aportando información sobre posibles aplicaciones en técnicas de *forage* o microfractura del hueso subcondral en el tratamiento de la OA.

Otra limitación es que solo se realizó el análisis de los biomarcadores bioquímicos en suero. Como se ha mencionado anteriormente, estos biomarcadores también pueden ser medidos en el SF, por lo que hubiese sido interesante analizarlos en nuestro estudio, para comprobar la correlación entre los niveles séricos y sinoviales. También hubiese sido interesante incluir en el estudio el análisis de otros biomarcadores, como IL y el TNF- α , para evaluar la extensión de la inflamación; diversas MMP, para evaluar la degradación de los diferentes componentes de la MEC; o los PIIANP y PIICP, que nos podrían indicar si la infiltración IO de estas terapias es capaz de inducir la síntesis de colágeno tipo II.

Por último, en este trabajo no se realizaron exámenes inmunohistoquímicos para comprobar el tipo de colágeno presente en el tejido de reparación. Este examen es importante para confirmar que el tejido de reparación es rico en fibras de colágeno tipo II, que es el predominante en el cartílago hialino sano y el encargado, en gran medida, de las propiedades biomecánicas del AC. Además, hubiese sido también interesante evaluar la composición de proteoglicanos de la MEC mediante el análisis inmunohistoquímico.

Resumen

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Resumen

Muchos estudios han puesto de manifiesto que la infiltración IA de PRGF y AMSCs ralentiza la progresión de la OA. Sin embargo, en pacientes gravemente afectados, en los que existen lesiones en las zonas más profundas del AC o incluso en el SB, el potencial terapéutico de esta vía de administración es limitado, ya que el tratamiento no consigue alcanzar dichas zonas. Para sobreponerse a esta limitación, algunos autores han propuesto las infiltraciones IO como una aproximación terapéutica segura y efectiva. Sin embargo, no existen estudios experimentales en este campo y, los resultados publicados hasta la fecha están principalmente basados en medidas subjetivas.

El objetivo de esta tesis doctoral es evaluar la eficacia de la infiltración IO de PRGF, AMSCs o la combinación de ambos en el tratamiento de lesiones condrales agudas de espesor completo en un modelo experimental en conejos.

Un total de 80 conejos fueron incluidos en el estudio y se les realizó un defecto condral quirúrgico de espesor completo en el cóndilo femoral medial de 4 mm de diámetro y 5 mm de profundidad en ambas extremidades posteriores. Los animales fueron divididos de forma aleatoria en cuatro grupos en base al tratamiento IO: solución salina estéril (grupo CT), PRGF, AMSCs o PRGF+AMSCs. Además, todos los grupos recibieron una infiltración IA de PRGF. Los niveles séricos de los biomarcadores HA y C2C fueron medidos previo a la cirugía (tiempo de estudio basal) y 28, 56 y 84 días tras la cirugía. Además, se realizó la evaluación macroscópica e histológica del tejido de reparación 56 y 84 días tras la realización de la cirugía.

En cuanto a los resultados obtenidos en el análisis de biomarcadores, todos los grupos mostraron una concentración sérica de HA y C2C significativamente más alta 28 días tras la cirugía en comparación con los niveles basales. Para el HA, no se aprecian diferencias significativas entre grupos a los 28 días tras la realización de la cirugía; sin embargo, en el tiempo de estudio 56 días, los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs mostraron niveles séricos de HA significativamente más bajos que el grupo CT. Por último, 84 días después de la cirugía, el grupo PRGF+AMSCs mostró niveles séricos de HA significativamente más bajos que el resto de los grupos. En este tiempo de estudio, el grupo CT obtuvo niveles séricos de HA significativamente más altos que el resto de los grupos, mientras que no se observaron diferencias significativas entre el grupo PRGF y el grupo AMSCs. Para el C2C, el grupo PRGF AMSCs mostró resultados significativamente mejores que el resto de los grupos 28, 56 y 84 días tras la cirugía, mientras que en el grupo CT se observaron niveles séricos de C2C significativamente superiores a los del resto de grupos. No se mostraron diferencias significativas entre el grupo PRGF y AMSCs en ninguno de los tiempos de estudio. Por último, tanto para el HA como para el C2C, en el grupo PRGF+AMSCs no se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles séricos 84 días tras la cirugía en comparación con los basales

En cuanto a la evaluación macroscópica, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo una puntuación más baja, lo que significa mejores resultados, que el resto de los grupos tanto 56 como 84 días tras la cirugía. Por el contrario, el grupo CT mostró resultados significativamente más altos que los grupos PRGF, AMSCs y PRGF+AMSCs. No se

observaron diferencias significativas entre los grupos PRGF y AMSCs, sin embargo, el grupo PRGF obtuvo una puntuación más baja.

Respecto a la evaluación histológica, el grupo PRGF+AMSCs obtuvo mejores resultados en ambas escalas semicuantitativas (OARSI e ICRS II) tanto 56 como 84 días después de la cirugía. No se mostraron diferencias significativas entre el grupo PRGF y el grupo AMSCs en ninguno de los dos tiempos de estudios, aunque el grupo PRGF obtuvo mejores puntuaciones. El grupo CT mostró resultados significativamente peores que el resto de los grupos a los 56 y a los 84 días tras la cirugía.

Los resultados obtenidos sugieren que la combinación de la infiltración IA de PRGF, con la infiltración IO de PRGF, AMSCs o una mezcla de PRGF+AMSCs puede inhibir el proceso de degeneración condral y favorecer la reparación del defecto con un tejido cartilaginoso muy similar al cartílago hialino sano.

Summary

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Summary

The IA infiltration of PRGF and AMSCs are known to inhibit OA progression. However, in severely affected patients, the treatment cannot reach the deeper layers of the AC nor the SB; thus, its therapeutic potential is limited. To overcome this limitation, IO infiltrations have been suggested as a safe and effective therapeutic approach, however, to our knowledge no experimental trials on this topic has been conducted and the already published results are mainly based in subjective measures.

The purpose of this doctoral thesis is to assess the effectiveness of IO infiltration with PRGF, AMSCs or a combination of both in the treatment of acute full depth chondral defects in a rabbit model.

A total of 80 rabbits were included in the study and a surgical induced full depth chondral defect, 4 mm in diameter and 5 mm in depth, was created in the medial femoral condyle of both hindlimbs. Animals were randomly divided into four groups based on the IO treatment administered on the day of surgery: sterile saline solution (CT group), PRGF, AMSCs or PRGF+AMSCs. In addition, all groups received an IA injection of PRGF on the same day. Serum HA and C2C were measured before infiltration (baseline) and 28-, 56-, and 84-, days post infiltration. Additionally, a macroscopical and histological assessment was conducted at 56- and 84-days post infiltration.

Regarding the serum biomarkers assessment, all groups showed a significantly increased concentration of HA and C2C serum levels 28- days following infiltration compared to baseline levels. Respecting HA, no significant differences were shown between groups at 28- days follow-up; however, 56- days after the surgery, PRGF, AMSCs and PRGF+AMSCs groups showed significantly lower serum levels than the CT group. Lastly, at 84- days follow-up, the PRGF AMSCs group showed significantly lower serum HA levels than the other groups. CT group achieved significantly higher serum HA levels than the other groups, while no significant differences were observed between PRGF and AMSCs groups. Concerning C2C, the PRGF+AMSCs group showed significantly lower serum C2C levels than the other groups at 28-, 56- and 84- days follow up, while the CT group showed significantly higher levels than the other groups. No significant differences between PRGF and AMSCs groups were reported at any study point. Finally, in the PRGF+AMSCs groups, there were not significant differences between the HA and the C2C serum levels at 84-days follow-up compared with baseline levels.

With regards to the overall macroscopical assessment, significantly lower scores, thus meaning better results, were achieved by the PRGF+AMSCs group at all study points. Contrarily, the CT group showed significantly higher scores than PRFG, AMSCs and PRGF+AMSCs groups at both follow-up periods. There were no significant differences between PRGF and AMSCs groups, however, lower scores were reported in the PRP group.

Regarding the overall histological evaluation, significantly better results were achieved by the PRGF+AMSCs group for both used scoring systems (OARSI and ICRS II) and at all study points. No significant differences were reported between PRGF and AMSCs group at any follow-up points, although the PRGF group showed better results. The CT group showed the worst histological results compared with the other groups, and there were significant differences with all of them.

The obtained results suggests that the combination of IA injection of PRGF with IO injection of PRGF, AMSCs or a mixture of PRGF+AMSCs could inhibit the chondral degenerative process and enhance the defect healing by promoting a repair tissue closely similar to healthy hyaline cartilage.

Bibliografía

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Bibliografía

1. Di Matteo, B.; Murrell, W.D.; Görtz, S.; Kon, E. Osteoarthritis: an ancient disease, an unsolved conundrum. *Int Orthop* 2021, 45, 313-317, DOI 10.1007/s00264-020-04934-x.
2. Dequeker, J.; Luyten, F.P. The history of osteoarthritis-osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis* 2008, 67, 5-10, DOI 10.1136/ard.2007.079764.
3. Sasaki, A.; Mizuno, M.; Mochizuki, M.; Sekiya, I. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in dogs. *World J Stem Cells* 2019, 11, 254-269, DOI 10.4252/wjsc.v11.i5.254.
4. Gugjoo, M.B.; Fazili, M.R.; Gayas, M.A.; Ahmad, R.A.; Dhama, K. Animal mesenchymal stem cell research in cartilage regenerative medicine - a review. *Vet Q* 2019, 39, 95-120, DOI 10.1080/01652176.2019.1643051.
5. Hunziker, E.B.; Kapfinger, E. Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *J Bone Joint Surg Br* 1998, 80, 144-150, DOI 10.1302/0301-620x.80b1.7531.

6. Sharun, K.; Muthu, S.; Mankuzhy, P.D.; Pawde, A.M.; Chandra, V.; Lorenzo, J.M.; Dhama, K.; Amarpal, G.T.; Sharma, G.T. Cell-free therapy for canine osteoarthritis: current evidence and prospects. *Vet Q* 2022, 42, 224-230, DOI 10.1080/01652176.2022.2145620.

7. Safiri, S.; Kolahi, A.; Smith, E.; Hill, C.; Bettampadi, D.; Mansournia, M.A.; Hoy, D.; Ashrafi-Asgarabad, A.; Sepidarkish, M.; Almasi-Hashiani, A.; Collins, G.; Kaufman, J.; Qorbani, M.; Moradi-Lakeh, M.; Woolf, A.D.; Guillemin, F.; March, L.; Cross, M. Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Ann Rheum Dis* 2020, 79, 819-828, DOI 10.1136/annrheumdis-2019-216515.

8. Bogers, S.H. Cell-Based Therapies for Joint Disease in Veterinary Medicine: What We Have Learned and What We Need to Know. *Frontiers in Veterinary Science* 2018, 5, 70, DOI 10.3389/fvets.2018.00070.

9. Brondeel, C.; Pauwelyn, G.; de Bakker, E.; Saunders, J.; Samoy, Y.; Spaas, J.H. Review: Mesenchymal Stem Cell Therapy in Canine Osteoarthritis Research: "Experientia Docet" (Experience Will Teach Us). *Frontiers in Veterinary Science* 2021, 8, 668881, DOI 10.3389/fvets.2021.668881.

10. Kon, E.; Di Matteo, B.; Delgado, D.; Cole, B.J.; Dorotei, A.; Dragoo, J.L.; Filardo, G.; Fortier, L.A.; Giuffrida, A.; Jo, C.H.; Magalon, J.; Malanga, G.A.; Mishra, A.; Nakamura, N.; Rodeo, S.A.; Sampson, S.; Sánchez, M. Platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis: an expert opinion and proposal for a novel classification and coding system. *Expert Opin Biol Ther* 2020, 20, 1447-1460, DOI 10.1080/14712598.2020.1798925.

11. Boffa, A.; Previtali, D.; Di Laura Frattura, G.; Vannini, F.; Candrian, C.; Filardo, G. Evidence on ankle injections for osteochondral lesions and osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Int Orthop* 2021, 45, 509-523, DOI 10.1007/s00264-020-04689-5.

12. Danieli, M.V.; Guerreiro, J.P.F.; Queiroz, A.O.; da Rosa Pereira, H.; Cataneo, D.C. Leucocyte-poor-platelet-rich plasma intra-operative injection in chondral knee injuries improve patients outcomes. A prospective randomized trial. *Int Orthop* 2021, 45, 463-471, DOI 10.1007/s00264-020-04830-4.

13. Di Matteo, B.; Vandenbulcke, F.; Vitale, N.D.; Iacono, F.; Ashmore, K.; Marcacci, M.; Kon, E. Minimally Manipulated Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Clinical Evidence. *Stem Cells International* 2019, 2019, 1735242, DOI 10.1155/2019/1735242.

14. Malanga, G.A.; Chirichella, P.S.; Hogaboom, N.S.; Capella, T. Clinical evaluation of micro-fragmented adipose tissue as a treatment option for patients with meniscus tears with osteoarthritis: a prospective pilot study. *Int Orthop* 2021, 45, 473-480, DOI 10.1007/s00264-020-04835-z.

15. Hernigou, P.; Delambre, J.; Quiennec, S.; Poignard, A. Human bone marrow mesenchymal stem cell injection in subchondral lesions of knee osteoarthritis: a prospective randomized study versus contralateral arthroplasty at a mean fifteen year follow-up. *Int Orthop* 2021, 45, 365-373, DOI 10.1007/s00264-020-04571-4.
16. Hernigou, P.; Bouthors, C.; Bastard, C.; Flouzat Lachaniette, C.H.; Rouard, H.; Dubory, A. Subchondral bone or intra-articular injection of bone marrow concentrate mesenchymal stem cells in bilateral knee osteoarthritis: what better postpone knee arthroplasty at fifteen years? A randomized study. *Int Orthop* 2021, 45, 391-399, DOI 10.1007/s00264-020-04687-7.
17. Sanchez, M.; Fiz, N.; Guadilla, J.; Padilla, S.; Anitua, E.; Sanchez, P.; Delgado, D. Intraosseous infiltration of platelet-rich plasma for severe knee osteoarthritis. *Arthroscopy techniques* 2014, 3, 713, DOI 10.1016/j.eats.2014.09.006.
18. Fiz, N.; Perez, J.C.; Guadilla, J.; Garate, A.; Sanchez, P.; Padilla, S.; Delgado, D.; Sanchez, M. Intraosseous Infiltration of Platelet-Rich Plasma for Severe Hip Osteoarthritis. *Arthroscopy Techniques* 2017, 6, E821-E825, DOI 10.1016/j.eats.2017.02.014.
19. Sanchez, M.; Anitua, E.; Delgado, D.; Sanchez, P.; Prado, R.; Jose Goirienea, J.; Prosper, F.; Orive, G.; Padilla, S. A new strategy to tackle severe knee osteoarthritis: Combination of intra-articular and intraosseous injections of Platelet Rich Plasma. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2016, 16, 627-643, DOI 10.1517/14712598.2016.1157162.
20. Fox, A.J.; Bedi, A.; Rodeo, S.A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 2009, 1, 461-468, DOI 10.1177/1941738109350438.
21. Vaca-González, J.J.; Gutiérrez, M.L.; Garzón-Alvarado, D.A. Cartílago articular: estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica. Revisión de conceptos actuales. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología* 2017, 31, 202-210, DOI 10.1016/j.rccot.2017.06.002.
22. Buckwalter, J.A.; Rosenberg, L.C.; Hunziker, E.B. Articular-Cartilage - Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitating Repair. *Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy* 1990, 19-56.
23. Espanha, M.M. Articular cartilage: structure and histochemical composition. *Acta Reumatologica Portuguesa* 2010, 35, 424-433.
24. Chevalier, X.; Richette, P. Cartílago articular normal: anatomía, fisiología, metabolismo y envejecimiento. *EMC-Aparato Locomotor* 2005, 38, 1-13.
25. Poole, A.R.; Kojima, T.; Yasuda, T.; Mwale, F.; Kobayashi, M.; Laverty, S. Composition and structure of articular cartilage - A template for tissue repair. *Clin Orthop* 2001, S26-S33, DOI 10.1097/00003086-200110001-00004.

26. Carrillo, J.; Colomer, R.; Cuervo, B.; Chicharro, D.; Damiá, E.; Lafuente, P.; Peláez, P.; Rubio, M.; Sopena, J.; Torres-Torrillas, M. Guía SERVET de manejo clínico: osteoartritis, 1ª ed.; SERVET: Zaragoza, España, 2020.
27. Alford, J.W.; Cole, B.J. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med* 2005, 33, 295-306, DOI 10.1177/0363546504273510.
28. Sánchez Naranjo, J.C. Fisiología del condrocito articular. *Revista Colombiana de Reumatología* 2008, 15, 21-33.
29. Alexopoulos, L.G.; Setton, L.A.; Guilak, F. The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. *Acta Biomater* 2005, 1, 317-325, DOI 10.1016/j.actbio.2005.02.001.
30. Buckwalter, J.A.; Martin, J.A.; Brown, T.D. Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis. *Biorheology* 2006, 43, 603-609.
31. Mow, V.; Guo, X.E. Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: Their inhomogeneities and anisotropies. *Annu Rev Biomed Eng* 2002, 4, 175-209, DOI 10.1146/annurev.bioeng.4.110701.120309.
32. Thonar, E.J.-A.; Masuda, K.; Manicourt, D.H.; Kuettner, K.E. Structure and Function of Normal Human Adult Articular Cartilage. In *Osteoarthritis: Clinical and Experimental Aspects*; Reginster, J.-.; Pelletier, J.-.; Martel-Pelletier, J.; Henrotin, Y.; Crasborn, L., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1999; pp. 1-19.
33. Kim, E.; Guilak, F.; Haider, M.A. The Dynamic Mechanical Environment of the Chondrocyte: A Biphasic Finite Element Model of Cell-Matrix Interactions Under Cyclic Compressive Loading. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* 2008, 130, 061009, DOI 10.1115/1.2978991.
34. Trujillo-Martín, E. Canales de agua e iones en el cartílago articular. *Revista Española de Reumatología* 2005, 32, 13-17.
35. Maroudas, A.; WACHTEL, E.; GRUSHKO, G.; KATZ, E.P.; WEINBERG, P. The Effect of Osmotic and Mechanical Pressures on Water Partitioning in Articular-Cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1073, 285-294, DOI 10.1016/0304-4165(91)90133-2.
36. Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research* 2002, 4, 30-35, DOI 10.1186/ar380.
37. Vega-Álvarez, J.,A.; García-Suárez, O.; Fernández Monjil, D.; del Valle Soto, M.,E. Bioquímica y biología del cartílago articular. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología* 2002, 46, 391-400.

38. Shapiro, F.; Forriol, F. El cartílago de crecimiento: biología y biomecánica del desarrollo. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología* 2005, 49, 55-67.
39. Hunziker, E.B.; Lippuner, K.; Keel, M.J.B.; Shintani, N. An educational review of cartilage repair: precepts & practice - myths & misconceptions - progress & prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015, 23, 334-350, DOI 10.1016/j.joca.2014.12.011.
40. Schwartz, N.B. Biosynthesis and regulation of expression of proteoglycans. *Frontiers in Bioscience* 2000, 5, D649-D655.
41. Forriol-Campos, F. El cartílago articular: aspectos mecánicos y su repercusión en la reparación tisular. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología* 2002, 46, 380-390.
42. Eleswarapu, S.V.; Leipzig, N.D.; Athanasiou, K.A. Gene expression of single articular chondrocytes. *Cell Tissue Res* 2007, 327, 43-54, DOI 10.1007/s00441-006-0258-5.
43. Nordin, M.; Frankel, V. Bases biomecánicas del sistema musculoesquelético, 4ª ed. ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2013.
44. Buckwalter, J.A.; Mankin, H.J. Articular cartilage: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional Course Lectures*, Vol 47 - 1998 1998, 47, 477-486.
45. Fischer, A.E.; CARPENTER, T.A.; TYLER, J.A.; HALL, L.D. Visualization of Mass-Transport of Small Organic-Molecules and Metal-Ions through Articular-Cartilage by Magnetic-Resonance-Imaging. *Magn Reson Imaging* 1995, 13, 819-826, DOI 10.1016/0730-725X(95)00040-N.
46. Lenci, E.; Cosottini, L.; Trabocchi, A. Novel matrix metalloproteinase inhibitors: an updated patent review (2014-2020). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2021, 31, 509-523, DOI 10.1080/13543776.2021.1881481.
47. Cheng, X.; Xu, P. The articular cartilage preservative effects of genistein in an experimental model of knees osteoarthritis. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism* 2021, 46, 1331-1336, DOI 10.1139/apnm-2020-0958.
48. Goldring, M.B.; Otero, M.; Plumb, D.A.; Dragomir, C.; Favero, M.; El Hachem, K.; Hashimoto, K.; Roach, H.I.; Olivotto, E.; Borzi, R.M.; Marcu, K.B. Roles of Inflammatory and Anabolic Cytokines in Cartilage Metabolism: Signals and Multiple Effectors Converge upon Mmp-13 Regulation in Osteoarthritis. *European Cells & Materials* 2011, 21, 202-220, DOI 10.22203/eCM.v021a16.
49. Zanotti, S.; Canalis, E. Interleukin 6 mediates selected effects of Notch in chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013, 21, 1766-1773, DOI 10.1016/j.joca.2013.08.010.
50. van Meegeren, M.E.R.; Roosendaal, G.; Jansen, N.W.D.; Wenting, M.J.G.; van Wesel, A.C.W.; van Roon, J.A.G.; Lafeber, F.P.J.G. IL-4 alone and in combination with IL-10 protects against blood-induced cartilage damage. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012, 20, 764-772, DOI 10.1016/j.joca.2012.04.002.

51. Behrendt, P.; Preusse-Prange, A.; Klueter, T.; Haake, M.; Rolaufts, B.; Grodzinsky, A.J.; Lippross, S.; Kurz, B. IL-10 reduces apoptosis and extracellular matrix degradation after injurious compression of mature articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016, 24, 1981-1988, DOI 10.1016/j.joca.2016.06.016.
52. Jagielski, M.; Wolf, J.; Marzahn, U.; Völker, A.; Lemke, M.; Meier, C.; Ertel, W.; Godkin, O.; Arens, S.; Schulze-Tanzil, G. The influence of IL-10 and TNF α on chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional cultures. *Int J Mol Sci* 2014, 15, 15821-15844, DOI 10.3390/ijms150915821.
53. Zhao, Z.; Li, Y.; Wang, M.; Zhao, S.; Zhao, Z.; Fang, J. Mechanotransduction pathways in the regulation of cartilage chondrocyte homeostasis. *J Cell Mol Med* 2020, 24, 5408-5419, DOI 10.1111/jcmm.15204.
54. Schreiner, A.J.; Stoker, A.M.; Bozynski, C.C.; Kuroki, K.; Stannard, J.P.; Cook, J.L. Clinical Application of the Basic Science of Articular Cartilage Pathology and Treatment. *Journal of Knee Surgery* 2020, 33, 1056-1068, DOI 10.1055/s-0040-1712944.
55. Zevenbergen, L.; Smith, C.R.; Van Rossom, S.; Thelen, D.G.; Famaey, N.; Vander Sloten, J.; Jonkers, I. Cartilage defect location and stiffness predispose the tibiofemoral joint to aberrant loading conditions during stance phase of gait. *Plos One* 2018, 13, e0205842, DOI 10.1371/journal.pone.0205842.
56. Simon, T.M.; Jackson, D.W. Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options. *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 2018, 26, 31-39, DOI 10.1097/JSA.000000000000182.
57. Redman, S.N.; Oldfield, S.F.; Archer, C.W. Current strategies for articular cartilage repair. *European cells & materials* 2005, 9, 23-32.
58. Carballo, C.B.; Nakagawa, Y.; Sekiya, I.; Rodeo, S.A. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med* 2017, 36, 413-+, DOI 10.1016/j.csm.2017.02.001.
59. Borrelli, J.; Ricci, W.M. Acute effects of cartilage impact. *Clin Orthop* 2004, 33-39, DOI 10.1097/01.blo.0000132627.13539.02.
60. Kloppenburg, M.; Berenbaum, F. Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy. *Osteoarthritis and Cartilage* 2020, 28, 242-248, DOI 10.1016/j.joca.2020.01.002.
61. Jimenez, G.; Cobo-Molinos, J.; Antich, C.; Lopez-Ruiz, E. Osteoarthritis: Trauma vs Disease. *Adv Exp Med Biol* 2018, 1059, 63-83, DOI 10.1007/978-3-319-76735-2_3.
62. Mandl, L.A. Osteoarthritis year in review 2018: clinical. *Osteoarthritis and Cartilage* 2019, 27, 359-364, DOI 10.1016/j.joca.2018.11.001.

63. Blackburn, S.; Research, U.G.; Rhodes, C.; Higginbottom, A.; Dziedzic, K. The OARSI standardised definition of osteoarthritis: A lay version. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016, 24, S192, DOI 10.1016/j.joca.2016.01.379.
64. Blanco, F.J.; Silva-Diaz, M.; Quevedo Vila, V.; Seoane-Mato, D.; Ruiz, F.P.; Juan-Mas, A.; Pego-Reigosa, J.M.; Narvaez, J.; Quilis, N.; Cortes, R.; Romero Perez, A.; Fabregas Canales, D.; Font Gaya, T.; Bordoy Ferrer, C.; Sanchez-Piedra, C.; Diaz-Gonzalez, F.; Bustabad-Reyes, S.; Grp Trabajo Proyecto, E. Prevalence of symptomatic osteoarthritis in Spain: EPISER2016 study. *Reumatologia Clinica* 2021, 17, 461-470, DOI 10.1016/j.reuma.2020.01.008.
65. Long, H.; Liu, Q.; Yin, H.; Wang, K.; Diao, N.; Zhang, Y.; Lin, J.; Guo, A. Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis From 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis Rheumatol* 2022, 74, 1172-1183, DOI 10.1002/art.42089.
66. Global Burden of Disease Results, Global Burden of Disease Collaborative Network. 2019.
67. Quicke, J.G.; Conaghan, P.G.; Corp, N.; Peat, G. Osteoarthritis year in review 2021: epidemiology & therapy. *Osteoarthritis and Cartilage* 2022, 30, 196-206, DOI 10.1016/j.joca.2021.10.003.
68. Garstang, S.,V.; Stitik, T.P. Osteoarthritis - Epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* 2006, 85, S2-S11, DOI 10.1097/01.phm.0000245568.69434.1a.
69. Vina, E.R.; Kwoh, C.K. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Curr Opin Rheumatol* 2018, 30, 160-167, DOI 10.1097/BOR.0000000000000479.
70. Wang, X.; Perry, T.A.; Arden, N.; Chen, L.; Parsons, C.M.; Cooper, C.; Gates, L.; Hunter, D.J. Occupational Risk in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Arthritis Care & Research* 2020, 72, 1213-1223, DOI 10.1002/acr.24333.
71. Cross, M.; Smith, E.; Hoy, D.; Nolte, S.; Ackerman, I.; Fransen, M.; Bridgett, L.; Williams, S.; Guillemin, F.; Hill, C.L.; Laslett, L.L.; Jones, G.; Cicuttini, F.M.; Osborne, R.; Vos, T.; Buchbinder, R.; Woolf, A.; March, L. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 2014, 73, 1323-1330, DOI 10.1136/annrheumdis-2013-204763.
72. Haan, M.N.; Lee, A.; Odden, M.C.; Aiello, A.E.; To, T.M.; Neuhaus, J.M. Gender Differences in the Combined Effects of Cardiovascular Disease and Osteoarthritis on Progression to Functional Impairment in Older Mexican Americans. *Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences* 2016, 71, 1089-1095, DOI 10.1093/gerona/glw014.

73. Vitaloni, M.; Botto-van Bemden, A.; Sciortino, R.; Carn, X.; Quintero, M.; Santos-Moreno, P.; Espinosa, R.; Rillo, O.; Monfort, J.; de Abajo, F.; Oswald, E.; Matucci, M.; du Souich, P.; Moller, I.; Baures, M.R.; Vinci, A.; Scotton, D.; Bibas, M.; Eakin, G.; Verges, J. A patients' view of OA: the Global Osteoarthritis Patient Perception Survey (GOAPPS), a pilot study. *Bmc Musculoskeletal Disorders* 2020, 21, 727, DOI 10.1186/s12891-020-03741-0.

74. Veronese, N.; Stubbs, B.; Solmi, M.; Smith, T.O.; Noale, M.; Cooper, C.; Maggi, S. Association between lower limb osteoarthritis and incidence of depressive symptoms: data from the osteoarthritis initiative. *Age Ageing* 2017, 46, 470-476, DOI 10.1093/ageing/afw216.

75. Kye, S.; Park, K. Suicidal ideation and suicidal attempts among adults with chronic diseases: A cross-sectional study. *Compr Psychiatry* 2017, 73, 160-167, DOI 10.1016/j.comppsy.2016.12.001.

76. Schieir, O.; Tosevski, C.; Glazier, R.H.; Hogg-Johnson, S.; Badley, E.M. Incident myocardial infarction associated with major types of arthritis in the general population: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2017, 76, 1396-1404, DOI 10.1136/annrheumdis-2016-210275.

77. Chung, W.; Lin, H.; Ho, F.; Lai, C.; Chao, C. Risks of acute coronary syndrome in patients with osteoarthritis: a nationwide population-based cohort study. *Clin Rheumatol* 2016, 35, 2807-2813, DOI 10.1007/s10067-016-3391-x.

78. Courties, A.; Sellam, J.; Maheu, E.; Cadet, C.; Barthe, Y.; Carrat, F.; Berenbaum, F. Coronary heart disease is associated with a worse clinical outcome of hand osteoarthritis: a cross-sectional and longitudinal study. *Rmd Open* 2017, 3, UNSP e000344, DOI 10.1136/rmdopen-2016-000344.

79. Singh, J.A.; Yu, S. Time Trends, Predictors, and Outcome of Emergency Department Use for Gout: A Nationwide US Study. *J Rheumatol* 2016, 43, 1581-1588, DOI 10.3899/jrheum.151419.

80. Hubertsson, J.; Turkiewicz, A.; Petersson, I.F.; Englund, M. Understanding Occupation, Sick Leave, and Disability Pension Due to Knee and Hip Osteoarthritis From a Sex Perspective. *Arthritis Care & Research* 2017, 69, 226-233, DOI 10.1002/acr.22909.

81. Economist Intelligence Unit The unrecognised burden of osteoarthritis: unmet needs in Europe. 2021.

82. Anderson, K.L.; Zulch, H.; O'Neill, D.G.; Meeson, R.L.; Collins, L.M. Risk Factors for Canine Osteoarthritis and Its Predisposing Arthropathies: A Systematic Review. *Frontiers in Veterinary Science* 2020, 7, 220, DOI 10.3389/fvets.2020.00220.

83. Spitznagel, M.B.; Jacobson, D.M.; Cox, M.D.; Carlson, M.D. Caregiver burden in owners of a sick companion animal: a cross-sectional observational study. *Vet Rec* 2017, 181, 321, DOI 10.1136/vr.104295.
84. Martel-Pelletier, J.; Barr, A.J.; Cicuttini, F.M.; Conaghan, P.G.; Cooper, C.; Goldring, M.B.; Goldring, S.R.; Jones, G.; Teichtahl, A.J.; Pelletier, J. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers* 2016, 2, 16072, DOI 10.1038/nrdp.2016.72.
85. Anderson, K.L.; O'Neill, D.G.; Brodbelt, D.C.; Church, D.B.; Meeson, R.L.; Sargan, D.; Summers, J.F.; Zulch, H.; Collins, L.M. Prevalence, duration and risk factors for appendicular osteoarthritis in a UK dog population under primary veterinary care. *SCIENTIFIC REPORTS* 2018, 8, DOI 10.1038/s41598-018-23940-z.
86. Pettitt, R.; German, A. Investigation and management of canine osteoarthritis. *Practice* 2015, 37, 1-8, DOI 10.1136/inp.h5763.
87. Taylor-Brown, F.E.; Meeson, R.L.; Brodbelt, D.C.; Church, D.B.; McGreevy, P.D.; Thomson, P.C.; O'Neill, D.G. Epidemiology of Cranial Cruciate Ligament Disease Diagnosis in Dogs Attending Primary-Care Veterinary Practices in England. *Vet Surg* 2015, 44, 777-783, DOI 10.1111/vsu.12349.
88. Meeson, R.L.; Todhunter, R.J.; Blunn, G.; Nuki, G.; Pitsillides, A.A. Spontaneous dog osteoarthritis - a One Medicine vision. *Nature reviews.Rheumatology* 2019, 15, 273-287, DOI 10.1038/s41584-019-0202-1. Available online:
89. Lascelles, B.D.; Henry, John B., I., II; Brown, J.; Robertson, I.; Sumrell, A.T.; Simpson, W.; Wheeler, S.; Hansen, B.D.; Zamprogno, H.; Freire, M.; Pease, A. Cross-Sectional Study of the Prevalence of Radiographic Degenerative Joint Disease in Domesticated Cats. *VETERINARY SURGERY* 2010, 39, 535-544, DOI 10.1111/j.1532-950X.2010.00708.x.
90. Monteiro, B.P. Feline Chronic Pain and Osteoarthritis. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 2020, 50, 769-+, DOI 10.1016/j.cvsm.2020.02.003.
91. Hardie, E.M.; Roe, S.C.; Martin, F.R. Radiographic evidence of degenerative joint disease in geriatric cats: 100 cases (1994-1997). *J Am Vet Med Assoc* 2002, 220, 628-632, DOI 10.2460/javma.2002.220.628.
92. Godfrey, D.R. Osteoarthritis in cats: a retrospective radiological study. *J Small Anim Pract* 2005, 46, 425-429, DOI 10.1111/j.1748-5827.2005.tb00340.x.
93. Clarke, S.P.; Mellor, D.; Clements, D.N.; Gemmill, T.; Farrell, M.; Carmichael, S.; Bennett, D. Prevalence of radiographic signs of degenerative joint disease in a hospital population of cats. *Vet Rec* 2005, 157, 793-799, DOI 10.1136/vr.157.25.793.
94. Clarke, S.P.; Bennett, D. Feline osteoarthritis: a prospective study of 28 cases. *J Small Anim Pract* 2006, 47, 439-445, DOI 10.1111/j.1748-5827.2006.00143.x.

95. Donell, S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *Efort Open Reviews* 2019, 4, 221-229, DOI 10.1302/2058-5241.4.180102.
96. Brandt, K.D.; Radin, E.L.; Dieppe, P.A.; van de Putte, L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis* 2006, 65, 1261-1264, DOI 10.1136/ard.2006.058347.
97. Guilak, F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Practice & Research in Clinical Rheumatology* 2011, 25, 815-823, DOI 10.1016/j.berh.2011.11.013.
98. Kapoor, M.; Mahomed, N. Osteoarthritis: Pathogenesis, Diagnosis, Available Treatments, Drug Safety, Regenerative and Precision Medicine, Adis: London, 2015; pp. 1-278.
99. Pearle, A.D.; Warren, R.F.; Rodeo, S.A. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin Sports Med* 2005, 24, 1-+, DOI 10.1016/j.csm.2004.08.007.
100. Sharif, M.; Shepstone, L.; Elson, C.J.; Dieppe, P.A.; Kirwan, J.R. Increased serum C reactive protein may reflect events that precede radiographic progression in osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis* 2000, 59, 71-74, DOI 10.1136/ard.59.1.71.
101. Kulkarni, P.; Martson, A.; Vidya, R.; Chitnavis, S.; Harsulkar, A. Pathophysiological landscape of osteoarthritis. *Advances in Clinical Chemistry*, Vol 100 2021, 100, 37-90, DOI 10.1016/bs.acc.2020.04.002.
102. Braaten, J.A.; Banovetz, M.T.; DePhillipo, N.N.; Familiari, F.; Russo, R.; Kennedy, N.I.; LaPrade, R.F. Biomarkers for Osteoarthritis Diseases. *Life-Basel* 2022, 12, 1799, DOI 10.3390/life12111799.
103. López-Armada, M.J.; Carames, B.; Cillero-Pastor, B.; Blanco García, F.J. Fisiopatología de la artrosis: ¿cuál es la actualidad? *Revista Española de Reumatología* 2004, 31, 379-393.
104. Bian, W.; Lian, Q.; Li, D.; Wang, J.; Zhang, W.; Jin, Z.; Qiu, Y. Morphological characteristics of cartilage-bone transitional structures in the human knee joint and CAD design of an osteochondral scaffold. *Biomedical Engineering Online* 2016, 15, 82, DOI 10.1186/s12938-016-0200-3.
105. Zhu, X.; Chan, Y.T.; Yung, P.S.H.; Tuan, R.S.; Jiang, Y. Subchondral Bone Remodeling: A Therapeutic Target for Osteoarthritis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021, 8, 607764, DOI 10.3389/fcell.2020.607764.
106. Fan, X.; Wu, X.; Crawford, R.; Xiao, Y.; Prasad, I. Macro, Micro, and Molecular. Changes of the Osteochondral Interface in Osteoarthritis Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021, 9, 659654, DOI 10.3389/fcell.2021.659654.

107. Goldring, S.R.; Goldring, M.B. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol* 2016, 12, 632-644, DOI 10.1038/nrrheum.2016.148 [doi].
108. Coaccioli, S.; Sarzi-Puttini, P.; Zis, P.; Rinonapoli, G.; Varrassi, G. Osteoarthritis: New Insight on Its Pathophysiology. *Journal of Clinical Medicine* 2022, 11, 6013, DOI 10.3390/jcm11206013.
109. Hu, Y.; Chen, X.; Wang, S.; Jing, Y.; Su, J. Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. *Bone Research* 2021, 9, 20, DOI 10.1038/s41413-021-00147-z.
110. Tanamas, S.K.; Wluka, A.; Pelletier, J.; Pelletier, J.M.; Abram, F.; Berry, P.A.; Wang, Y.; Jones, G.; Cicuttini, F.M. Bone marrow lesions in people with knee osteoarthritis predict progression of disease and joint replacement: a longitudinal study. *Rheumatology* 2010, 49, 2413-2419, DOI 10.1093/rheumatology/keq286.
111. Frost, H.M. Wolff Law and Bones Structural Adaptations to Mechanical Usage - an Overview for Clinician. *Angle Orthod* 1994, 64, 175-188.
112. Kuttapitiya, A.; Assi, L.; Laing, K.; Hing, C.; Mitchell, P.; Whitley, G.; Harrison, A.; Howe, F.A.; Ejindu, V.; Heron, C.; Sofat, N. Microarray analysis of bone marrow lesions in osteoarthritis demonstrates upregulation of genes implicated in osteochondral turnover, neurogenesis and inflammation. *Ann Rheum Dis* 2017, 76, 1764-1773, DOI 10.1136/annrheumdis-2017-211396.
113. Muratovic, D.; Findlay, D.M.; Cicuttini, F.M.; Wluka, A.; Lee, Y.; Kuliwaba, J.S. Bone matrix microdamage and vascular changes characterize bone marrow lesions in the subchondral bone of knee osteoarthritis. *Bone* 2018, 108, 193-201, DOI 10.1016/j.bone.2018.01.012.
114. Walsh, D.A.; Sofat, N.; Guermazi, A.; Hunter, D.J. Osteoarthritis Bone Marrow Lesions. *Osteoarthritis and Cartilage* 2023, 31, 11-17, DOI 10.1016/j.joca.2022.09.007.
115. Zahan, O.; Serban, O.; Gherman, C.; Fodor, D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Medicine and pharmacy reports* 2020, 93, 12-22, DOI 10.15386/mpr-1422.
116. Barreto, G.; Manninen, M.; Eklund, K.K. Osteoarthritis and Toll-Like Receptors: When Innate Immunity Meets Chondrocyte Apoptosis. *Biology-Basel* 2020, 9, 65, DOI 10.3390/biology9040065.
117. Sharma, N.; Drobinski, P.; Kayed, A.; Chen, Z.; Kjølgaard-Petersen, C.F.; Gantzel, T.; Karsdal, M.A.; Michaelis, M.; Ladel, C.; Bay-Jensen, A.C.; Lindemann, S.; Thudium, C.S. Inflammation and joint destruction may be linked to the generation of cartilage metabolites of ADAMTS-5 through activation of toll-like receptors. *Osteoarthritis and Cartilage* 2020, 28, 658-668, DOI 10.1016/j.joca.2019.11.002.

118. Lambert, C.; Zappia, J.; Sanchez, C.; Florin, A.; Dubuc, J.; Henrotin, Y. The Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) as Potential Targets to Treat Osteoarthritis: Perspectives From a Review of the Literature. *Frontiers in Medicine* 2021, 7, 607186, DOI 10.3389/fmed.2020.607186.

119. de Lange-Brokaar, B.J.E.; Kloppenburg, M.; Andersen, S.N.; Dorjee, A.L.; Yusuf, E.; Herbrvan Toorn, L.; Kroon, H.M.; Zuurmond, A.-.; Stojanovic-Susulic, V.; Bloem, J.L.; Nelissen, R.G.H.H.; Toes, R.E.M.; Ioan-Facsinay, A. Characterization of synovial mast cells in knee osteoarthritis: association with clinical parameters. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016, 24, 664-671, DOI 10.1016/j.joca.2015.11.011.

120. Kulkarni, P.; Harsulkar, A.; Martson, A.; Suutre, S.; Martson, A.; Koks, S. Mast Cells Differentiated in Synovial Fluid and Resident in Osteophytes Exalt the Inflammatory Pathology of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 541, DOI 10.3390/ijms23010541.

121. Haubruck, P.; Pinto, M.M.; Moradi, B.; Little, C.B.; Gentek, R. Monocytes, Macrophages, and Their Potential Niches in Synovial Joints - Therapeutic Targets in Post-Traumatic Osteoarthritis? *Front Immunol* 2021, 12, 763702, DOI 10.3389/fimmu.2021.763702.

122. MacDonald, I.J.; Liu, S.; Su, C.; Wang, Y.; Tsai, C.; Tang, C. Implications of Angiogenesis Involvement in Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19, 12, DOI 10.3390/ijms19070012.

123. Rockel, J.S.; Kapoor, M. The Metabolome and Osteoarthritis: Possible Contributions to Symptoms and Pathology. *Metabolites* 2018, 8, 92, DOI 10.3390/metabo8040092.

124. Murata, K.P.; Oka, Y.; Onitsuka, K.; Kokubun, T.; Nakajima, A.; Arakawa, K.; Nakagaki, S.; Kenamura, N. Controlling Joint Instability After Anterior Cruciate Ligament Transection Inhibits the Transforming Growth Factor-Beta-Mediated Osteophyte Formation. *Osteoarthritis and Cartilage* 2020, 28, S204.

125. Toumi, H.; Mazor, M. *Osteoarthritis Biomarkers and Treatments*, IntechOpen: London, UK, 2019;.

126. Boffa, A.; Merli, G.; Andriolo, L.; Lattermann, C.; Salzmann, G.M.; Filardo, G. Synovial Fluid Biomarkers in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Quantitative Evaluation Using BIPEDs Criteria. *Cartilage* 2021, 13, 82S-103S, DOI 10.1177/1947603520942941.

127. Sakellariou, G.; Conaghan, P.G.; Zhang, W.; Bijlsma, J.W.J.; Boyesen, P.; D'Agostino, M.A.; Doherty, M.; Fodor, D.; Kloppenburg, M.; Miese, F.; Naredo, E.; Porcheret, M.; Iagnocco, A. EULAR recommendations for the use of imaging in the clinical management of peripheral joint osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2017, 76, 1484-1494, DOI 10.1136/annrheumdis-2016-210815.

128. Fox, M.; Chang, E.Y.; Amini, B.; Bernard, S.A.; Gorbachova, T.; Ha, A.S.; Iyer, R.S.; Lee, K.S.; Metter, D.F.; Mooar, P.A.; Shah, N.A.; Singer, A.D.; Smith, S.E.; Taljanovic, M.S.; Thiele, R.; Tynus, K.M.; Kransdorf, M.J.; Expert Panel on Musculoskeletal Imaging: ACR Appropriateness Criteria Chronic Knee Pain. *Journal of the American College of Radiology : JACR* 2018, 15, S302-S312, DOI 10.1016/j.jacr.2018.09.016.
129. Hunter, D.J.; Arden, N.; Cicuttini, F.M.; Crema, M.D.; Dardzinski, B.; Duryea, J.; Guermazi, A.; Haugen, I.K.; Kloppenburg, M.; Maheu, E.; Miller, C.G.; Martel-Pelletier, J.; Ochoa-Albiztegui, R.E.; Pelletier, J.-.; Peterfy, C.; Roemer, F.; Gold, G.E. OARSI Clinical Trials Recommendations: Hand imaging in clinical trials in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015, 23, 732-746, DOI 10.1016/j.joca.2015.03.003.
130. Gold, G.E.; Cicuttini, F.M.; Crema, M.D.; Eckstein, F.; Guermazi, A.; Kijowski, R.; Link, T.M.; Maheu, E.; Martel-Pelletier, J.; Miller, C.G.; Pelletier, J.-.; Peterfy, C.G.; Potter, H.G.; Roemer, F.W.; Hunter, D.J. OARSI Clinical Trials Recommendations: Hip imaging in clinical trials in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015, 23, 716-731, DOI 10.1016/j.joca.2015.03.004.
131. Hunter, D.J.; Altman, R.D.; Cicuttini, F.M.; Crema, M.D.; Duryea, J.; Eckstein, F.; Guermazi, A.; Kijowski, R.; Link, T.M.; Martel-Pelletier, J.; Miller, C.G.; Mosher, T.J.; Ochoa-Albiztegui, R.E.; Pelletier, J.-.; Peterfy, C.; Raynauld, J.-.; Roemer, F.W.; Totterman, S.M.; Gold, G.E. OARSI Clinical Trials Recommendations: Knee imaging in clinical trials in osteoarthritis (vol 23, pg 698, 2015). *Osteoarthritis and Cartilage* 2015, 23, 1434-1435, DOI 10.1016/j.joca.2015.06.011.
132. Altman, R.D.; Gold, G.E. Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007, 15, A1-A56, DOI 10.1016/j.joca.2006.11.009.
133. Carr, A.J.; Robertsson, O.; Graves, S.; Price, A.J.; Arden, N.K.; Judge, A.; Beard, D.J. Knee replacement. *Lancet* 2012, 379, 1331-1340, DOI 10.1016/S0140-6736(11)60752-6.
134. Roemer, F.W.; Guermazi, A.; Demehri, S.; Wirth, W.; Kijowski, R. Imaging in Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2022, 30, 913-934, DOI 10.1016/j.joca.2021.04.018.
135. Keenan, O.J.F.; Holland, G.; Maempel, J.F.; Keating, J.F.; Scott, C.E.H. Correlations between radiological classification systems and confirmed cartilage loss in severe knee osteoarthritis. *Bone & Joint Journal* 2020, 102B, 301-309, DOI 10.1302/0301-620X.102B3.BJJ-2019-0337.R1.
136. Kellgren, J.H.; Lawrence, J.S. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis* 1957, 16, 494-502, DOI 10.1136/ard.16.4.494.
137. Amin, S.; LaValley, M.P.; Guermazi, A.; Grigoryan, M.; Hunter, D.J.; Clancy, M.; Niu, J.B.; Gale, D.R.; Felson, D.T. The relationship between cartilage loss on magnetic resonance imaging

and radiographic progression in men and women with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005, 52, 3152-3159, DOI 10.1002/art.21296.

138. Jones, G.; Ding, C.H.; Scott, F.; Glisson, M.; Cicuttini, F.M. Early radiographic osteoarthritis is associated with substantial changes in cartilage volume and tibial bone surface area in both males and females. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004, 12, 169-174, DOI 10.1016/j.joca.2003.08.010.

139. Guermazi, A.; Hayashi, D.; Eckstein, F.; Hunter, D.J.; Duryea, J.; Roemer, F.W. Imaging of Osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 2013, 39, 67-+, DOI 10.1016/j.rdc.2012.10.003.

140. Menashe, L.; Hirko, K.; Losina, E.; Kloppenburg, M.; Zhang, W.; Li, L.; Hunter, D.J. The diagnostic performance of MRI in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 2012, 20, 13-21, DOI 10.1016/j.joca.2011.10.003.

141. Lee, L.S.; Chan, P.K.; Fung, W.C.; Chan, V.W.K.; Yan, C.H.; Chiu, K.Y. Imaging of knee osteoarthritis: A review of current evidence and clinical guidelines. *Musculoskeletal Care* 2021, 19, 363-374, DOI 10.1002/msc.1536.

142. Hayashi, D.; Roemer, F.W.; Guermaz, A. Magnetic resonance imaging assessment of knee osteoarthritis: current and developing new concepts and techniques. *Clin Exp Rheumatol* 2019, 37, 88-95.

143. Eckstein, F.; Cicuttini, F.M.; Raynauld, J.-.; Waterton, J.C.; Peterfy, C. Magnetic resonance imaging (MRI) of articular cartilage in knee osteoarthritis (OA): morphological assessment. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006, 14, A46-A75, DOI 10.1016/j.joca.2006.02.026.

144. MacKay, J.W.; Low, S.B.L.; Smith, T.O.; Toms, A.P.; McCaskie, A.W.; Gilbert, F.J. Systematic review and meta-analysis of the reliability and discriminative validity of cartilage compositional MRI in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2018, 26, 1140-1152, DOI 10.1016/j.joca.2017.11.018.

145. Yoon, M.A.; Hong, S.; Im, A.L.; Kang, C.H.; Kim, B.H.; Kim, I.S. Comparison of T1rho and T2 Mapping of Knee Articular Cartilage in an Asymptomatic Population. *Korean J Radiol* 2016, 17, 912-918, DOI 10.3348/kjr.2016.17.6.912.

146. Guermazi, A.; Roemer, F.W.; Haugen, I.K.; Crema, M.D.; Hayashi, D. MRI-based semiquantitative scoring of joint pathology in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2013, 9, 236-251, DOI 10.1038/nrrheum.2012.223.

147. Baker-LePain, J.C.; Lane, N.E. Relationship between joint shape and the development of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2010, 22, 538-543, DOI 10.1097/BOR.0b013e32833d20ae.

148. Sayre, E.C.; Guermazi, A.; Esdaile, J.M.; Kopec, J.A.; Singer, J.; Thorne, A.; Nicolaou, S.; Cibere, J. Associations between MRI features versus knee pain severity and progression: Data

from the Vancouver Longitudinal Study of Early Knee Osteoarthritis. *Plos One* 2017, 12, e0176833, DOI 10.1371/journal.pone.0176833.

149. Atkinson, H.F.; Birmingham, T.B.; Moyer, R.F.; Yacoub, D.; Kanko, L.E.; Bryant, D.M.; Thiessen, J.D.; Thompson, R.T. MRI T2 and T1 ρ relaxation in patients at risk for knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord* 2019, 20, 182-7, DOI 10.1186/s12891-019-2547-7.

150. Regatte, R.R.; Akella, S.V.S.; Lonner, J.H.; Kneeland, J.B.; Reddy, R. T1 ρ relaxation mapping in human osteoarthritis (OA) cartilage: comparison of T1 ρ with T2. *J Magn Reson Imaging* 2006, 23, 547-553, DOI 10.1002/jmri.20536.

151. Keen, H.I.; Conaghan, P.G. Ultrasonography in Osteoarthritis. *Radiol Clin North Am* 2009, 47, 581-+, DOI 10.1016/j.rcl.2009.04.007.

152. Saarakkala, S.; Waris, P.; Waris, V.; Tarkiainen, I.; Karvanen, E.; Aarnio, J.; Koski, J.M. Diagnostic performance of knee ultrasonography for detecting degenerative changes of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012, 20, 376-381, DOI 10.1016/j.joca.2012.01.016.

153. Tarhan, S.; Unlu, Z.; Goktan, C. Magnetic resonance imaging and ultrasonographic evaluation of the patients with knee osteoarthritis: a comparative study. *Clin Rheumatol* 2003, 22, 181-188, DOI 10.1007/s10067-002-0694-x.

154. Riecke, B.F.; Christensen, R.; Torp-Pedersen, S.; Boesen, M.; Gudbergesen, H.; Bliddal, H. An ultrasound score for knee osteoarthritis: a cross-sectional validation study. *Osteoarthritis and Cartilage* 2014, 22, 1675-1691, DOI 10.1016/j.joca.2014.06.020.

155. Chan, K.K.W.; Sit, R.W.S.; Wu, R.W.K.; Ngai, A.H.Y. Clinical, Radiological and Ultrasonographic Findings Related to Knee Pain in Osteoarthritis. *Plos One* 2014, 9, e92901, DOI 10.1371/journal.pone.0092901.

156. Malas, F.U.; Kara, M.; Kaymak, B.; Akinci, A.; Ozcakar, L. Ultrasonographic evaluation in symptomatic knee osteoarthritis: clinical and radiological correlation. *International Journal of Rheumatic Diseases* 2014, 17, 536-540, DOI 10.1111/1756-185X.12190.

157. Oo, W.; Linklater, J.M.; Saarakkala, S.; Samuels, J.; Conaghan, P.G.; Daniel, M.; Keen, H.; Deveza, L.; Hunter, D.J. Clinimetrics of Ultrasonography in Osteoarthritis: a Systematic Literature Review. *Osteoarthritis and Cartilage* 2017, 25, S241, DOI 10.1016/j.joca.2017.02.408.

158. Mathiessen, A.; Cimmino, M.A.; Hammer, H.B.; Haugen, I.K.; Iagnocco, A.; Conaghan, P.G. Imaging of osteoarthritis (OA): What is new? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2016, 30, 653-669, DOI 10.1016/j.berh.2016.09.007.

159. Nakamura, H.; Masuko, K.; Yudoh, K.; Kato, T.; Nishioka, K.; Sugihara, T.; Beppu, M. Positron emission tomography with F-18-FDG in osteoarthritic knee. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007, 15, 673-681, DOI 10.1016/j.joca.2006.12.010.
160. Temmerman, O.P.P.; Raijmakers, P.G.H.M.; Kloet, R.; Teule, G.J.J.; Heyligers, I.C.; Lammertsma, A.A. In vivo measurements of blood flow and bone metabolism in osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2013, 33, 959-963, DOI 10.1007/s00296-012-2478-1.
161. Maas, O.; Joseph, G.B.; Sommer, G.; Wild, D.; Kretzschmar, M. Association between cartilage degeneration and subchondral bone remodeling in patients with knee osteoarthritis comparing MRI and (99m)Tc-DPD-SPECT/CT. *Osteoarthritis Cartilage* 2015, 23, 1713-1720, DOI 10.1016/j.joca.2015.05.014.
162. Zarringam, D.; Saris, D.B.F.; Bekkers, J.E.J. The Value of SPECT/CT for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Cartilage* 2021, 12, 431-437, DOI 10.1177/1947603519855776.
163. Watt, F.E. Osteoarthritis biomarkers: year in review. *Osteoarthritis Cartilage* 2018, 26, 312-318, DOI 10.1016/j.joca.2017.10.016.
164. Kraus, V.B.; Burnett, B.; Coindreau, J.; Cottrell, S.; Eyre, D.; Gendreau, M.; Gardiner, J.; Garnero, P.; Hardin, J.; Henrotin, Y.; Heinegard, D.; Ko, A.; Lohmander, L.S.; Matthews, G.; Menetski, J.; Moskowitz, R.; Persiani, S.; Poole, A.R.; Rousseau, J.-.; Todman, M. Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2011, 19, 515-542, DOI 10.1016/j.joca.2010.08.019.
165. Mobasheri, A.; Bay-Jensen, A.-.; van Spil, W.E.; Larkin, J.; Levesque, M.C. Osteoarthritis Year in Review 2016: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis and Cartilage* 2017, 25, 199-208, DOI 10.1016/j.joca.2016.12.016.
166. Lotz, M.; Martel-Pelletier, J.; Christiansen, C.; Brandi, M.L.; Bruyère, O.; Chapurlat, R.; Collette, J.; Cooper, C.; Giacobelli, G.; Kanis, J.A.; Karsdal, M.A.; Kraus, V.; Lems, W.F.; Meulenbelt, I.; Pelletier, J.P.; Raynaud, J.P.; Reiter-Niesert, S.; Rizzoli, R.; Sandell, L.J.; Van Spil, W.E.; Reginster, J.Y. Republished: Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Postgrad Med J* 2014, 90, 171-178, DOI 10.1136/postgradmedj-2013-203726rep [doi].
167. Ruiz-Romero, C.; Blanco, F.J. Proteomics role in the search for improved diagnosis, prognosis and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2010, 18, 500-509, DOI 10.1016/j.joca.2009.11.012.
168. Streich, N.A.; Zimmermann, D.; Schmitt, H.; Bode, G. Biochemical markers in the diagnosis of chondral defects following anterior cruciate ligament insufficiency. *Int Orthop* 2011, 35, 1633-1637, DOI 10.1007/s00264-010-1191-5.

169. Bihlet, A.R.; Bjerre-Bastos, J.J.; Andersen, J.R.; Byrjalsen, I.; Karsdal, M.A.; Bay-Jensen, A. Clinical and biochemical factors associated with risk of total joint replacement and radiographic progression in osteoarthritis: Data from two phase III clinical trials. *Semin Arthritis Rheum* 2020, 50, 1374-1381, DOI 10.1016/j.semarthrit.2020.03.002.
170. Rousseau, J.C.; Zhu, Y.; Miossec, P.; Vignon, E.; Sandell, L.; Garnero, P.; Delmas, P.D. Serum levels of type IIA procollagen amino terminal propeptide (PIIANP) are decreased in patients with knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43, S351.
171. Bay-Jensen, A.-.; Andersen, T.L.; Tabassi, N.C.; Kristensen, P.W.; Kjaersgaard-Andersen, P.; Sandell, L.; Garnero, P.; Delaisse, J.-. Biochemical markers of type II collagen breakdown and synthesis are positioned at specific sites in human osteoarthritic knee cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008, 16, 615-623, DOI 10.1016/j.joca.2007.09.006.
172. Chen, H.-.; Shah, S.; Stabler, T.V.; Li, Y.; Kraus, V.B. Biomarkers associated with clinical phenotypes of hand osteoarthritis in a large multigenerational family: the CARRIAGE family study. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008, 16, 1054-1059, DOI 10.1016/j.joca.2007.12.010.
173. Kinoshita, M.; Kaneko, H.; Liu, L.; Sadatsuki, R.; Hada, S.; Shimura, Y.; Yusup, A.; Futami, I.; Tamura, Y.; Watada, H.; Maruyama, Y.; Kaneko, K.; Ishijima, M. Association between the Lower Serum Piicp Level and the Joint Space Narrowing on the Asymptomatic Knee Osteoarthritis in Men in Early Forties. *Osteoarthritis and Cartilage* 2014, 22, S367-S368, DOI 10.1016/j.joca.2014.02.680.
174. Daghestani, H.N.; Jordan, J.M.; Renner, J.B.; Doherty, M.; Wilson, A.G.; Kraus, V.B. Serum N-propeptide of collagen IIA (PIIANP) as a marker of radiographic osteoarthritis burden. *Plos One* 2017, 12, e0190251, DOI 10.1371/journal.pone.0190251.
175. Deberg, M.; Labasse, A.; Christgau, S.; Cloos, P.; Henriksen, D.B.; Chapelle, J.P.; Zegels, B.; Reginster, J.Y.; Henrotin, Y. New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO2) for studying oxidative-related type II collagen network degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2005, 13, 258-265, DOI 10.1016/j.joca.2004.12.002.
176. Ameye, L.G.; Deberg, M.; Oliveira, M.; Labasse, A.; Aeschlimann, J.M.; Henrotin, Y. The chemical biomarkers C2C, Coll2-1, and Coll2-1NO(2) provide complementary information on type II collagen catabolism in healthy and osteoarthritic mice. *Arthritis Rheum* 2007, 56, 3336-3346, DOI 10.1002/art.22875.
177. Henrotin, Y.; Chevalier, X.; Deberg, M.; Balblanc, J.C.; Richette, P.; Mulleman, D.; Maillet, B.; Rannou, F.; Piroth, C.; Mathieu, P.; Conrozier, T.; French Soc Rheumatology Early decrease of serum biomarkers of type II collagen degradation (Coll2-1) and joint inflammation (Coll2-1 NO2) by hyaluronic acid intra-articular injections in patients with knee osteoarthritis: A

research study part of the Biovisco study. *Journal of Orthopaedic Research* 2013, 31, 901-907, DOI 10.1002/jor.22297.

178. Joseph, G.B.; Nevitt, M.C.; McCulloch, C.E.; Neumann, J.; Lynch, J.A.; Heilmeier, U.; Lane, N.E.; Link, T.M. Associations between molecular biomarkers and MR-based cartilage composition and knee joint morphology: data from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis and Cartilage* 2018, 26, 1070-1077, DOI 10.1016/j.joca.2018.04.019.

179. Mobasher, A.; Lambert, C.; Henrotin, Y. Coll2-1 and Coll2-1NO2 as exemplars of collagen extracellular matrix turnover - biomarkers to facilitate the treatment of osteoarthritis? *Expert Rev Mol Diagn* 2019, 19, 803-812, DOI 10.1080/14737159.2019.1646641.

180. Hick, A.; Malaise, M.; Loeuille, D.; Conrozier, T.; Maugars, Y.; Pelousse, F.; Tits, C.; Henrotin, Y. Cartilage Biomarkers Coll2-1 and Coll2-1NO2 Are Associated with Knee OA MRI Features and Are Helpful in Identifying Patients at Risk of Disease Worsening. *Cartilage* 2021, 13, 1637S-1647S, DOI 10.1177/19476035211021892.

181. Hick, A.; Fonck, M.; Costes, B.; Cobraiville, E.; Pirson, S.; Garcia, L.; Labasse, A.; Vander Poelen, S.; Henrotin, Y. Serum Levels of Coll2-1, a Specific Biomarker of Cartilage Degradation, Are Not Affected by Sampling Conditions, Circadian Rhythm, and Seasonality. *Cartilage* 2021, 13, 540S-549S, DOI 10.1177/1947603519878489.

182. Dejica, V.M.; Mort, J.S.; Laverty, S.; Antoniou, J.; Zukor, D.J.; Tanzer, M.; Poole, A.R. Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage. *Arthritis Research & Therapy* 2012, 14, R113, DOI 10.1186/ar3839.

183. Tamm, A.O.; Kumm, J.; Tamm, A.; Lintrop, M.; Kukner, A.; Saluse, T.; Rips, L.; Tein, T.; Pintsaar, A.; Kukner, A. Cartilage Collagen Neopeptide C2c and Clinical Parameters in Middle-Aged Patients with Knee Problems. Correlations of Urinary Output of C2c with Cartilage Lesions, Koos Values and Functional Abilities of Lower Limb. *Osteoarthritis and Cartilage* 2014, 22, S70-S71, DOI 10.1016/j.joca.2014.02.144.

184. Poole, A.R.; Ha, N.; Bourdon, S.; Sayre, E.C.; Guermazi, A.; Cibere, J. Ability of a Urine Assay of Type II Collagen Cleavage by Collagenases to Detect Early Onset and Progression of Articular Cartilage Degeneration: Results from a Population-based Cohort Study. *J Rheumatol* 2016, 43, 1864-1870, DOI 10.3899/jrheum.150917.

185. Garnero, P.; Ayral, X.; Rousseau, J.C.; Christgau, S.; Sandell, L.J.; Dougados, M.; Delmas, P.D. Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002, 46, 2613-2624, DOI 10.1002/art.10576 [doi].

186. Kuhl, L.; Tamm, A.E.; Tamm, A.O.; Kisand, K. Cartilage collagen neopeptide C2C in urine as an integrative diagnostic marker for early knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage open* 2020, 2, 100096, DOI 10.1016/j.ocarto.2020.100096.
187. Kumm, J.; Tamm, A.; Veske, K.; Lintrop, M.; Tamm, A. Associations between cartilage oligomeric matrix protein and several articular tissues in early knee joint osteoarthritis. *Rheumatology* 2006, 45, 1308-1309, DOI 10.1093/rheumatology/kei271.
188. Tseng, S.; Reddi, A.H.; Di Cesare, P.E. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP): A Biomarker of Arthritis. *Biomarker Insights* 2009, 4, 33-44.
189. Daniel Arellano, R.; Sarai Aguilar, L.; Arguello, R.; Hernandez, F.; Francisco Gonzalez, F.; Moran, J. Cartilage Oligomeric Matrix Protein Levels in Synovial Fluid in Patients With Primary Knee Osteoarthritis and Healthy Controls: A Preliminary Comparative Analysis With Serum Cartilage Oligomeric Matrix Protein. *Archives of Rheumatology* 2017, 32, 189-196, DOI 10.5606/ArchRheumatol.2017.6220.
190. Lin, R.; Xue, J.; Qiu, J. Significance of Expression of miR-365, Cartilage Oligomeric Matrix Protein and Inflammatory Factors in Knee Osteoarthritis. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 2020, 10, 1065-1069, DOI 10.1166/jbt.2020.2366.
191. Liem, Y.; Judge, A.; Kirwan, J.; Ourradi, K.; Li, Y.; Sharif, M. Multivariable logistic and linear regression models for identification of clinically useful biomarkers for osteoarthritis. *Scientific Reports* 2020, 10, DOI 10.1038/s41598-020-68077-0.
192. Henrotin, Y. Osteoarthritis in year 2021: biochemical markers. *Osteoarthritis and Cartilage* 2022, 30, 237-248, DOI 10.1016/j.joca.2021.11.001.
193. Attur, M.; Belitskaya-Levy, I.; Oh, C.; Krasnokutsky, S.; Greenberg, J.; Samuels, J.; Smiles, S.; Lee, S.; Patel, J.; Al-Mussawir, H.; McDaniel, G.; Kraus, V.B.; Abramson, S.B. Increased interleukin-1beta gene expression in peripheral blood leukocytes is associated with increased pain and predicts risk for progression of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2011, 63, 1908-1917, DOI 10.1002/art.30360 [doi].
194. Attur, M.; Statnikov, A.; Samuels, J.; Li, Z.; Alekseyenko, A.V.; Greenberg, J.D.; Krasnokutsky, S.; Rybak, L.; Lu, Q.A.; Todd, J.; Zhou, H.; Jordan, J.M.; Kraus, V.B.; Aliferis, C.F.; Abramson, S.B. Plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist (IL1Ra) predict radiographic progression of symptomatic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015, 23, 1915-1924, DOI 10.1016/j.joca.2015.08.006.
195. Mabey, T.; Honsawek, S.; Tanavalee, A.; Yuktanandana, P.; Wilairatana, V.; Poovorawan, Y. Plasma and synovial fluid inflammatory cytokine profiles in primary knee osteoarthritis. *Biomarkers* 2016, 21, 639-644, DOI 10.3109/1354750X.2016.1171907.

196. Rajandran, S.N.; Ma, C.A.; Tan, J.R.; Liu, J.; Wong, S.B.S.; Leung, Y. Exploring the Association of Innate Immunity Biomarkers With MRI Features in Both Early and Late Stages Osteoarthritis. *Frontiers in Medicine* 2020, 7, 554669, DOI 10.3389/fmed.2020.554669.

197. Mehana, E.E.; Khafaga, A.F.; El-Blehi, S.S. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life Sci* 2019, 234, 116786, DOI 10.1016/j.lfs.2019.116786.

198. Watt, F.E.; Hamid, B.; Garriga, C.; Judge, A.; Hrusicka, R.; Custers, R.J.H.; Jansen, M.P.; Lafeber, F.P.; Mastbergen, S.C.; Vincent, T.L. The molecular profile of synovial fluid changes upon joint distraction and is associated with clinical response in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2020, 28, 324-333, DOI 10.1016/j.joca.2019.12.005.

199. Timur, U.T.; Jahr, H.; Anderson, J.; Green, D.C.; Emans, P.J.; Smagul, A.; van Rhijn, L.W.; Peffers, M.J.; Welting, T.J.M. Identification of tissue-dependent proteins in knee OA synovial fluid. *Osteoarthritis and Cartilage* 2021, 29, 124-133, DOI 10.1016/j.joca.2020.09.005.

200. Lisignoli, G.; Toneguzzi, S.; Piacentini, A.; Cristino, S.; Grassi, F.; Cavallo, C.; Facchini, A. CXCL12 (SDF-1) and CXCL13 (BCA-1) chemokines significantly induce proliferation and collagen type I expression in osteoblasts from osteoarthritis patients. *J Cell Physiol* 2006, 206, 78-85, DOI 10.1002/jcp.20435.

201. Xu, Q.; Sun, X.; Shang, X.; Jiang, H. Association of CXCL12 Levels in Synovial Fluid With the Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis. *J Invest Med* 2012, 60, 898-901.

202. He, W.; Wang, M.; Wang, Y.; Wang, Q.; Luo, B. Plasma and Synovial Fluid CXCL12 Levels Are Correlated With Disease Severity in Patients With Knee Osteoarthritis. *J Arthroplasty* 2016, 31, 373-377, DOI 10.1016/j.arth.2015.08.018.

203. Lu, W.; Shi, J.; Zhang, J.; Lv, Z.; Guo, F.; Huang, H.; Zhu, W.; Chen, A. CXCL12/CXCR4 Axis Regulates Aggrecanase Activation and Cartilage Degradation in a Post-Traumatic Osteoarthritis Rat Model. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, 17, 1522, DOI 10.3390/ijms17101522.

204. Miller, R.E.; Tran, P.B.; Das, R.; Ghoreishi-Haack, N.; Ren, D.; Miller, R.J.; Malfait, A. CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109, 20602-20607, DOI 10.1073/pnas.1209294110.

205. Monibi, F.; Roller, B.L.; Stoker, A.; Garner, B.; Bal, S.; Cook, J.L. Identification of Synovial Fluid Biomarkers for Knee Osteoarthritis and Correlation with Radiographic Assessment. *Journal of Knee Surgery* 2016, 29, 242-247, DOI 10.1055/s-0035-1549022.

206. Sasaki, E.; Tsuda, E.; Yamamoto, Y.; Iwasaki, K.; Inoue, R.; Takahashi, I.; Sawada, K.; Fujita, H.; Umeda, T.; Nakaji, S.; Ishibashi, Y. Serum hyaluronan levels increase with the total

number of osteoarthritic joints and are strongly associated with the presence of knee and finger osteoarthritis. *Int Orthop* 2013, 37, 925-930, DOI 10.1007/s00264-013-1849-x.

207. Singh, S.; Kumar, D.; Sharma, N.R. Role of Hyaluronic Acid in Early Diagnosis of Knee Osteoarthritis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014, 8, LC4-LC7, DOI 10.7860/JCDR/2014/11732.5342.

208. Sasaki, E.; Tsuda, E.; Yamamoto, Y.; Maeda, S.; Inoue, R.; Chiba, D.; Fujita, H.; Takahashi, I.; Umeda, T.; Nakaji, S.; Ishibashi, Y. Serum hyaluronic acid concentration predicts the progression of joint space narrowing in normal knees and established knee osteoarthritis - a five-year prospective cohort study. *Arthritis Research & Therapy* 2015, 17, 283, DOI 10.1186/s13075-015-0793-0.

209. Jiao, Q.; Wei, L.; Chen, C.; Li, P.; Wang, X.; Li, Y.; Guo, L.; Zhang, C.; Wei, X. Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronic acid are sensitive serum biomarkers for early cartilage lesions in the knee joint. *Biomarkers* 2016, 21, 146-151, DOI 10.3109/1354750X.2015.1118547.

210. Bannuru, R.R.; Osani, M.C.; Vaysbrot, E.E.; Arden, N.K.; Bennell, K.; Bierma-Zeinstra, S.M.A.; Kraus, V.B.; Lohmander, L.S.; Abbott, J.H.; Bhandari, M.; Blanco, F.J.; Espinosa, R.; Haugen, I.K.; Lin, J.; Mandl, L.A.; Moilanen, E.; Nakamura, N.; Snyder-Mackler, L.; Trojian, T.; Underwood, M.; McAlindon, T.E. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2019, 27, 1578-1589, DOI 10.1016/j.joca.2019.06.011.

211. Murphy, L.B.; Brady, T.J.; Boring, M.A.; Theis, K.A.; Barbour, K.E.; Qin, J.; Helmick, C.G. Self-Management Education Participation Among US Adults With Arthritis: Who's Attending? *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2017, 69, 1322-1330, DOI 10.1002/acr.23129.

212. Sinclair, J.; Lynch, H.; Chockalingam, N.; Taylor, P.J. Effects of Obesity on Medial Tibiofemoral Cartilage Mechanics in Females-An Exploration Using Musculoskeletal Simulation and Probabilistic Cartilage Failure Modelling. *Life (Basel, Switzerland)* 2023, 13, DOI 10.3390/life13020270.

213. Joseph, G.B.; McCulloch, C.E.; Nevitt, M.C.; Lynch, J.; Lane, N.E.; Pedroia, V.; Majumdar, S.; Link, T.M. The effect of interactions between BMI and sustained depressive symptoms on knee osteoarthritis over 4 years: data from the osteoarthritis initiative. *Bmc Musculoskeletal Disorders* 2023, 24, 27, DOI 10.1186/s12891-023-06132-3.

214. Wang, W.; Niu, Y.; Jia, Q. Physical therapy as a promising treatment for osteoarthritis: A narrative review. *Frontiers in Physiology* 2022, 13, 935418, DOI 10.3389/fphys.2022.1011407.

215. Rhon, D.,I.; Kim, M.; Asche, C.,V.; Allison, S.C.; Allen, C.S.; Deyle, G.D. Cost-effectiveness of Physical Therapy vs Intra-articular Glucocorticoid Injection for Knee Osteoarthritis A

Secondary Analysis From a Randomized Clinical Trial. *Jama Network Open* 2022, 5, e2142709, DOI 10.1001/jamanetworkopen.2021.42709.

216. Kalo, K.; Niederer, D.; Schmitt, M.; Vogt, L. Acute effects of a single bout of exercise therapy on knee acoustic emissions in patients with osteoarthritis: a double-blinded, randomized controlled crossover trial. *Bmc Musculoskeletal Disorders* 2022, 23, 657, DOI 10.1186/s12891-022-05616-y.

217. Jarecki, J.; Polkowska, I.; Kazimierzczak, W.; Wojciak, M.; Sowa, I.; Dresler, S.; Blicharski, T. Assessment of the Impact of Physical Activity on the Musculoskeletal System in Early Degenerative Knee Joint Lesions in an Animal Model. *International journal of molecular sciences* 2023, 24, DOI 10.3390/ijms24043540.

218. Lopes, D.G.; Costa, D.; Cruz, E.B.; Mendonca, N.; Henriques, A.R.; Branco, J.; Canhao, H.; Rodrigues, A.M. Association of physical activity with physical function and quality of life in people with hip and knee osteoarthritis: longitudinal analysis of a population-based cohort. *Arthritis research & therapy* 2023, 25, 14, DOI 10.1186/s13075-023-02996-x.

219. Hao, X.; Zhang, J.; Shang, X.; Sun, K.; Zhou, J.; Liu, J.; Chi, R.; Xu, T. Exercise modifies the disease- relevant gut microbial shifts in post- traumatic osteoarthritis rats. *Bone & Joint Research* 2022, 11, 214-225, DOI 10.1302/2046-3758.114.BJR-2021-0192.R1.

220. Smith, T.; Kirby, E.; Davies, L. A systematic review to determine the optimal type and dosage of land-based exercises for treating knee osteoarthritis. *Physical Therapy Reviews* 2014, 19, 105-113, DOI 10.1179/1743288X13Y.0000000108.

221. Kolasinski 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee (vol 72, pg 149, 2020). *Arthritis & Rheumatology* 2021, 73, 799.

222. Callahan, L.F.; Cleveland, R.J.; Altpeter, M.; Hackney, B. Evaluation of Tai Chi Program Effectiveness for People with Arthritis in the Community: A Randomized Controlled Trial. *J Aging Phys Act* 2016, 24, 101-110, DOI 10.1123/japa.2014-0211.

223. Dong, R.; Wu, Y.; Xu, S.; Zhang, L.; Ying, J.; Jin, H.; Wang, P.; Xiao, L.; Tong, P. Is aquatic exercise more effective than land-based exercise for knee osteoarthritis? *Medicine (Baltimore)* 2018, 97, e13823, DOI 10.1097/MD.00000000000013823.

224. Luan, L.; El-Ansary, D.; Adams, R.; Wu, S.; Han, J. Knee osteoarthritis pain and stretching exercises: a systematic review and meta-analysis. *Physiotherapy* 2022, 114, 16-29, DOI 10.1016/j.physio.2021.10.001.

225. Wang, Y.B.; Shivappa, N.; Hebert, J.R.; Page, A.J.; Gill, T.K.; Melaku, Y.A. Association between Dietary Inflammatory Index, Dietary Patterns, Plant-Based Dietary Index and the Risk of Obesity. *Nutrients* 2021, 13, 1536, DOI 10.3390/nu13051536.

226. Jungmann, P.M.; Kraus, M.S.; Alizai, H.; Nardo, L.; Baum, T.; Nevitt, M.C.; Mcculloch, C.E.; Joseph, G.B.; Lynch, J.A.; Link, T.M. Association of Metabolic Risk Factors With Cartilage Degradation Assessed by T2 Relaxation Time at the Knee: Data From the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care & Research* 2013, 65, 1942-1950, DOI 10.1002/acr.22093.
227. Pitaraki, E.E. The role of Mediterranean diet and its components on the progress of osteoarthritis. *J Frailty Sarcopenia Falls* 2017, 2, 45-52.
228. Sadeghi, A.; Zarrinjooiee, G.; Mousavi, S.N.; Sabet, S.A.; Jalili, N. Effects of a Mediterranean Diet Compared with the Low-Fat Diet on Patients with Knee Osteoarthritis: A Randomized Feeding Trial. *Int J Clin Pract* 2022, 2022, 7275192, DOI 10.1155/2022/7275192.
229. Strath, L.J.; Jones, C.D.; Philip George, A.; Lukens, S.L.; Morrison, S.A.; Soleymani, T.; Locher, J.L.; Gower, B.A.; Sorge, R.E. The Effect of Low-Carbohydrate and Low-Fat Diets on Pain in Individuals with Knee Osteoarthritis. *Pain Med* 2020, 21, 150-160, DOI 10.1093/pm/pnz022.
230. Colletti, A.; Cicero, A.F.G. Nutraceutical Approach to Chronic Osteoarthritis: From Molecular Research to Clinical Evidence. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 12920, DOI 10.3390/ijms222312920.
231. Simental-Mendia, M.; Sanchez-Garcia, A.; Vilchez-Cavazos, F.; Acosta-Olivo, C.A.; Pena-Martinez, V.M.; Simental-Mendia, L.E. Effect of glucosamine and chondroitin sulfate in symptomatic knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Rheumatol Int* 2018, 38, 1413-1428, DOI 10.1007/s00296-018-4077-2.
232. Bhathal, A.; Spryszak, M.; Louizos, C.; Frankel, G. Glucosamine and chondroitin use in canines for osteoarthritis: A review. *Open Veterinary Journal* 2017, 7, 36-49, DOI 10.4314/ovj.v7i1.6.
233. Cheleschi, S.; Fioravanti, A.; De Palma, A.; Corallo, C.; Franci, D.; Volpi, N.; Bedogni, G.; Giannotti, S.; Giordano, N. Methylsulfonylmethane and mobilee prevent negative effect of IL-1 beta in human chondrocyte cultures via NF-kappa B signaling pathway (vol 65, pg 129, 2018). *Int Immunopharmacol* 2019, 74, 105775, DOI 10.1016/j.intimp.2019.105775.
234. Joung, Y.H.; Darvin, P.; Kang, D.Y.; Nipin, S.P.; Byun, H.J.; Lee, C.; Lee, H.K.; Yang, Y.M. Methylsulfonylmethane Inhibits RANKL-Induced Osteoclastogenesis in BMMs by Suppressing NF-kappa B and STAT3 Activities. *Plos One* 2016, 11, e0159891, DOI 10.1371/journal.pone.0159891.
235. D'Altilio, M.; Peal, A.; Alvey, M.; Simms, C.; Curtsinger, A.; Gupta, R.C.; Canerdy, T.D.; Goad, J.T.; Bagchi, M.; Bagchi, D. Therapeutic efficacy and safety of undenatured type II collagen singly or in combination with glucosamine and chondroitin in arthritic dogs. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2007, 17, 189-196, DOI 10.1080/15376510600910469.

236. Isaka, S.; Somova, A.; Nakamura, S.; Naito, K.; Nozawa, M.; Inoue, N.; Sugihara, F.; Nagaoka, I.; Kaneko, K. Evaluation of the effect of oral administration of collagen peptides on an experimental rat osteoarthritis model. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2017, 13, 2699-2706, DOI 10.3892/etm.2017.4310.

237. Asari, A.; Kanemitsu, T.; Kurihara, H. Oral Administration of High Molecular Weight Hyaluronan (900 kDa) Controls Immune System via Toll-like Receptor 4 in the Intestinal Epithelium. *J Biol Chem* 2010, 285, 24751-24758, DOI 10.1074/jbc.M110.104950.

238. Chang, C.; Hsieh, M.; Liao, S.; Chen, Y.; Cheng, C.; Huang, P.; Lin, Y.; Chen, C. Hyaluronan regulates PPAR gamma and inflammatory responses in IL-1 beta-stimulated human chondrosarcoma cells, a model for osteoarthritis. *Carbohydr Polym* 2012, 90, 1168-1175, DOI 10.1016/j.carbpol.2012.06.071.

239. Chang, Z.; Huo, L.; Li, P.; Wu, Y.; Zhang, P. Ascorbic acid provides protection for human chondrocytes against oxidative stress. *Molecular Medicine Reports* 2015, 12, 7086-7092, DOI 10.3892/mmr.2015.4231.

240. Li, H.; Zeng, C.; Wei, J.; Yang, T.; Gao, S.; Li, Y.; Lei, G. Associations between dietary antioxidants intake and radiographic knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2016, 35, 1585-1592, DOI 10.1007/s10067-016-3177-1.

241. Kimmatkar, N.; Thawani, V.; Hingorani, L.; Khiyani, R. Efficacy and tolerability of *Boswellia serrata* extract treatment of osteoarthritis of knee - A randomized double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine* 2003, 10, 3-7, DOI 10.1078/094471103321648593.

242. Sengupta, K.; Krishnaraju, A.V.; Vishal, A.A.; Mishra, A.; Trimurtulu, G.; Sarma, K.V.S.; Raychaudhuri, S.K.; Raychaudhuri, S.P. Comparative Efficacy and Tolerability of 5-Loxin (R) and Aflapin (R) Against Osteoarthritis of the Knee: A Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Study. *International Journal of Medical Sciences* 2010, 7, 366-377.

243. Vishal, A.A.; Mishra, A.; Raychaudhuri, S.P. A Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Study Evaluates the Early Efficacy of Aflapin (R) in Subjects with Osteoarthritis of Knee. *International Journal of Medical Sciences* 2011, 8, 615-622, DOI 10.7150/ijms.8.615.

244. Schnitzer, T.J.; Pelletier, J.; Haselwood, D.M.; Ellison, W.T.; Ervin, J.E.; Gordon, R.D.; Lisse, J.R.; Archambault, W.T.; Sampson, A.R.; Fezatte, H.B.; Phillips, S.B.; Bernstein, J.E. Civamide Cream 0.075% in Patients with Osteoarthritis of the Knee: A 12-Week Randomized Controlled Clinical Trial with a Longterm Extension. *J Rheumatol* 2012, 39, 610-620, DOI 10.3899/jrheum.110192.

245. Kuptniratsaikul, V.; Dajpratham, P.; Taechaarpornkul, W.; Buntragulpoontawe, M.; Lukkanapichonchut, P.; Chootip, C.; Saengsuwan, J.; Tantayakom, K.; Laongpech, S. Efficacy and

safety of *Curcuma domestica* extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: a multicenter study. *Clinical Interventions in Aging* 2014, 9, 451-458, DOI 10.2147/CIA.S58535.

246. Zeng, L.; Yu, G.; Hao, W.; Yang, K.; Chen, H. The efficacy and safety of *Curcuma longa* extract and curcumin supplements on osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Biosci Rep* 2021, 41, BSR20210817, DOI 10.1042/BSR20210817.

247. Rondanelli, M.; Riva, A.; Morazzoni, P.; Allegrini, P.; Faliva, M.A.; Naso, M.; Miccono, A.; Peroni, G.; Degli Agosti, I.; Perna, S. The effect and safety of highly standardized Ginger (*Zingiber officinale*) and Echinacea (*Echinacea angustifolia*) extract supplementation on inflammation and chronic pain in NSAIDs poor responders. A pilot study in subjects with knee arthrosis. *Natural Product Research* 2017, 31, 1309-1313, DOI 10.1080/14786419.2016.1236097.

248. Hashempur, M.H.; Sadrneshin, S.; Mosavat, S.H.; Ashraf, A. Green tea (*Camellia sinensis*) for patients with knee osteoarthritis: A randomized open-label active-controlled clinical trial. *Clinical Nutrition* 2018, 37, 85-90, DOI 10.1016/j.clnu.2016.12.004.

249. Jacquet, A.; Girodet, P.; Pariente, A.; Forest, K.; Mallet, L.; Moore, N. Phytalgic (R), a food supplement, vs placebo in patients with osteoarthritis of the knee or hip: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *Arthritis Research & Therapy* 2009, 11, R192, DOI 10.1186/ar2891.

250. Maheu, E.; Cadet, C.; Marty, M.; Moyse, D.; Kerloch, I.; Coste, P.; Dougados, M.; Mazieres, B.; Spector, T.D.; Halhol, H.; Grouin, J.; Lequesne, M. Randomised, controlled trial of avocado-soybean unsaponifiable (Piascledine) effect on structure modification in hip osteoarthritis: the ERADIAS study. *Ann Rheum Dis* 2014, 73, 376-384, DOI 10.1136/annrheumdis-2012-202485.

251. Shamsi, S.; Al-Shehri, A.; Al Amoudi, K.O.; Khan, S. Effectiveness of Physiotherapy Management in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Indian Journal of Medical Specialities* 2020, 11, 185-191, DOI 10.4103/INJMS.INJMS_96_20.

252. Formenton, M.R.; Amador Pereira, M.A.; Fantoni, D.T. Small Animal Massage Therapy: A Brief Review and Relevant Observations. *Topics in Companion Animal Medicine* 2017, 32, 139-145, DOI 10.1053/j.tcam.2017.10.001.

253. Perlman, A.; Fogerite, S.G.; Glass, O.; Bechard, E.; Ali, A.; Njike, V.Y.; Pieper, C.; Dmitrieva, N.O.; Luciano, A.; Rosenberger, L.; Keever, T.; Milak, C.; Finkelstein, E.A.; Mahon, G.; Campanile, G.; Cotter, A.; Katz, D.L. Efficacy and Safety of Massage for Osteoarthritis of the Knee: a Randomized Clinical Trial. *Journal of General Internal Medicine* 2019, 34, 379-386, DOI 10.1007/s11606-018-4763-5.

254. Qin, S.; Chi, Z.; Xiao, Y.; Zhu, D.; Zhong, G.; Xu, W.; Ouyang, X.; Li, J.; Cheng, P.; Yu, T.; Li, H.; Jiao, L. Effectiveness and safety of massage for knee osteoarthritis A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine* 2020, 99, e22853, DOI 10.1097/MD.00000000000022853.
255. Xu, J.; Wu, B.; Xie, S.; Wu, G.; Zhang, H.; Fu, Y.; Guo, G. Effectiveness and safety of massage for chronic pain in patients with knee osteoarthritis A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine* 2022, 101, e28533, DOI 10.1097/MD.00000000000028533.
256. Chen, H.; Wang, Z.; Zhang, X.; Sun, M. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Rehabil* 2022, 36, 1153-1169, DOI 10.1177/02692155221097035.
257. Zeng, C.; Li, H.; Yang, T.; Deng, Z.-.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Ding, X.; Lei, G.-. Effectiveness of continuous and pulsed ultrasound for the management of knee osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2014, 22, 1090-1099, DOI 10.1016/j.joca.2014.06.028.
258. Rothenberg, J.B.; Jayaram, P.; Naqvi, U.; Gober, J.; Malanga, G.A. The Role of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Cartilage Healing in Knee Osteoarthritis: A Review. *Pm&R* 2017, 9, 1268-1277, DOI 10.1016/j.pmrj.2017.05.008.
259. Yang, Q.; Liu, L.; Ge, S.; Wang, H.; Yang, X.; Zhou, X. Low-Intensity Ultrasound-Induced Anti-inflammatory Effects Are Mediated by Several New Mechanisms Including Gene Induction, Immunosuppressor Cell Promotion, and Enhancement of Exosome Biogenesis and Docking. *J Am Coll Cardiol* 2018, 72, C241, DOI 10.1016/j.jacc.2018.08.1049.
260. Wu, Y.; Zhu, S.; Lv, Z.; Kan, S.; Wu, Q.; Song, W.; Ning, G.; Feng, S. Effects of therapeutic ultrasound for knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rehabil* 2019, 33, 1863-1875, DOI 10.1177/0269215519866494.
261. Hagiwara, S.; Iwasaka, H.; Okuda, K.; Noguchi, T. GaAlAs (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. *Lasers Surg Med* 2007, 39, 797-802, DOI 10.1002/lsm.20583.
262. Chow, R.; Armati, P.; Laakso, E.; Bjordal, J.M.; Baxter, G.D. Inhibitory Effects of Laser Irradiation on Peripheral Mammalian Nerves and Relevance to Analgesic Effects: A Systematic Review. *Photomedicine and Laser Surgery* 2011, 29, 365-381, DOI 10.1089/pho.2010.2928.
263. Barale, L.; Monticelli, P.; Raviola, M.; Adami, C. Preliminary clinical experience of low-level laser therapy for the treatment of canine osteoarthritis-associated pain: A retrospective investigation on 17 dogs. *Open Veterinary Journal* 2020, 10, 116-119, DOI 10.4314/ovj.v10i1.16.

264. Koevska, V.; Nikolic-Dimitrova, E.; Mitrevska, B.; Gjerakaroska-Savevska, C.; Gocevska, M.; Kalcovska, B. High Intensity Laser Treatment of Osteoarthritis Knee. *Aging Clinical and Experimental Research* 2022, 34, S369.
265. Barale, L.; Monticelli, P.; Adami, C. Effects of low-level laser therapy on impaired mobility in dogs with naturally occurring osteoarthritis. *Veterinary Medicine and Science*, DOI 10.1002/vms3.997.
266. Khumaidi, M.A.; Paturusi, I.; Nurdwinuringtyas, N.; Islam, A.A.; Gunawan, W.B.; Nurkolis, F.; Taslim, N.A. Is low-level laser therapy effective for patients with knee joint osteoarthritis? implications and strategies to promote laser therapy usage. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2022, 10, 1089035, DOI 10.3389/fbioe.2022.1089035.
267. Zhao, Z.; Ji, H.; Jing, R.; Liu, C.; Wang, M.; Zhai, L.; Bai, X.; Xing, G. Extracorporeal shock-wave therapy reduces progression of knee osteoarthritis in rabbits by reducing nitric oxide level and chondrocyte apoptosis. *Arch Orthop Trauma Surg* 2012, 132, 1547-1553, DOI 10.1007/s00402-012-1586-4.
268. Souza, A.N.A.; Ferreira, M.P.; Hagen, S.C.F.; Patricio, G.C.F.; Matera, J.M. Radial shock wave therapy in dogs with hip osteoarthritis. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 2016, 29, 108-114, DOI 10.3415/VCOT-15-01-0017.
269. Wang, C.; Cheng, J.; Chou, W.; Hsu, S.; Chen, J.; Huang, C. Changes of articular cartilage and subchondral bone after extracorporeal shockwave therapy in osteoarthritis of the knee. *International Journal of Medical Sciences* 2017, 14, 213-223, DOI 10.7150/ijms.17469.
270. Zhong, Z.; Liu, B.; Liu, G.; Chen, J.; Li, Y.; Chen, J.; Liu, X.; Hu, Y. A Randomized Controlled Trial on the Effects of Low-Dose Extracorporeal Shockwave Therapy in Patients With Knee Osteoarthritis. *Arch Phys Med Rehabil* 2019, 100, 1695-1702, DOI 10.1016/j.apmr.2019.04.020.
271. Chen, L.; Ye, L.; Liu, H.; Yang, P.; Yang, B. Extracorporeal Shock Wave Therapy for the Treatment of Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Research International* 2020, 2020, 1907821, DOI 10.1155/2020/1907821.
272. DeSantana, J.M.; da Silva, L.F.S.; Sluka, K.A. Cholecystokinin receptors mediate tolerance to the analgesic effect of TENS in arthritic rats. *Pain* 2010, 148, 84-93, DOI 10.1016/j.pain.2009.10.011.
273. Aguilera Eguia, R.A.; Ibacache Palma, A. Transcutaneous electrostimulation for osteoarthritis of the knee: CAT. *Medwave* 2013, 13, e5789, DOI 10.5867/medwave.2013.08.5789.

274. Wu, Y.; Zhu, F.; Chen, W.; Zhang, M. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) in people with knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Clin Rehabil* 2022, 36, 472-485, DOI 10.1177/02692155211065636.

275. Reichenbach, S.; Jueni, P.; Hincapie, C.A.; Schneider, C.; Meli, D.N.; Schuerch, R.; Streit, S.; Lucas, C.; Mebes, C.; Rutjes, A.W.S.; da Costa, B.R. Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on knee pain and physical function in patients with symptomatic knee osteoarthritis: the ERELKA randomized clinical trial. *Osteoarthritis and Cartilage* 2022, 30, 426-435, DOI 10.1016/j.joca.2021.10.015.

276. Vaz, M.A.; Baroni, B.M.; Geremia, J.M.; Lanferdini, F.J.; Mayer, A.; Arampatzis, A.; Herzog, W. Neuromuscular electrical stimulation (NMES) reduces structural and functional losses of quadriceps muscle and improves health status in patients with knee osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research* 2013, 31, 511-516, DOI 10.1002/jor.22264.

277. Devrimsel, G.; Metin, Y.; Beyazal, M.S. Short-term effects of neuromuscular electrical stimulation and ultrasound therapies on muscle architecture and functional capacity in knee osteoarthritis: a randomized study. *Clin Rehabil* 2019, 33, 418-427, DOI 10.1177/0269215518817807.

278. Burgess, L.C.; Taylor, P.; Wainwright, T.W.; Swain, I.D. Lab-based feasibility and acceptability of neuromuscular electrical stimulation in hip osteoarthritis rehabilitation. *Journal of Rehabilitation and Assistive Technologies Engineering* 2021, 8, 2055668320980613, DOI 10.1177/2055668320980613.

279. Hyytiainen, H.K.; Bostrom, A.; Asplund, K.; Bergh, A. A Systematic Review of Complementary and Alternative Veterinary Medicine in Sport and Companion Animals: Electrotherapy. *Animals* 2023, 13, 64, DOI 10.3390/ani13010064.

280. Foster, N.E.; Thomas, E.; Barlas, P.; Hill, J.C.; Young, J.; Mason, E.; Hay, E.M. Acupuncture as an adjunct to exercise based physiotherapy for osteoarthritis of the knee: Randomised controlled trial. *Rheumatology* 2008, 47, II2.

281. Corbett, M.S.; Rice, S.J.C.; Madurasinghe, V.; Slack, R.; Fayter, D.A.; Harden, M.; Sutton, A.J.; MacPherson, H.; Woolacott, N.F. Acupuncture and other physical treatments for the relief of pain due to osteoarthritis of the knee: network meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013, 21, 1290-1298, DOI 10.1016/j.joca.2013.05.007.

282. Jia, P.; Liu, J.; Li, L.; Luo, Y.; Li, Y.; Zhao, L.; Liang, F.; Liu, Z.; Zou, K.; Tang, L.; Sun, X. Acupuncture for knee osteoarthritis with sensitized acupoints: results from a pilot, feasibility randomized controlled trial. *Pilot and Feasibility Studies* 2020, 6, 144, DOI 10.1186/s40814-020-00687-x.

283. Tu, J.; Yang, J.; Shi, G.; Yu, Z.; Li, J.; Lin, L.; Du, Y.; Yu, X.; Hu, H.; Liu, Z.; Jia, C.; Wang, L.; Zhao, J.; Wang, J.; Wang, T.; Wang, Y.; Wang, T.; Zhang, N.; Zou, X.; Wang, Y.; Shao, J.; Liu, C. Efficacy of Intensive Acupuncture Versus Sham Acupuncture in Knee Osteoarthritis: A Randomized Controlled Trial. *Arthritis & Rheumatology* 2021, 73, 448-458, DOI 10.1002/art.41584.
284. Zeng, C.; Wei, J.; Persson, M.S.M.; Sarmanova, A.; Doherty, M.; Xie, D.; Wang, Y.; Li, X.; Li, J.; Long, H.; Lei, G.; Zhang, W. Relative efficacy and safety of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *Br J Sports Med* 2018, 52, 642+, DOI 10.1136/bjsports-2017-098043.
285. Bariguan Revel, F.; Fayet, M.; Hagen, M. Topical Diclofenac, an Efficacious Treatment for Osteoarthritis: A Narrative Review. *Rheumatology and Therapy* , DOI 10.1007/s40744-020-00196-6.
286. Hawthorn, C. A Narrative Review: The Use of the Topical NSAID Ibuprofen for the Treatment of Knee Osteoarthritis. Supporting Clinician Decision-Making in the First-Line Treatment of Osteoarthritis. *Rehabilitation Process and Outcome* 2020, 9, 1179572720914945, DOI 10.1177/1179572720914945.
287. Zhang, W.; Doherty, M.; Leeb, B.F.; Alekseeva, L.; Arden, N.K.; Bijlsma, J.W.; Dincer, F.; Dziedzic, K.; Hauselmann, H.J.; Herrero-Beaumont, G.; Kaklamanis, P.; Lohmander, S.; Maheu, E.; Martin-Mola, E.; Pavelka, K.; Punzi, L.; Reiter, S.; Sautner, J.; Smolen, J.; Verbruggen, G.; Zimmermann-Gorska, I. EULAR evidence based recommendations for the management of hand osteoarthritis: report of a task force of the EULAR standing committee for international clinical studies including therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2007, 66, 377-388, DOI 10.1136/ard.2006.062091.
288. Bruyere, O.; Cooper, C.; Pelletier, J.; Maheu, E.; Rannou, F.; Branco, J.; Brandi, M.L.; Kanis, J.A.; Altman, R.D.; Hochberg, M.C.; Martel-Pelletier, J.; Reginster, J. A consensus statement on the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) algorithm for the management of knee osteoarthritis-From evidence-based medicine to the real-life setting. *Semin Arthritis Rheum* 2016, 45, S3-S11, DOI 10.1016/j.semarthrit.2015.11.010.
289. Honvo, G.; Leclercq, V.; Geerinck, A.; Thomas, T.; Veronese, N.; Charles, A.; Rabenda, V.; Beaudart, C.; Cooper, C.; Reginster, J.; Bruyere, O. Safety of Topical Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Osteoarthritis: Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs Aging* 2019, 36, 45-64, DOI 10.1007/s40266-019-00661-0.

290. Rafanan, B.S., Jr.; Valdecanas, B.F.; Lim, B.P.; Malairungsakul, A.; Tassanawipas, W.; Chen Shiyi; Tse, L.F.; Luong, T.K. Consensus recommendations for managing osteoarthritic pain with topical NSAIDs in Asia-Pacific. *Pain Management* 2018, 8, 115-128, DOI 10.2217/pmt-2017-0047.

291. Yancey, J.R.; Gill, C. Topical NSAIDs for Chronic Musculoskeletal Pain in Adults. *Am Fam Physician* 2017, 96, 573-574.

292. Wang, Y.; Fan, M.; Wang, H.; You, Y.; Wei, C.; Liu, M.; Luo, A.; Xu, X.; Duan, X. Relative safety and efficacy of topical and oral NSAIDs in the treatment of osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 2022, 101, e30354, DOI 10.1097/MD.00000000000030354.

293. Brown, G.A. AAOS Clinical Practice Guideline: Treatment of Osteoarthritis of the Knee: Evidence-Based Guideline, 2nd Edition. *J Am Acad Orthop Surg* 2013, 21, 577-579, DOI 10.5435/00124635-201309020-00009.

294. da Costa, B.R.; Reichenbach, S.; Keller, N.; Nartey, L.; Wandel, S.; Juni, P.; Trelle, S. Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis: a network meta-analysis. *Lancet* 2017, 390, E21-E33, DOI 10.1016/S0140-6736(17)31744-0.

295. Leopoldino, A.O.; Machado, G.C.; Ferreira, P.H.; Pinheiro, M.B.; Day, R.; McLachlan, A.J.; Hunter, D.J.; Ferreira, M.L. Paracetamol versus placebo for knee and hip osteoarthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019, CD013273, DOI 10.1002/14651858.CD013273.

296. Curtis, H.J.; Croker, R.; Walker, A.J.; Richards, G.C.; Quinlan, J.; Goldacre, B. Opioid prescribing trends and geographical variation in England, 1998-2018: a retrospective database study. *Lancet Psychiatry* 2019, 6, 140-150, DOI 10.1016/S2215-0366(18)30471-1.

297. Huizinga, J.; Stanley, E.; Song, S.; Sullivan, J.; Katz, J.; Losina, E. Direct Medical and Societal Cost of Opioid Use in Symptomatic Knee Osteoarthritis Patients in the United States. *Arthritis & Rheumatology* 2019, 71.

298. Abdel Shaheed, C.; Awal, W.; Zhang, G.; Gilbert, S.; Gallacher, D.; McLachlan, A.; O Day, R.; Ferreira, G.; Jones, C.; Ahedi, H.; Tamrakar, M.; Blyth, F.; Stanaway, F.; Maher, C. Efficacy, safety, and dose-dependence of the analgesic effects of opioid therapy for people with osteoarthritis: systematic review and meta-analysis. 2022, 216, 305-3011, DOI 10.5694/mja2.51392.

299. Smith, S.R.; Deshpande, B.R.; Collins, J.E.; Katz, J.N.; Losina, E. Comparative pain reduction of oral non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids for knee osteoarthritis: systematic analytic review. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016, 24, 962-972, DOI 10.1016/j.joca.2016.01.135.

300. Krebs, E.E.; Gravelly, A.; Nugent, S.; Jensen, A.C.; DeRonne, B.; Goldsmith, E.S.; Kruenke, K.; Bair, M.J.; Nourbaloochi, S. Effect of Opioid vs Nonopioid Medications on Pain-Related Function in Patients With Chronic Back Pain or Hip or Knee Osteoarthritis Pain The SPACE Randomized Clinical Trial. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2018, 319, 872-882, DOI 10.1001/jama.2018.0899.
301. Volkow, N.D.; McLellan, A.T. Opioid Abuse in Chronic Pain - Misconceptions and Mitigation Strategies. *N Engl J Med* 2016, 374, 1253-1263, DOI 10.1056/NEJMra1507771.
302. Deveza, L.A.; Hunter, D.J.; Van Spil, W.E. Too much opioid, too much harm. *Osteoarthritis and Cartilage* 2018, 26, 293-295, DOI 10.1016/j.joca.2017.12.003.
303. Nowaczyk, A.; Szwedowski, D.; Dallo, I.; Nowaczyk, J. Overview of First-Line and Second-Line Pharmacotherapies for Osteoarthritis with Special Focus on Intra-Articular Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 1566, DOI 10.3390/ijms23031566.
304. Anil, U.; Markus, D.H.; Hurley, E.T.; Manjunath, A.K.; Alaia, M.J.; Campbell, K.A.; Jazrawi, L.M.; Strauss, E.J. The efficacy of intra-articular injections in the treatment of knee osteoarthritis: A network meta-analysis of randomized controlled trials. *Knee* 2021, 32, 173-182, DOI 10.1016/j.knee.2021.08.008.
305. Pavone, V.; Vescio, A.; Turchetta, M.; Giardina, S.M.C.; Culmone, A.; Testa, G. Injection-Based Management of Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Guidelines. *Frontiers in Pharmacology* 2021, 12, 661805, DOI 10.3389/fphar.2021.661805.
306. Habib, G.S.; Bashir, M.; Jabbour, A. Increased blood glucose levels following intra-articular injection of methylprednisolone acetate in patients with controlled diabetes and symptomatic osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis* 2008, 67, 1790-1791, DOI 10.1136/ard.2008.089722.
307. Wernecke, C.; Braun, H.J.; Dragoo, J.L. The Effect of Intra-articular Corticosteroids on Articular Cartilage A Systematic Review. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine* 2015, 3, 2325967115581163, DOI 10.1177/2325967115581163.
308. Bedard, N.A.; Pugely, A.J.; Elkins, J.M.; Duchman, K.R.; Westermann, R.W.; Liu, S.S.; Gao, Y.; Callaghan, J.J. The John N. Insall Award Do Intraarticular Injections Increase the Risk of Infection After TKA? *Clin Orthop* 2017, 475, 45-52, DOI 10.1007/s11999-016-4757-8.
309. Roecker, Z.; Quinlan, N.D.; Browne, J.A.; Werner, B.C. Risk of Periprosthetic Infection Following Intra-Articular Corticosteroid Injections After Total Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty* 2020, 35, 1090-1094, DOI 10.1016/j.arth.2019.11.017.
310. Zeng, C.; Gao, S.; Lei, G. Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee. *N Engl J Med* 2015, 372, 2569-2570.

311. Latourte, A.; Lellouche, H. Update on corticosteroid, hyaluronic acid and platelet-rich plasma injections in the management of osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2021, 88, 105204, DOI 10.1016/j.jbspin.2021.105204.

312. Hunt, C.; Provenzano, D.A.; Eshraghi, Y.; Mittal, N.; Souza, D.; Buchheit, T. Should intra-articular hyaluronic acid be used routinely for knee osteoarthritis pain? *Pm&R* 2022, 14, 879-885, DOI 10.1002/pmrj.12740.

313. Bannuru, R.R.; Natov, N.S.; Obadan, I.E.; Price, L.L.; Schmid, C.H.; McAlindon, T.E. Therapeutic Trajectory of Hyaluronic Acid Versus Corticosteroids in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research* 2009, 61, 1704-1711, DOI 10.1002/art.24925.

314. Campbell, K.A.; Erickson, B.J.; Saltzman, B.M.; Mascarenhas, R.; Bach, B.R., Jr.; Cole, B.J.; Verma, N.N. Is Local Viscosupplementation Injection Clinically Superior to Other Therapies in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Overlapping Meta-analyses. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2015, 31, 2036+, DOI 10.1016/j.arthro.2015.03.030.

315. He, W.; Kuang, M.; Zhao, J.; Sun, L.; Lu, B.; Wang, Y.; Ma, J.; Ma, X. Efficacy and safety of intraarticular hyaluronic acid and corticosteroid for knee osteoarthritis: A meta-analysis. *International Journal of Surgery* 2017, 39, 95-103, DOI 10.1016/j.ijssu.2017.01.087.

316. Altman, R.D.; Bedi, A.; Karlsson, J.; Sancheti, P.; Schemitsch, E. Product Differences in Intra-articular Hyaluronic Acids for Osteoarthritis of the Knee. *Am J Sports Med* 2016, 44, 2158-2165, DOI 10.1177/0363546515609599.

317. Hummer, C.D.; Angst, F.; Ngai, W.; Whittington, C.; Yoon, S.S.; Duarte, L.; Manitt, C.; Schemitsch, E. High molecular weight Intraarticular hyaluronic acid for the treatment of knee osteoarthritis: a network meta-analysis. *Bmc Musculoskeletal Disorders* 2020, 21, 702, DOI 10.1186/s12891-020-03729-w.

318. Angermann, P.; Harager, K.; Tobin, L.L. Arthroscopic chondrectomy as a treatment of cartilage lesions. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 2002, 10, 6-9, DOI 10.1007/s001670100233.

319. Lv, B.; Huang, K.; Chen, J.; Wu, Z.; Wang, H. Medium-term efficacy of arthroscopic debridement vs conservative treatment for knee osteoarthritis of Kellgren-Lawrence grades I-III. *World Journal of Clinical Cases* 2021, 9, 5102-5111, DOI 10.12998/wjcc.v9.i19.5102.

320. Kirkley, A.; Birmingham, T.B.; Litchfield, R.B.; Giffin, J.R.; Willits, K.R.; Wong, C.J.; Feagan, B.G.; Donner, A.; Griffin, S.H.; D'Ascanio, L.M.; Pope, J.E.; Fowler, P.J. A Randomized Trial of Arthroscopic Surgery for Osteoarthritis of the Knee (vol 359, pg 1097, 2008). *N Engl J Med* 2009, 361, 2004.

321. McCormick, F.; Harris, J.D.; Abrams, G.D.; Frank, R.; Gupta, A.; Hussey, K.; Wilson, H.; Bach, B., Jr.; Cole, B. Trends in the Surgical Treatment of Articular Cartilage Lesions in the United States: An Analysis of a Large Private-Payer Database Over a Period of 8 Years. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2014, 30, 222-226, DOI 10.1016/j.arthro.2013.11.001.
322. Murray, I.R.; Benke, M.T.; Mandelbaum, B.R. Management of knee articular cartilage injuries in athletes: chondroprotection, chondrofacilitation, and resurfacing. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 2016, 24, 1617-1626, DOI 10.1007/s00167-015-3509-8.
323. Gowd, A.K.; Cvetanovich, G.L.; Liu, J.N.; Christian, D.R.; Cabarcas, B.C.; Redondo, M.L.; Verma, N.N.; Yanke, A.B.; Cole, B.J. Management of Chondral Lesions of the Knee: Analysis of Trends and Short-Term Complications Using the National Surgical Quality Improvement Program Database. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2019, 35, 138-146, DOI 10.1016/j.arthro.2018.07.049.
324. Totlis, T.; Marin Fermin, T.; Kalifis, G.; Terzidis, I.; Maffulli, N.; Papakostas, E. Arthroscopic debridement for focal articular cartilage lesions of the knee: A systematic review. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* 2021, 19, 356-364, DOI 10.1016/j.surge.2020.11.011.
325. Joshi, A.; Kayastha, N.; Maharjan, R.; Chand, P.; K C, B.R. Return to preinjury status after routine knee arthroscopy in military population. *Journal of Nepal Health Research Council* 2014, 12, 14-18.
326. Blatnik, P.; Tusak, M.; Bojnec, S.; Brezigar Masten, A. Economic evaluation of knee arthroscopy treatment in a general hospital. *Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina* 2017, 14, 33-40, DOI 10.17392/887-16.
327. Kwon, H.; Brown, W.E.; Lee, C.A.; Wang, D.; Paschos, N.; Hu, J.C.; Athanasiou, K.A. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nature Reviews Rheumatology* 2019, 15, 550-570, DOI 10.1038/s41584-019-0255-1.
328. Mithoefer, K.; McAdams, T.; Williams, R.J.; Kreuz, P.C.; Mandelbaum, B.R. Clinical Efficacy of the Microfracture Technique for Articular Cartilage Repair in the Knee An Evidence-Based Systematic Analysis. *Am J Sports Med* 2009, 37, 2053-2063, DOI 10.1177/0363546508328414.
329. Sommerfeldt, M.F.; Magnussen, R.A.; Hewett, T.E.; Kaeding, C.C.; Flanigan, D.C. Microfracture of Articular Cartilage. *Jbjs Reviews* 2016, 4, e6, DOI 10.2106/JBJS.RVW.15.00005.

330. Gobbi, A.; Karnatzikos, G.; Kumar, A. Long-term results after microfracture treatment for full-thickness knee chondral lesions in athletes. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 2014, 22, 1986-1996, DOI 10.1007/s00167-013-2676-8.

331. Scillia, A.J.; Aune, K.T.; Andrachuk, J.S.; Cain, E.L.; Dugas, J.R.; Fleisig, G.S.; Andrews, J.R. Return to Play After Chondroplasty of the Knee in National Football League Athletes. *Am J Sports Med* 2015, 43, 663-668, DOI 10.1177/0363546514562752.

332. Solheim, E.; Hegna, J.; Inderhaug, E.; Oyen, J.; Harlem, T.; Strand, T. Results at 10-14 years after microfracture treatment of articular cartilage defects in the knee. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 2016, 24, 1587-1593, DOI 10.1007/s00167-014-3443-1.

333. Bert, J.M. Abandoning microfracture of the knee: has the time come? *Arthroscopy* 2015, 31, 501-505, DOI 10.1016/j.arthro.2014.12.018.

334. Johnson, L.L.; Spector, M. The New Microfracture: All Things Considered. *Arthroscopy- the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2015, 31, 1028-1031, DOI 10.1016/j.arthro.2015.04.073.

335. Kraeutler, M.J.; Aliberti, G.M.; Scillia, A.J.; McCarty, E.C.; Mulcahey, M.K. Microfracture Versus Drilling of Articular Cartilage Defects: A Systematic Review of the Basic Science Evidence. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine* 2020, 8, 2325967120945313, DOI 10.1177/2325967120945313.

336. Chen, H.; Sun, J.; Hoemann, C.D.; Lascau-Coman, V.; Wei Ouyang; McKee, M.D.; Shive, M.S.; Buschmann, M.D. Drilling and Microfracture Lead to Different Bone Structure and Necrosis during Bone-Marrow Stimulation for Cartilage Repair. *Journal of Orthopaedic Research* 2009, 27, 1432-1438, DOI 10.1002/jor.20905.

337. Chen, H.; Hoemann, C.D.; Sun, J.; Chevrier, A.; McKee, M.D.; Shive, M.S.; Hurtig, M.; Buschmann, M.D. Depth of Subchondral Perforation Influences the Outcome of Bone Marrow Stimulation Cartilage Repair. *Journal of Orthopaedic Research* 2011, 29, 1178-1184, DOI 10.1002/jor.21386.

338. Choi, J.; Lee, K. Comparison of clinical outcomes between arthroscopic subchondral drilling and microfracture for osteochondral lesions of the talus. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 2016, 24, 2140-2147, DOI 10.1007/s00167-015-3511-1.

339. Gao, L.; Goebel, L.K.H.; Orth, P.; Cucchiari, M.; Madry, H. Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research. *Disease Models & Mechanisms* 2018, 11, dmm034280, DOI 10.1242/dmm.034280.

340. Johnson, L.L. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 1986, 2, 54-69, DOI 10.1016/s0749-8063(86)80012-3.

341. Bert, J.M.; Maschka, K. The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: a five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone. *Arthroscopy* 1989, 5, 25-32, DOI 10.1016/0749-8063(89)90086-8.
342. Johnson, L.L. Arthroscopic abrasion arthroplasty. *Clin Orthop* 2001, S306-S317.
343. Kaul, G.; Cucchiarini, M.; Remberger, K.; Kohn, D.; Madry, H. Failed cartilage repair for early osteoarthritis defects: a biochemical, histological and immunohistochemical analysis of the repair tissue after treatment with marrow-stimulation techniques. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 2012, 20, 2315-2324, DOI 10.1007/s00167-011-1853-x.
344. Sakata, K.; Furumatsu, T.; Abe, N.; Miyazawa, S.; Sakoma, Y.; Ozaki, T. Histological Analysis of Failed Cartilage Repair after Marrow Stimulation for the Treatment of Large Cartilage Defect in Medial Compartmental Osteoarthritis of the Knee. *Acta Med Okayama* 2013, 67, 65-74.
345. Richter, D.L.; Schenck, R.C., Jr.; Wascher, D.C.; Treme, G. Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature. *Sports Health-a Multidisciplinary Approach* 2016, 8, 153-160, DOI 10.1177/1941738115611350.
346. Pareek, A.; Reardon, P.J.; Maak, T.G.; Levy, B.A.; Stuart, M.J.; Krych, A.J. Long-term Outcomes After Osteochondral Autograft Transfer: A Systematic Review at Mean Follow-up of 10.2 Years. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2016, 32, 1174-1184, DOI 10.1016/j.arthro.2015.11.037.
347. Patil, S.; Tapasvi, S.R. Osteochondral autografts. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 2015, 8, 423-428, DOI 10.1007/s12178-015-9299-2.
348. Solheim, E.; Hegna, J.; Strand, T.; Harlem, T.; Inderhaug, E. Randomized Study of Long-term (15-17 Years) Outcome After Microfracture Versus Mosaicplasty in Knee Articular Cartilage Defects. *Am J Sports Med* 2018, 46, 826-831, DOI 10.1177/0363546517745281.
349. Chimutengwende-Gordon, M.; Donaldson, J.; Bentley, G. Current solutions for the treatment of chronic articular cartilage defects in the knee. *Efort Open Reviews* 2020, 5, 156-163, DOI 10.1302/2058-5241.5.190031.
350. Lynch, T.S.; Patel, R.M.; Benedick, A.; Amin, N.H.; Jones, M.H.; Miniaci, A. Systematic Review of Autogenous Osteochondral Transplant Outcomes. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2015, 31, 746-754, DOI 10.1016/j.arthro.2014.11.018.
351. Zamborsky, R.; Danisovic, L. Surgical Techniques for Knee Cartilage Repair: An Updated Large-Scale Systematic Review and Network Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2020, 36, 845-858, DOI 10.1016/j.arthro.2019.11.096.

352. Chalmers, P.N.; Vigneswaran, H.; Harris, J.D.; Cole, B.J. Activity-Related Outcomes of Articular Cartilage Surgery: A Systematic Review. *Cartilage* 2013, 4, 193-203, DOI 10.1177/1947603513481603.

353. Bowland, P.; Ingham, E.; Fisher, J.; Jennings, L.M. Simple geometry tribological study of osteochondral graft implantation in the knee. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H-Journal of Engineering in Medicine* 2018, 232, 249-256, DOI 10.1177/0954411917751560.

354. Thomas, D.; Shaw, K.A.; Waterman, B.R. Outcomes After Fresh Osteochondral Allograft Transplantation for Medium to Large Chondral Defects of the Knee. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine* 2019, 7, 2325967119832299, DOI 10.1177/2325967119832299.

355. Goertz, S.; De Young, A.J.; Bugbee, W.D. Fresh Osteochondral Allografting for Steroid-associated Osteonecrosis of the Femoral Condyles. *Clin Orthop* 2010, 468, 1269-1278, DOI 10.1007/s11999-010-1250-7.

356. Chahal, J.; Gross, A.E.; Gross, C.; Mall, N.; Dwyer, T.; Chahal, A.; Whelan, D.B.; Cole, B.J. Outcomes of Osteochondral Allograft Transplantation in the Knee. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2013, 29, 575-588, DOI 10.1016/j.arthro.2012.12.002.

357. Briggs, D.T.; Sadr, K.N.; Pulido, P.A.; Bugbee, W.D. The Use of Osteochondral Allograft Transplantation for Primary Treatment of Cartilage Lesions in the Knee. *Cartilage* 2015, 6, 203-207, DOI 10.1177/1947603515595072.

358. Levy, Y.D.; Görtz, S.; Pulido, P.A.; McCauley, J.C.; Bugbee, W.D. Do fresh osteochondral allografts successfully treat femoral condyle lesions? *Clin Orthop Relat Res* 2013, 471, 231-237, DOI 10.1007/s11999-012-2556-4.

359. Welch, T.; Mandelbaum, B.; Tom, M. Autologous Chondrocyte Implantation: Past, Present, and Future. *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 2016, 24, 85-91, DOI 10.1097/JSA.000000000000115.

360. Lee, D.H.; Kim, S.J.; Kim, S.A.; Ju, G. Past, present, and future of cartilage restoration: from localized defect to arthritis. *Knee Surgery & Related Research* 2022, 34, 1, DOI 10.1186/s43019-022-00132-8.

361. Liu, Y.; Shah, K.M.; Luo, J. Strategies for Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2021, 9, 770655, DOI 10.3389/fbioe.2021.770655.

362. Davies, R.L.; Kuiper, N.J. Regenerative Medicine: A Review of the Evolution of Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) Therapy. *Bioengineering-Basel* 2019, 6, 22, DOI 10.3390/bioengineering6010022.

363. Gooding, C.R.; Bartlett, W.; Bentley, G.; Skinner, J.A.; Carrington, R.; Flanagan, A. A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered. *Knee* 2006, 13, 203-210, DOI 10.1016/j.knee.2006.02.011.
364. Gikas, P.D.; Bayliss, L.; Bentley, G.; Briggs, T.W.R. An overview of autologous chondrocyte implantation. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 2009, 91B, 997-1006, DOI 10.1302/0301-620X.91B8.21824.
365. Brittberg, M. Cell Carriers as the Next Generation of Cell Therapy for Cartilage Repair A Review of the Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation Procedure. *Am J Sports Med* 2010, 38, 1259-1271, DOI 10.1177/0363546509346395.
366. Harris, J.D.; Siston, R.A.; Pan, X.; Flanigan, D.C. Autologous Chondrocyte Implantation A Systematic Review. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2010, 92A, 2220-2233, DOI 10.2106/JBJS.J.00049.
367. Nawaz, S.Z.; Bentley, G.; Briggs, T.W.R.; Carrington, R.W.J.; Skinner, J.A.; Gallagher, K.R.; Dhinsa, B.S. Autologous Chondrocyte Implantation in the Knee. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2014, 96A, 824-830, DOI 10.2106/JBJS.L.01695.
368. Gille, J.; Behrens, P.; Volpi, P.; de Girolamo, L.; Reiss, E.; Zoch, W.; Anders, S. Outcome of Autologous Matrix Induced Chondrogenesis (AMIC) in cartilage knee surgery: data of the AMIC Registry. *Arch Orthop Trauma Surg* 2013, 133, 87-93, DOI 10.1007/s00402-012-1621-5.
369. Migliorini, F.; Eschweiler, J.; Schenker, H.; Baroncini, A.; Tingart, M.; Maffulli, N. Surgical management of focal chondral defects of the knee: a Bayesian network meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2021, 16, 543, DOI 10.1186/s13018-021-02684-z.
370. Xiang, Y.; Bunpetch, V.; Zhou, W.; Ouyang, H. Optimization strategies for ACI: A step-chronicle review. *Journal of Orthopaedic Translation* 2019, 17, 3-14, DOI 10.1016/j.jot.2018.12.005.
371. Bentley, G.; Biant, L.C.; Vijayan, S.; Macmull, S.; Skinner, J.A.; Carrington, R.W.J. Minimum ten-year results of a prospective randomised study of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for symptomatic articular cartilage lesions of the knee. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 2012, 94B, 504-509, DOI 10.1302/0301-620X.94B4.27495.
372. Bartlett, W.; Skinner, J.A.; Gooding, C.R.; Carrington, R.; Flanagan, A.M.; Briggs, T.; Bentley, G. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 2005, 87B, 640-645, DOI 10.1302/0301-620X.87B5.15905.

373. Minas, T.; Von Keudell, A.; Bryant, T.; Gomoll, A.H. The John Insall Award: A Minimum 10-year Outcome Study of Autologous Chondrocyte Implantation. *Clin Orthop* 2014, 472, 41-51, DOI 10.1007/s11999-013-3146-9.

374. Mata-Miranda, M.M.; Paredes-González, L.E.; Martínez-Martínez, C.M.; Vázquez-Zapién, G.J. Implante de condrocitos autólogos con potencial regenerativo en lesiones articulares. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología* 2015, 29, 28-35, DOI 10.1016/j.rccot.2015.10.004.

375. Harper, T.A.M. Femoral Head and Neck Excision. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 2017, 47, 885-+, DOI 10.1016/j.cvsm.2017.03.002.

376. Prostrendy, J. Excision arthroplasty of the femoral head and neck. . In *Current techniques in small animal surgery*; Bojrab, M., Ed.; Teton New Media: Jackson (WY), 2014; pp. 1048-52.

377. Off, W.; Matis, U. Excision arthroplasty of the hip joint in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 2010, 23, 297-305.

378. Yap, F.W.; Dunn, A.L.; Maria Garcia-Fernandez, P.; Brown, G.; Allan, R.M.; Calvo, I. Femoral head and neck excision in cats: medium- to long-term functional outcome in 18 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2015, 17, 704-710, DOI 10.1177/1098612X14556848.

379. Fitzpatrick, N.; Pratola, L.; Yeadon, R.; Nikolaou, C.; Hamilton, M.; Farrell, M. Total Hip Replacement after Failed Femoral Head and Neck Excision in Two Dogs and Two Cats. *Veterinary Surgery* 2012, 41, 136-142, DOI 10.1111/j.1532-950X.2011.00940.x.

380. Hounshell, C.R. Regenerative Tissue Matrix as an Interpositional Spacer Following Excision of a Cuboid-Navicular Tarsal Coalition: A Case Study. *Journal of Foot & Ankle Surgery* 2011, 50, 241-244, DOI 10.1053/j.jfas.2010.12.018.

381. Rosenbaum, D.; Timte, B.; Schmiegel, A.; Miehke, R.K.; Hilker, A. First Ray Resection Arthroplasty Versus Arthrodesis in the Treatment of the Rheumatoid Foot. *Foot & Ankle International* 2011, 32, 589-594, DOI 10.3113/FAI.2011.0589.

382. Patel, A.; Eleftheriou, K.I.; Anand, A.; Rosenfeld, P. Bilateral Excision Arthroplasty and Interpositional Allograft for Severe Talonavicular Osteoarthritis. *Foot & Ankle International* 2013, 34, 1294-1298, DOI 10.1177/1071100713484006.

383. De Almeida, T.B.C.; Reis, E.D.S.; Pascarelli, L.; Bongiovanni, R.R.; Teodoro, R.L. Artroplastia De Interposicao Em Cotovelo: Revisao Sistemática. *Acta Ortopedica Brasileira* 2021, 29, 219-222, DOI 10.1590/1413-785220212904238960.

384. Morrey, M.; Dutta, A.; Whitney, I.; Morrey, B. Interposition arthroplasty: Current indications, technique and expectations. *J Clin Orthop Trauma* 2021, 19, 175-182, DOI 10.1016/j.jcot.2021.05.023.

385. Lanzerath, F.; Hackl, M.; Pucher, C.; Leschinger, T.; Uschok, S.; Mueller, L.P.; Wegmann, K. Interposition arthroplasty for post-traumatic osteoarthritis of the elbow: a systematic review. *Int Orthop* 2022, 46, 2603-2610, DOI 10.1007/s00264-022-05562-3.
386. Blaine, T.; Wiseman, S.; Kovacevic, D.; Morrey, B. Interposition Arthroplasty for Posttraumatic Ulnohumeral Arthritis. *Journal of Shoulder and Elbow Arthroplasty* 2019, 3, DOI 10.1177/2471549219836390.
387. Toft, F.; Moro, F. Interposition arthroplasty and anconeus arthroplasty of the elbow. *Obere Extremitaet-Schulter-Ellenbogen-Hand-Upper Extremity-Shoulder Elbow Hand* 2019, 14, 239-246, DOI 10.1007/s11678-019-0529-x.
388. Baghdadi, Y.M.K.; Morrey, B.F.; Sanchez-Sotelo, J. Anconeus Interposition Arthroplasty: Mid- to Long-term Results. *Clin Orthop* 2014, 472, 2151-2161, DOI 10.1007/s11999-014-3629-3.
389. Lippincott, C.L. Improvement of Excision Arthroplasty of the Femoral-Head and Neck Utilizing a Biceps Femoris Muscle Sling. *J Am Anim Hosp Assoc* 1981, 17, 668-672.
390. Lewis, D.; Bellah, J.; McGavin, M.; Gaskin, J.M. Postoperative Examination of the Biceps Femoris Muscle Sling used in Excision of the Femoral-Head and Neck in Dogs. *Veterinary Surgery* 1988, 17, 269-277, DOI 10.1111/j.1532-950X.1988.tb01013.x.
391. Vansickle, D.; Prostrendy, J.; Toombs, J.; Prostredny, J. Effect of 2 Muscle Sling Techniques on Early Morbidity After Femoral-Head and Neck Excision in Dogs. *Veterinary Surgery* 1991, 20, 298-305, DOI 10.1111/j.1532-950X.1991.tb01271.x.
392. Brumat, P.; Kunicic, O.; Novak, S.; Slokar, U.; Psenica, J.; Topolovec, M.; Mihalic, R.; Trebse, R. The Surgical Treatment of Osteoarthritis. *Life-Basel* 2022, 12, 982, DOI 10.3390/life12070982.
393. Yasui, Y.; Hannon, C.P.; Seow, D.; Kennedy, J.G. Ankle arthrodesis: A systematic approach and review of the literature. *World Journal of Orthopedics* 2016, 7, 700-708, DOI 10.5312/wjo.v7.i11.700.
394. Duan, X.; Yang, L.; Yin, L. Arthroscopic arthrodesis for ankle arthritis without bone graft. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2016, 11, 154, DOI 10.1186/s13018-016-0490-y.
395. Roussignol, X. Arthroscopic tibiotalar and subtalar joint arthrodesis. *Orthopaedics & Traumatology-Surgery & Research* 2016, 102, S195-S203, DOI 10.1016/j.otsr.2015.06.033.
396. Ho, B.; Baumhauer, J. Hallux rigidus. *Efort Open Reviews* 2017, 2, 13-20, DOI 10.1302/2058-5241.2.160031.
397. Porcellini, G.; Savoie, F.H.,III; Campi, F.; Merolla, G.; Paladini, P. Arthroscopically Assisted Shoulder Arthrodesis: Is It an Effective Technique? *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2014, 30, 1550-1556, DOI 10.1016/j.arthro.2014.06.026.

398. Arenas-Miquelez, A.; Arbeloa-Gutierrez, L.; Familiari, F.; de Pablos, J. Salvage Procedures of the Shoulder: Glenohumeral Arthrodesis and Resection Arthroplasty. *Indian J Orthop* 2020, 55, 27-37, DOI 10.1007/s43465-020-00279-0.

399. Karuppaiah, K. Is there a role for elbow arthrodesis in 21st Century - Current concepts and overview of surgical techniques. *Journal of clinical orthopaedics and trauma* 2021, 20, 101466, DOI 10.1016/j.jcot.2021.05.028.

400. Dean, B.; Henari, S.; Thurley, N.; Little, C.; McNab, I.; Riley, N. Therapeutic interventions for osteoarthritis of the wrist: a systematic review and meta-analysis. *F1000Research* 2018, 7, 1484, DOI 10.12688/f1000research.16218.2.

401. Lulan, J.; Marteau, E.; Bacle, G. Wrist osteoarthritis. *Orthopaedics & Traumatology-Surgery & Research* 2015, 101, S1-S9, DOI 10.1016/j.otsr.2014.06.025.

402. Giberson-Chen, C.C.; Leland, H.A.; Benavent, K.A.; Harper, C.M.; Earp, B.E.; Rozental, T.D. Functional Outcomes After Sauve-Kapandji Arthrodesis. *Journal of Hand Surgery-American Volume* 2020, 45, 408-417, DOI 10.1016/j.jhsa.2019.11.014.

403. Wood, J.H.; Conway, J.D. Advanced concepts in knee arthrodesis. *World Journal of Orthopedics* 2015, 6, 202-210, DOI 10.5312/wjo.v6.i2.202.

404. Salvatierra, D.N.A.; Witte, P.G.; Scott, H.W.; Catchpole, C. Pantarsal arthrodesis in cats using orthogonal plating. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2018, 20, 45-54, DOI 10.1177/1098612X17698264.

405. Marcellin-Little, D.J.; von Pfeil, D.J.F. *Carpal Region*, 2020; pp. 193.

406. Basa, R.M.; Johnson, K.A. Management of feline carpal injuries: What are the options and when is arthrodesis indicated? *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2019, 21, 809-823, DOI 10.1177/1098612X19870388.

407. Pandya, J.; Johnson, T.; Low, A.K. Shoulder replacement for osteoarthritis: A review of surgical management. *Maturitas* 2018, 108, 71-76, DOI 10.1016/j.maturitas.2017.11.013.

408. Craig, R.S.; Goodier, H.; Singh, J.A.; Hopewell, S.; Rees, J.L. Shoulder replacement surgery for osteoarthritis and rotator cuff tear arthropathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2020, CD012879, DOI 10.1002/14651858.CD012879.pub2.

409. Al Mana, L.; Rajaratnam, K. Cochrane in CORR (R): Shoulder Replacement Surgery For Osteoarthritis And Rotator Cuff Tear Arthropathy. *Clin Orthop* 2020, 478, 2431-2433, DOI 10.1097/CORR.0000000000001523.

410. Kwak, J.; Koh, K.; Jeon, I. Total Elbow Arthroplasty: Clinical Outcomes, Complications, and Revision Surgery. *Clinics in Orthopedic Surgery* 2019, 11, 369-379, DOI 10.4055/cios.2019.11.4.369.

411. Zhang, D.; Chen, N. Total Elbow Arthroplasty. *Journal of Hand Surgery-American* Volume 2019, 44, 487-495, DOI 10.1016/j.jhsa.2018.11.005.
412. Adams, J.E.; Steinmann, S.P. Surgical management of osteoarthritis in the shoulder and elbow. *Journal of Hand Therapy* 2022, 35, 413-417, DOI 10.1016/j.jht.2022.02.002.
413. Inoue, D.; Kabata, T.; Kajino, Y.; Takagi, T.; Ohmori, T.; Yoshitani, J.; Ueno, T.; Tsuchiya, H. Mid- to long-term results of resurfacing hip arthroplasty in Japanese patients: a comparison of osteoarthritic vs non-osteoarthritic patients. *Journal of Artificial Organs* 2019, 22, 77-83, DOI 10.1007/s10047-018-1077-7.
414. Marsh, M.; Newman, S. Trends and developments in hip and knee arthroplasty technology. *Journal of Rehabilitation and Assistive Technologies Engineering* 2021, 8, 2055668320952043, DOI 10.1177/2055668320952043.
415. Scott, C.E.H.; Clement, N.D.; Davis, E.T.; Haddad, F.S. Modern total hip arthroplasty: peak of perfection or room for improvement? *Bone & Joint Journal* 2022, 104B, 189-192, DOI 10.1302/0301-620X.104B2.BJJ-2022-0007.
416. Luceri, F.; Morelli, I.; Sinicato, C.M.; Della Grazia, A.; Verdoni, F.; Maffulli, N.; Peretti, G.M.; Curci, D. Medium-term outcomes of total hip arthroplasty in juvenile patients. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2020, 15, 476, DOI 10.1186/s13018-020-01990-2.
417. Sodhi, N.; Mont, M.A. Survival of total hip replacements. *Lancet* 2019, 393, 613, DOI 10.1016/S0140-6736(18)31859-2.
418. Unkar, E.A.; Ozturkmen, Y.; Sukur, E.; Carkci, E.; Mert, M. Posterior cruciate-retaining versus posterior-stabilized total knee arthroplasty for osteoarthritis with severe varus deformity. *Acta Orthopaedica Et Traumatologica Turcica* 2017, 51, 95-99, DOI 10.1016/j.aott.2016.12.008.
419. Skarpas, G.A.; Karzis, K.; Xifara, A.; Zarokosta, M.; Zoulamoglou, M.; Piperos, T.; Mariolis-Sapsakos, T.; Michos, I.V.; Kazakos, K. The Effect of PCL to Knee Proprioception in TKA: A Prospective Study. *Clin. Case Rep. Rev* 2017, 3, 1-3.
420. Schmitt, J.; Lange, T.; Guenther, K.; Kopkow, C.; Rataj, E.; Apfelbacher, C.; Aringer, M.; Boehle, E.; Bork, H.; Dreinhofer, K.; Friederich, N.; Frosch, K.; Gravius, S.; Gromnica-Ihle, E.; Heller, K.; Kirschner, S.; Kladny, B.; Kohlhof, H.; Kremer, M.; Leuchten, N.; Lippmann, M.; Malzahn, J.; Meyer, H.; Sabatowski, R.; Scharf, H.; Stoeve, J.; Wagner, R.; Luetzner, J. Indication Criteria for Total Knee Arthroplasty in Patients with Osteoarthritis - A Multi-perspective Consensus Study. *Zeitschrift Fur Orthopadie Und Unfallchirurgie* 2017, 155, 539-548, DOI 10.1055/s-0043-115120.
421. Brinkmann, E.J.; Fitz, W. Custom total knee: understanding the indication and process. *Arch Orthop Trauma Surg* 2021, 141, 2205-2216, DOI 10.1007/s00402-021-04172-9.

422. Niinimäki, T.; Eskelinen, A.; Mäkelä, K.; Ohtonen, P.; Puhto, A.; Remes, V. Unicompartmental Knee Arthroplasty Survivorship is Lower Than TKA Survivorship: A 27-year Finnish Registry Study. *Clin Orthop* 2014, 472, 1496-1501, DOI 10.1007/s11999-013-3347-2.
423. Fuller, B.C.; Lonner, J.H.; Berend, K.R.; Berger, R.A.; Gerlinger, T.L. Partial Knee Arthroplasty: The State of the Art. *Instr Course Lect* 2021, 70, 235-246.
424. Hassebrock, J.D.; Makovicka, J.L.; Wong, M.; Patel, K.A.; Scott, K.L.; Deckey, D.G.; Chhabra, A. Minimally Invasive Robotic-Assisted Patellofemoral Arthroplasty. *Arthroscopy Techniques* 2020, 9, E425-E433, DOI 10.1016/j.eats.2019.11.013.
425. Hoogervorst, P.; Arendt, E.A. Patellofemoral arthroplasty: expert opinion. *Journal of Experimental Orthopaedics* 2022, 9, 24, DOI 10.1186/s40634-022-00457-z.
426. Gifford, A.B.; Lotsikas, P.J.; Liska, W.D.; Israel, S.K.; Rochat, M.C.; Saunders, W.B.; Guiot, L.P.; Marcellin-Little, D.J.; Benjamino, K.P.; Dyce, J. Total hip replacement in dogs with contralateral pelvic limb amputation: A retrospective evaluation of 13 cases. *Veterinary Surgery* 2020, 49, 1487-1496, DOI 10.1111/vsu.13513.
427. Jahandideh, A.; Tabary, P.Z. Comparison of Results of Total Hip Replacement (THR) with Femoral Head Osteotomy (FHO) in dogs - Review of Literatures. *Pakistan Journal of Medical & Health Sciences* 2020, 14, 1722-1724.
428. Bashir, J.; Sherman, A.; Lee, H.; Kaplan, L.; Hare, J.M. Mesenchymal Stem Cell Therapies in the Treatment of Musculoskeletal Diseases. *Pm&R* 2014, 6, 61-69, DOI 10.1016/j.pmrj.2013.05.007.
429. Diekman, B.O.; Guilak, F. Stem cell-based therapies for osteoarthritis: challenges and opportunities. *Curr Opin Rheumatol* 2013, 25, 119-126, DOI 10.1097/BOR.0b013e32835aa28d.
430. Hwang, J.J.; Rim, Y.A.; Nam, Y.; Ju, J.H. Recent Developments in Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Frontiers in Immunology* 2021, 12, 631291, DOI 10.3389/fimmu.2021.631291.
431. Pittenger, C.; Discher, D.; Peault, B.; Phinney, D.; Hare, J.; Caplan, A. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *Npj Regenerative Medicine* 2019, 4, 22, DOI 10.1038/s41536-019-0083-6.
432. Haynesworth, S.; Goshima, J.; Goldberg, V.M.; Caplan, A.I. Characterization of Cells with Osteogenic Potential from Human Marrow. *Bone* 1992, 13, 81-88, DOI 10.1016/8756-3282(92)90364-3.
433. Panepucci, R.A.; Siufi, J.; Silva, W.A.; Proto-Siquiera, R.; Neder, L.; Orellana, M.; Rocha, V.; Covas, D.T.; Zago, M.A. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004, 22, 1263-1278, DOI 10.1634/stemcells.2004-0024.

434. Fan, X.; Zhang, Y.; Li, X.; Fu, Q. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2020, 77, 2771-2794, DOI 10.1007/s00018-020-03454-6.
435. Mohamed-Ahmed, S.; Fristad, I.; Lie, S.A.; Suliman, S.; Mustafa, K.; Vindenes, H.; Idris, S.B. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Research & Therapy* 2018, 9, 168, DOI 10.1186/s13287-018-0914-1.
436. Pittenger; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284, 143-147, DOI 10.1126/science.284.5411.143.
437. Nagamura-Inoue, T.; He, H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World journal of stem cells* 2014, 6, 195-202, DOI 10.4252/wjsc.v6.i2.195.
438. Chen, J.; Mou, X.; Du, X.; Xiang, C. Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2015, 8, 725-731, DOI 10.1016/j.apjtm.2015.07.022.
439. Kim, J.; Jo, C.H.; Kim, H.; Hwang, Y. Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from the Periodontal Ligament, Umbilical Cord, and Adipose Tissue. *Stem Cells International* 2018, 2018, 8429042, DOI 10.1155/2018/8429042.
440. Stanko, P.; Kaiserova, K.; Altanerova, V.; Altaner, C. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomedical Papers-Olomouc* 2014, 158, 373-377, DOI 10.5507/bp.2013.078.
441. Schmelzer, E.; McKeel, D.T.; Gerlach, J.C. Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells from Different Tissues and Their Membrane Encasement for Prospective Transplantation Therapies. *Biomed Research International* 2019, 2019, 6376271, DOI 10.1155/2019/6376271.
442. Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001, 7, 211-228, DOI 10.1089/107632701300062859.
443. Nepali, S.; Park, M.; Lew, H.; Kim, O. Comparative Analysis of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Orbital and Abdominal Fat. *Stem Cells International* 2018, 2018, 3932615, DOI 10.1155/2018/3932615.
444. De Bari, C.; Dell'Accio, F.; Tylzanowski, P.; Luyten, F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001, 44, 1928-1942, DOI 10.1002/1529-0131(200108)44:8.

445. Murata, Y.; Uchida, S.; Utsunomiya, H.; Hatakeyama, A.; Nakashima, H.; Chang, A.; Sekiya, I.; Sakai, A. Synovial Mesenchymal Stem Cells Derived From the Cotyloid Fossa Synovium Have Higher Self-renewal and Differentiation Potential Than Those From the Paralabral Synovium in the Hip Joint. *Am J Sports Med* 2018, 46, 2942-2953, DOI 10.1177/0363546518794664.

446. Li, N.; Gao, J.; Mi, L.; Zhang, G.; Zhang, L.; Zhang, N.; Huo, R.; Hu, J.; Xu, K. Synovial membrane mesenchymal stem cells: past life, current situation, and application in bone and joint diseases. *Stem Cell Research & Therapy* 2020, 11, 381, DOI 10.1186/s13287-020-01885-3.

447. Kubosch, E.J.; Lang, G.; Fuerst, D.; Kubosch, D.; Izadpanah, K.; Rolauffs, B.; Suedkamp, N.P.; Schmal, H. The Potential for Synovium-derived Stem Cells in Cartilage Repair. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2018, 13, 174-184, DOI 10.2174/1574888X12666171002111026.

448. Ogata, Y.; Mabuchi, Y.; Yoshida, M.; Suto, E.G.; Suzuki, N.; Muneta, T.; Sekiya, I.; Akazawa, C. Purified Human Synovium Mesenchymal Stem Cells as a Good Resource for Cartilage Regeneration. *Plos One* 2015, 10, e0129096, DOI 10.1371/journal.pone.0129096.

449. Bami, M.; Sarlikiotis, T.; Milonaki, M.; Vikentiou, M.; Konsta, E.; Kapsimali, V.; Pappa, V.; Koulalis, D.; Johnson, E.O.; Soucacos, P.N. Superiority of synovial membrane mesenchymal stem cells in chondrogenesis, osteogenesis, myogenesis and tenogenesis in a rabbit model. *Injury-International Journal of the Care of the Injured* 2020, 51, 2855-2865, DOI 10.1016/j.injury.2020.03.022.

450. Sakaguchi, Y.; Sekiya, I.; Yagishita, K.; Muneta, T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues - Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005, 52, 2521-2529, DOI 10.1002/art.21212.

451. Spaggiari, G.M.; Capobianco, A.; Becchetti, S.; Mingari, M.C.; Moretta, L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006, 107, 1484-1490, DOI 10.1182/blood-2005-07-2775.

452. Spaggiari, G.M.; Abdelrazik, H.; Becchetti, F.; Moretta, L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E-2. *Blood* 2009, 113, 6576-6583, DOI 10.1182/blood-2009-02-203943.

453. English, K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013, 91, 19-26, DOI 10.1038/icb.2012.56.

454. Benvenuto, F.; Ferrari, S.; Gerdoni, E.; Gualandi, F.; Frassoni, F.; Pistoia, V.; Mancardi, G.; Uccelli, A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Cytometry Part a* 2008, 73A, 88.

455. Fernandes, T.L.; Gomoll, A.H.; Lattermann, C.; Hernandez, A.J.; Bueno, D.F.; Amano, M.T. Macrophage: A Potential Target on Cartilage Regeneration. *Frontiers in Immunology* 2020, 11, 111, DOI 10.3389/fimmu.2020.00111.

456. Harrell, C.R.; Jankovic, M.G.; Fellabaum, C.; Volarevic, A.; Djonov, V.; Arsenijevic, A.; Volarevic, V. Molecular Mechanisms Responsible for Anti-inflammatory and Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Factors. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2019, 1084, 187-206, DOI 10.1007/5584_2018_306.

457. Nemeth, K.; Leelahavanichkul, A.; Yuen, P.S.T.; Mayer, B.; Parmelee, A.; Doi, K.; Robey, P.G.; Leelahavanichkul, K.; Koller, B.H.; Brown, J.M.; Hu, X.; Jelinek, I.; Star, R.A.; Mezey, E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E-2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009, 15, 42-49, DOI 10.1038/nm.1905.

458. Lee, C.H.; Cook, J.L.; Mendelson, A.; Moioli, E.K.; Yao, H.; Mao, J.J. Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study. *Lancet* 2010, 376, 440-448, DOI 10.1016/S0140-6736(10)60668-X.

459. Acharya, C.; Adesida, A.; Zajac, P.; Mumme, M.; Riesle, J.; Martin, I.; Barbero, A. Enhanced Chondrocyte Proliferation and Mesenchymal Stromal Cells Chondrogenesis in Coculture Pellets Mediate Improved Cartilage Formation. *J Cell Physiol* 2012, 227, 88-97, DOI 10.1002/jcp.22706.

460. Wu, L.; Prins, H.; Helder, M.N.; van Blitterswijk, C.A.; Karperien, M. Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Chondrocyte Co-Cultures are Independent of Culture Conditions and Cell Sources. *Tissue Engineering Part a* 2012, 18, 1542-1551, DOI 10.1089/ten.tea.2011.0715.

461. Saulnier, N.; Viguier, E.; Perrier-Groult, E.; Chenu, C.; Pillet, E.; Roger, T.; Maddens, S.; Boulocher, C. Intra-articular administration of xenogeneic neonatal Mesenchymal Stromal Cells early after meniscal injury down-regulates metalloproteinase gene expression in synovium and prevents cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015, 23, 122-133, DOI 10.1016/j.joca.2014.09.007.

462. Vangsness, C.T., Jr.; Farr, Jack, II; Boyd, J.; Dellaero, D.T.; Mills, C.R.; LeRoux-Williams, M. Adult Human Mesenchymal Stem Cells Delivered via Intra-Articular Injection to the Knee Following Partial Medial Meniscectomy A Randomized, Double-Blind, Controlled Study. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2014, 96A, 90-98, DOI 10.2106/JBJS.M.00058.

463. Gupta, P.K.; Chullikana, A.; Rengasamy, M.; Shetty, N.; Pandey, V.; Agarwal, V.; Wagh, S.Y.; Vellotare, P.K.; Damodaran, D.; Viswanathan, P.; Thej, C.; Balasubramanian, S.; Sen Majumdar, A. Efficacy and safety of adult human bone marrow-derived, cultured, pooled,

allogeneic mesenchymal stromal cells (Stempeucel (R)): preclinical and clinical trial in osteoarthritis of the knee joint. *Arthritis Research & Therapy* 2016, 18, 301, DOI 10.1186/s13075-016-1195-7.

464. Lu, L.; Dai, C.; Du, H.; Li, S.; Ye, P.; Zhang, L.; Wang, X.; Song, Y.; Togashi, R.; Vangsness, C.T., Jr.; Bao, C. Intra-articular injections of allogeneic human adipose-derived mesenchymal progenitor cells in patients with symptomatic bilateral knee osteoarthritis: a Phase I pilot study. *Regenerative Medicine* 2020, 15, 1625-1636, DOI 10.2217/rme-2019-0106.

465. Kuah, D.; Sivell, S.; Longworth, T.; James, K.; Guermazi, A.; Cicuttini, F.; Wang, Y.; Craig, S.; Comin, G.; Robinson, D.; Wilson, J. Safety, tolerability and efficacy of intra-articular Progenza in knee osteoarthritis: a randomized double-blind placebo-controlled single ascending dose study. *Journal of Translational Medicine* 2018, 16, 49, DOI 10.1186/s12967-018-1420-z.

466. Pers, Y.; Rackwitz, L.; Ferreira, R.; Pullig, O.; Delfour, C.; Barry, F.; Sensebe, L.; Casteilla, L.; Fleury, S.; Bourin, P.; Noel, D.; Canovas, F.; Cyteval, C.; Lisignoli, G.; Schrauth, J.; Haddad, D.; Domergue, S.; Noeth, U.; Jorgensen, C.; ADIPOA Consortium Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Translational Medicine* 2016, 5, 847-856, DOI 10.5966/sctm.2015-0245.

467. Song, Y.; Du, H.; Dai, C.; Zhang, L.; Li, S.; Hunter, D.J.; Lu, L.; Bao, C. Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regenerative Medicine* 2018, 13, 295-307, DOI 10.2217/rme-2017-0152.

468. Lamo-Espinosa, J.; Mora, G.; Blanco, J.F.; Granero-Molto, F.; Nunez-Cordoba, J.M.; Sanchez-Echenique, C.; Bondia, J.M.; Aquerreta, J.D.; Andreu, E.J.; Ornila, E.; Villaron, E.M.; Valenti-Azcarate, A.; Sanchez-Guijo, F.; Consuelo del Canizo, M.; Ramon Valenti-Nin, J.; Prosper, F. Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II). *Journal of Translational Medicine* 2016, 14, 246, DOI 10.1186/s12967-016-0998-2.

469. Lamo-Espinosa, J.; Mora, G.; Blanco, J.F.; Granero-Molto, F.; Maria Nunez-Cordoba, J.; Lopez-Elio, S.; Andreu, E.; Sanchez-Guijo, F.; Damaso Aquerreta, J.; Maria Bondia, J.; Valenti-Azcarate, A.; del Consuelo del Canizo, M.; Maria Villaron, E.; Ramon Valenti-Nin, J.; Prosper, F. Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: long-term follow up of a multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II). *Journal of Translational Medicine* 2018, 16, 213, DOI 10.1186/s12967-018-1591-7.

470. Jo.; Lee, Y.G.; Shin, W.H.; Kim, H.; Chai, J.W.; Jeong, E.C.; Kim, J.E.; Shim, H.; Shin, J.S.; Shin, I.S.; Ra, J.C.; Oh, S.; Yoon, K.S. Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial. *Stem Cells* 2014, 32, 1254-1266, DOI 10.1002/stem.1634.
471. Centeno, C.J.; Al-Sayegh, H.; Bashir, J.; Goodyear, S.; Freeman, M.D. A dose response analysis of a specific bone marrow concentrate treatment protocol for knee osteoarthritis. *Bmc Musculoskeletal Disorders* 2015, 16, 258, DOI 10.1186/s12891-015-0714-z.
472. Lv, Z.; Cai, X.; Bian, Y.; Wei, Z.; Zhu, W.; Zhao, X.; Weng, X. Advances in Mesenchymal Stem Cell Therapy for Osteoarthritis: From Preclinical and Clinical Perspectives. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 2023, 10, DOI 10.3390/bioengineering10020195.
473. Cui, Y.P.; Cao, Y.P.; Liu, H.; Yang, X.; Meng, Z.C.; Wang, R. [Bone marrow mesenchymal stem cells in Sprague-Dawley rat model of osteoarthritis]. *Beijing da xue xue bao.Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences* 2015, 47, 211-8.
474. He, L.; He, T.; Xing, J.; Zhou, Q.; Fan, L.; Liu, C.; Chen, Y.; Wu, D.; Tian, Z.; Liu, B.; Rong, L. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy* 2020, 11, 276, DOI 10.1186/s13287-020-01781-w.
475. Yang, W.; Ke, C.; Yeh, K.; Huang, S.; Lin, Z.; Wu, W.; Lee, R. Stromal-vascular fraction and adipose-derived stem cell therapies improve cartilage regeneration in osteoarthritis-induced rats. *Scientific Reports* 2022, 12, 2828, DOI 10.1038/s41598-022-06892-3.
476. Li, H.; Qian, J.; Chen, J.; Zhong, K.; Chen, S. Osteochondral repair with synovial membrane-derived mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Reports* 2016, 13, 2071-2077, DOI 10.3892/mmr.2016.4795.
477. Ozeki, N.; Muneta, T.; Koga, H.; Nakagawa, Y.; Mizuno, M.; Tsuji, K.; Mabuchi, Y.; Akazawa, C.; Kobayashi, E.; Matsumoto, K.; Futamura, K.; Saito, T.; Sekiya, I. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthritis Cartilage* 2016, 24, 1061-1070, DOI 10.1016/j.joca.2015.12.018 [doi].
478. van Buul, G.M.; Siebelt, M.; Leijts, M.J.C.; Bos, P.K.; Waarsing, J.H.; Kops, N.; Weinans, H.; Verhaar, J.A.N.; Bernsen, M.R.; van Osch, Gerjo J V M Mesenchymal stem cells reduce pain but not degenerative changes in a mono-iodoacetate rat model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 2014, 32, 1167-1174, DOI 10.1002/jor.22650.
479. Mohoric, L.; Zorko, B.; Ceh, K.; Majdic, G. Blinded Placebo Study of Bilateral Osteoarthritis Treatment using Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Slovenian Veterinary Research* 2016, 53, 167-174.

480. Vilar, J.M.; Batista, M.; Morales, M.; Santana, A.; Cuervo, B.; Rubio, M.; Cugat, R.; Sopena, J.; Carrillo, J.M. 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* 2014, 10, 143, DOI 10.1186/1746-6148-10-143.

481. Cuervo Serrato, B.; Carrillo Poveda, J.; Rubio Zaragoza, M.; Sopena Juncosa, J.; Dominguez Perez, J.; Vilar Guerenio, J. Effect of Intraarticular Inoculation of Mesenchymal Stem Cells in Dogs with Hip Osteoarthritis by Means of Objective Force Platform Gait Analysis. Concordance with Numeric Subjective Scoring Scales. *Osteoarthritis and Cartilage* 2017, 25, S385, DOI 10.1016/j.joca.2017.02.659.

482. Kriston-Pal, E.; Czibula, A.; Gyuris, Z.; Balka, G.; Seregi, A.; Sukosd, F.; Suth, M.; Kiss-Toth, E.; Haracska, L.; Uher, F.; Monostori, E. Characterization and therapeutic application of canine adipose mesenchymal stem cells to treat elbow osteoarthritis. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* 2017, 81, 73-78.

483. Hunakova, K.; Hluchy, M.; Spakova, T.; Matejova, J.; Mudronova, D.; Kuricova, M.; Rosocha, J.; Ledecy, V. Study of bilateral elbow joint osteoarthritis treatment using conditioned medium from allogeneic adipose tissue-derived MSCs in Labrador retrievers. *Res Vet Sci* 2020, 132, 513-520, DOI 10.1016/j.rvsc.2020.08.004.

484. Spasovski, D.; Spasovski, V.; Bascarevic, Z.; Stojiljkovic, M.; Vreca, M.; Anelkovic, M.; Pavlovic, S. Intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of knee osteoarthritis. *J Gene Med* 2018, 20, e3002, DOI 10.1002/jgm.3002.

485. Yubo, M.; Li Yanyan; Li Li; Sun Tao; Lin Bo; Chen Lin Clinical efficacy and safety of mesenchymal stem cell transplantation for osteoarthritis treatment: A meta-analysis. *Plos One* 2017, 12, e0175449, DOI 10.1371/journal.pone.0175449.

486. Cui, G.; Wang, Y.Y.; Li, C.; Shi, C.; Wang, W. Efficacy of mesenchymal stem cells in treating patients with osteoarthritis of the knee: A meta-analysis. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2016, 12, 3390-3400, DOI 10.3892/etm.2016.3791.

487. Awad, M.E.; Hussein, K.A.; Helwa, I.; Abdelsamid, M.F.; Aguilar-Perez, A.; Mohsen, I.; Hunter, M.; Hamrick, M.W.; Isales, C.M.; Elsalanty, M.; Hill, W.D.; Fulzele, S. Meta-Analysis and Evidence Base for the Efficacy of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Knee Cartilage Repair: Methodological Guidelines and Quality Assessment. *Stem Cells International* 2019, 2019, 3826054, DOI 10.1155/2019/3826054.

488. Han, X.; Yang, B.; Zou, F.; Sun, J. Clinical therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells derived from adipose or bone marrow for knee osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Comparative Effectiveness Research* 2020, 9, 361-374, DOI 10.2217/cer-2019-0187.

489. Zhou, W.; Lin, J.; Zhao, K.; Jin, K.; He, Q.; Hu, Y.; Feng, G.; Cai, Y.; Xia, C.; Liu, H.; Shen, W.; Hu, X.; Ouyang, H. Single-Cell Profiles and Clinically Useful Properties of Human Mesenchymal Stem Cells of Adipose and Bone Marrow Origin. *Am J Sports Med* 2019, 47, 1722-1733, DOI 10.1177/0363546519848678.
490. Wang, J.; Zhou, L.; Zhang, Y.; Huang, L.; Shi, Q. Mesenchymal stem cells - a promising strategy for treating knee osteoarthritis A META-ANALYSIS. *Bone & Joint Research* 2020, 9, 719-728, DOI 10.1302/2046-3758.910.BJR-2020-0031.R3.
491. Ha, C.; Park, Y.; Kim, S.H.; Lee, H. Intra-articular Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Clinical Outcomes and Evidence of Cartilage Repair. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2019, 35, 277+, DOI 10.1016/j.arthro.2018.07.028.
492. Wagenbrenner, M.; Mayer-Wagner, S.; Rudert, M.; Holzapfel, B.M.; Weissenberger, M. Combinations of Hydrogels and Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) for Cartilage Tissue Engineering-A Review of the Literature. *Gels* 2021, 7, 217, DOI 10.3390/gels7040217.
493. Spiller, K.L.; Maher, S.A.; Lowman, A.M. Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. *Tissue Engineering Part B-Reviews* 2011, 17, 281-299, DOI 10.1089/ten.teb.2011.0077.
494. Weissenberger, M.; Weissenberger, M.H.; Wagenbrenner, M.; Heinz, T.; Reboredo, J.; Holzapfel, B.M.; Rudert, M.; Groll, J.; Evans, C.H.; Steinert, A.F. Different types of cartilage neotissue fabricated from collagen hydrogels and mesenchymal stromal cells via SOX9, TGFB1 or BMP2 gene transfer. *Plos One* 2020, 15, e0237479, DOI 10.1371/journal.pone.0237479.
495. Deng, Z.; Jin, J.; Wang, S.; Qi, F.; Chen, X.; Liu, C.; Li, Y.; Ma, Y.; Lyu, F.; Zheng, Q. Narrative review of the choices of stem cell sources and hydrogels for cartilage tissue engineering. *Annals of Translational Medicine* 2020, 8, 1598, DOI 10.21037/atm-20-2342.
496. Wei, W.; Ma, Y.; Yao, X.; Zhou, W.; Wang, X.; Li, C.; Lin, J.; He, Q.; Leptihn, S.; Ouyang, H. Advanced hydrogels for the repair of cartilage defects and regeneration. *Bioactive Materials* 2021, 6, 998-1011, DOI 10.1016/j.bioactmat.2020.09.030.
497. Desando, G.; Bartolotti, I.; Cavallo, C.; Schiavinato, A.; Secchieri, C.; Kon, E.; Filardo, G.; Paro, M.; Grigolo, B. Short-Term Homing of Hyaluronan-Primed Cells: Therapeutic Implications for Osteoarthritis Treatment. *Tissue Engineering Part C-Methods* 2018, 24, 121-133, DOI 10.1089/ten.tec.2017.0336.
498. Feng, C.; Luo, X.; He, N.; Xia, H.; Lv, X.; Zhang, X.; Li, D.; Wang, F.; He, J.; Zhang, L.; Lin, X.; Lin, L.; Yin, H.; He, J.; Wang, J.; Cao, W.; Wang, R.; Zhou, G.; Wang, W. Efficacy and Persistence of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Hyaluronic

Acid in Osteoarthritis After Intra-articular Injection in a Sheep Model. *Tissue Engineering Part a* 2018, 24, 219-233, DOI 10.1089/ten.tea.2017.0039.

499. Lv, Z.; Chen, X.; Zhang, Y.; Li, J.; Zhao, Z.; Li, K.; Xie, G.; Liu, F.; Zhang, B. Critical-Size Defects of Animal Models for Bone Regeneration. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 2018, 8, 761-770, DOI 10.1166/jbt.2018.1821.

500. Pipino, G.; Risitano, S.; Alviano, F.; Wu, E.J.; Bonsi, L.; Vaccarisi, D.C.; Indelli, P.F. Microfractures and hydrogel scaffolds in the treatment of osteochondral knee defects: A clinical and histological evaluation. *Journal of clinical orthopaedics and trauma* 2019, 10, 67-75, DOI 10.1016/j.jcot.2018.03.001.

501. Sevastianov, V., I.; Basok, Y.B.; Kirsanova, L.A.; Grigoriev, A.M.; Kirillova, A.D.; Nemets, E.A.; Subbot, A.M.; Gautier, S., V. A Comparison of the Capacity of Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Regeneration Depending on Collagen-Based Injectable Biomimetic Scaffold Type. *Life-Basel* 2021, 11, 756, DOI 10.3390/life11080756.

502. Choi, S.M.; Lee, K.; Ryu, S.B.; Park, Y.J.; Hwang, Y.G.; Baek, D.; Choi, Y.; Park, K.H.; Park, K.D.; Lee, J.W. Enhanced articular cartilage regeneration with SIRT1-activated MSCs using gelatin-based hydrogel. *Cell Death & Disease* 2018, 9, 866, DOI 10.1038/s41419-018-0914-1.

503. Critchley, S.; Cunniffe, G.; O'Reilly, A.; Diaz-Payno, P.; Schipani, R.; McAlinden, A.; Withers, D.; Shin, J.; Alsberg, E.; Kelly, D.J. Regeneration of Osteochondral Defects Using Developmentally Inspired Cartilaginous Templates. *Tissue Engineering Part a* 2019, 25, 159-171, DOI 10.1089/ten.tea.2018.0046.

504. Jia, Z.; Zhu, F.; Li, X.; Liang, Q.; Zhuo, Z.; Huang, J.; Duan, L.; Xiong, J.; Wang, D. Repair of osteochondral defects using injectable chitosan-based hydrogel encapsulated synovial fluid-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications* 2019, 99, 541-551, DOI 10.1016/j.msec.2019.01.115.

505. Lee-Kevin, B.L.; Wang, V.T.Z.; Chan, Y.H.; Hui, J.H.P. A Novel, Minimally-Invasive Technique of Cartilage Repair in the Human Knee Using Arthroscopic Microfracture and Injections of Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronic Acid-A Prospective Comparative Study on Safety and Short-Term Efficacy. *Annals Academy of Medicine Singapore* 2012, 41, 511-517.

506. Kim, Y.; Kwon, O.R.; Choi, Y.J.; Suh, D.S.; Heo, D.B.; Koh, Y.G. Comparative Matched-Pair Analysis of the Injection Versus Implantation of Mesenchymal Stem Cells for Knee Osteoarthritis. *Am J Sports Med* 2015, 43, 2738-2746, DOI 10.1177/0363546515599632.

507. Liangjing, L.; Dai, C.; Zhang, Z.; Du, H.; Li, S.; Ye, P.; Fu, Q.; Zhang, L.; Wu, X.; Dong, Y.; Song, Y.; Zhao, D.; Pang, Y.; Bao, C. Treatment of knee osteoarthritis with intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal progenitor cells: a prospective,

randomized, double-blind, active-controlled, phase IIb clinical trial. *Stem Cell Research & Therapy* 2019, 10, 143, DOI 10.1186/s13287-019-1248-3.

508. Iijima, H.; Isho, T.; Kuroki, H.; Takahashi, M.; Aoyama, T. Effectiveness of mesenchymal stem cells for treating patients with knee osteoarthritis: a meta-analysis toward the establishment of effective regenerative rehabilitation. *Npj Regenerative Medicine* 2018, 3, UNSP 15, DOI 10.1038/s41536-018-0041-8.

509. Hernigou, P.; Auregan, J.C.; Dubory, A.; Flouzat-Lachaniette, C.H.; Chevallier, N.; Rouard, H. Subchondral stem cell therapy versus contralateral total knee arthroplasty for osteoarthritis following secondary osteonecrosis of the knee. *Int Orthop* 2018, 42, 2563-2571, DOI 10.1007/s00264-018-3916-9.

510. Ha, C.; Park, Y.; Jang, J.; Kim, M.; Kim, J.; Park, Y. Variability of the Composition of Growth Factors and Cytokines in Platelet-Rich Plasma From the Knee With Osteoarthritis. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2019, 35, 2878-+, DOI 10.1016/j.arthro.2019.04.010.

511. Marx, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001, 10, 225-8.

512. Ehrenfest, D.M.D.; Bielecki, T.; Del Corso, M.; Inchingolo, F.; Sammartino, G. Shedding light in the controversial terminology for platelet-rich products: Platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), platelet-leukocyte gel (PLG), preparation rich in growth factors (PRGF), classification and commercialism. *Journal of Biomedical Materials Research Part a* 2010, 95A, 1280-1282, DOI 10.1002/jbm.a.32894.

513. Anitua, E.; Sanchez, M.; Orive, G.; Andia, I. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *Journal of Biomedical Materials Research Part a* 2009, 90A, 1262-1263, DOI 10.1002/jbm.a.32143.

514. Anitua, E.; Sanchez, M.; Orive, G.; Andia, I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 2007, 28, 4551-4560, DOI 10.1016/j.biomaterials.2007.06.037.

515. Canalis, E.; McCarthy, T.; Centrella, M. Growth-Factors and the Regulation of Bone Remodeling. *J Clin Invest* 1988, 81, 277-281, DOI 10.1172/JCI113318.

516. Canalis, E. Growth-Factors and their Potential Clinical-Value. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1992, 75, 1-4, DOI 10.1210/jc.75.1.1.

517. Reed, G.L. Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2004, 30, 441-450, DOI 10.1055/s-2004-833479.

518. Anitua, E.; Andia, I.; Ardanza, B.; Nurden, P.; Nurden, A.T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004, 91, 4-15, DOI 10.1160/TH03-07-0440.

519. Re'em, T.; Kaminer-Israeli, Y.; Ruvinov, E.; Cohen, S. Chondrogenesis of hMSC in affinity-bound TGF-beta scaffolds. *Biomaterials* 2012, 33, 751-761, DOI 10.1016/j.biomaterials.2011.10.007.

520. Schmidt, M.B.; Chen, E.H.; Lynch, S.E. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006, 14, 403-412, DOI 10.1016/j.joca.2005.10.011.

521. Solchaga, L.A.; Penick, K.; Porter, J.D.; Goldberg, V.M.; Caplan, A.I.; Welter, J.F. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2005, 203, 398-409, DOI 10.1002/jcp.20238.

522. Ehrenfest, D.M.D.; Bielecki, T.; Mishra, A.; Borzini, P.; Inchingolo, F.; Sammartino, G.; Rasmusson, L.; Everts, P.A. In Search of a Consensus Terminology in the Field of Platelet Concentrates for Surgical Use: Platelet-Rich Plasma (PRP), Platelet-Rich Fibrin (PRF), Fibrin Gel Polymerization and Leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol* 2012, 13, 1131-1137.

523. Kon, E.; Di Matteo, B.; Delgado, D.; Cole, B.J.; Dorotei, A.; Dragoo, J.L.; Filardo, G.; Fortier, L.A.; Giuffrida, A.; Jo, C.H.; Magalon, J.; Malanga, G.A.; Mishra, A.; Nakamura, N.; Rodeo, S.A.; Sampson, S.; Sanchez, M. Platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis: an expert opinion and proposal for a novel classification and coding system. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2020, 20, 1447-1460, DOI 10.1080/14712598.2020.1798925.

524. Osterman, C.; McCarthy, M.B.R.; Cote, M.P.; Beitzel, K.; Bradley, J.; Polkowski, G.; Mazzocca, A.D. Platelet-Rich Plasma Increases Anti-inflammatory Markers in a Human Coculture Model for Osteoarthritis. *Am J Sports Med* 2015, 43, 1474-1484, DOI 10.1177/0363546515570463.

525. Wanstrath, A.W.; Hettlich, B.F.; Su, L.; Smith, A.; Zekas, L.J.; Allen, M.J.; Bertone, A.L. Evaluation of a Single Intra-Articular Injection of Autologous Protein Solution for Treatment of Osteoarthritis in a Canine Population. *Veterinary Surgery* 2016, 45, 764-774, DOI 10.1111/vsu.12512.

526. Joshi Jubert, N.; Rodriguez, L.; Mercedes Reverte-Vinaixa, M.; Navarro, A. Platelet-Rich Plasma Injections for Advanced Knee Osteoarthritis A Prospective, Randomized, Double-Blinded Clinical Trial. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine* 2017, 5, 2325967116689386, DOI 10.1177/2325967116689386.

527. Sundman, E.A.; Cole, B.J.; Karas, V.; Della Valle, C.; Tetreault, M.W.; Mohammed, H.O.; Fortier, L.A. The Anti-inflammatory and Matrix Restorative Mechanisms of Platelet-Rich Plasma in Osteoarthritis. *Am J Sports Med* 2014, 42, 35-41, DOI 10.1177/0363546513507766.
528. Gines, J.A. Effect of Leukoreduced Platelet Rich Plasma on Intra-Articular Pro-Inflammatory Cytokines in a Canine Pilot Study. *Animals* 2022, 12, 2163, DOI 10.3390/ani12172163.
529. Alves, J.C.; Santos, A.; Jorge, P.; Lavrador, C.; Carreira, L.M. A report on the use of a single intra-articular administration of autologous platelet therapy in a naturally occurring canine osteoarthritis model-a preliminary study. *Bmc Musculoskeletal Disorders* 2020, 21, 127, DOI 10.1186/s12891-020-3140-9.
530. Alves, J.C.; Santos, A.; Jorge, P. Platelet-rich plasma therapy in dogs with bilateral hip osteoarthritis. *BMC VETERINARY RESEARCH* 2021, 17, DOI 10.1186/s12917-021-02913-x.
531. Venator, K.P.; Frye, C.W.; Gamble, L.; Wakshlag, J.J. Assessment of a Single Intra-Articular Stifle Injection of Pure Platelet Rich Plasma on Symmetry Indices in Dogs with Unilateral or Bilateral Stifle Osteoarthritis from Long-Term Medically Managed Cranial Cruciate Ligament Disease. *VETERINARY MEDICINE-RESEARCH AND REPORTS* 2020, 11, 31-38, DOI 10.2147/VMRR.S238598.
532. Cuervo, B.; Rubio, M.; Chicharro, D.; Damia, E.; Santana, A.; Carrillo, J.M.; Del Romero, A.; Vilar, J.M.; Ceron, J.J.; Sopena, J.J. Objective Comparison between Platelet Rich Plasma Alone and in Combination with Physical Therapy in Dogs with Osteoarthritis Caused by Hip Dysplasia. *Animals* 2020, 10, 175, DOI 10.3390/ani10020175.
533. Catarino, J.; Carvalho, P.; Santos, S.; Martins, A.; Requicha, J. Treatment of canine osteoarthritis with allogeneic platelet-rich plasma: review of five cases. *OPEN VETERINARY JOURNAL* 2020, 10, 226-231, DOI 10.4314/ovj.v10i2.12.
534. Lacko, M.; Harvanova, D.; Slovinska, L.; Matuska, M.; Balog, M.; Lackova, A.; Spakova, T.; Rosocha, J. Effect of Intra-Articular Injection of Platelet-Rich Plasma on the Serum Levels of Osteoarthritic Biomarkers in Patients with Unilateral Knee Osteoarthritis. *Journal of Clinical Medicine* 2021, 10, 5801, DOI 10.3390/jcm10245801.
535. Tang, J.Z.; Nie, M.J.; Zhao, J.Z.; Zhang, G.C.; Zhang, Q.; Wang, B. Platelet-rich plasma versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2020, 15, 403, DOI 10.1186/s13018-020-01919-9.
536. Wu, Q.; Luo, X.; Xiong, Y.; Liu, G.; Wang, J.; Chen, X.; Mi, B. Platelet-rich plasma versus hyaluronic acid in knee osteoarthritis: A meta-analysis with the consistent ratio of injection. *Journal of Orthopaedic Surgery* 2020, 28, 2309499019887660, DOI 10.1177/2309499019887660.

537. Trams, E.; Kulinski, K.; Kozar-Kaminska, K.; Pomianowski, S.; Kaminski, R. The Clinical Use of Platelet-Rich Plasma in Knee Disorders and Surgery-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Life-Basel* 2020, 10, 94, DOI 10.3390/life10060094.

538. Ferrara, P.E.; Codazza, S.; Coraci, D.; Malerba, G.; Ferriero, G.; Ronconi, G. State of art in intra-articular hip injections of different medications for osteoarthritis: a systematic review. *Bmc Musculoskeletal Disorders* 2021, 22, 997, DOI 10.1186/s12891-021-04866-6.

539. Xu, Z.; He, Z.; Shu, L.; Li, X.; Ma, M.; Ye, C. Intra-Articular Platelet-Rich Plasma Combined With Hyaluronic Acid Injection for Knee Osteoarthritis Is Superior to Platelet-Rich Plasma or Hyaluronic Acid Alone in Inhibiting Inflammation and Improving Pain and Function. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2021, 37, 903-915, DOI 10.1016/j.arthro.2020.10.013.

540. Zhang, Q.; Liu, T.; Gu, Y.; Gao, Y.; Ni, J. Efficacy and safety of platelet-rich plasma combined with hyaluronic acid versus platelet-rich plasma alone for knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2022, 17, 499, DOI 10.1186/s13018-022-03398-6.

541. Everts, P.; Onishi, K.; Jayaram, P.; Lana, J.F.; Mautner, K. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21, 7794, DOI 10.3390/ijms21207794.

542. Zhang, Y.; Pizzute, T.; Pei, M. Anti-inflammatory strategies in cartilage repair. *Tissue Eng Part B Rev* 2014, 20, 655-668, DOI 10.1089/ten.TEB.2014.0014.

543. Zdziennicka, J.; Szponder, T.; Wessely-Szponder, J. Application of Natural Neutrophil Products for Stimulation of Monocyte-Derived Macrophages Obtained before and after Osteochondral or Bone Injury. *Microorganisms* 2021, 9, 124, DOI 10.3390/microorganisms9010124.

544. Abbas, A.; Du, J.T.; Dhotar, H.S. The Effect of Leukocyte Concentration on Platelet-Rich Plasma Injections for Knee Osteoarthritis A Network Meta-Analysis. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2022, 104, 559-570, DOI 10.2106/JBJS.20.02258.

545. Delgado, D.; Garate, A.; Vincent, H.; Bilbao, A.M.; Patel, R.; Fiz, N.; Sampson, S.; Sánchez, M. Current concepts in intraosseous Platelet-Rich Plasma injections for knee osteoarthritis. *J Clin Orthop Traum* 2019, 10, 36-41, DOI 10.1016/j.jcot.2018.09.017.

546. Muinos-Lopez, E.; Delgado, D.; Sanchez, P.; Paiva, B.; Anitua, E.; Fiz, N.; Aizpurua, B.; Guadilla, J.; Padilla, S.; Granero-Molto, F.; Prosper, F.; Sanchez, M. Modulation of Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells by Intra-Articular and Intraosseous Platelet Rich Plasma Administration. *Stem Cells International* 2016, 2016, 1247950, DOI 10.1155/2016/1247950.

547. Ganguly, P.; Fiz, N.; Beitia, M.; Owston, H.E.; Delgado, D.; Jones, E.; Sanchez, M. Effect of Combined Intraosseous and Intraarticular Infiltrations of Autologous Platelet-Rich Plasma on Subchondral Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Hip Osteoarthritis. *Journal of Clinical Medicine* 2022, 11, 3891, DOI 10.3390/jcm11133891.

548. Anitua, E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999, 14, 529-535.

549. Keating, S.C.J.; Thomas, A.A.; Flecknell, P.A.; Leach, M.C. Evaluation of EMLA Cream for Preventing Pain during Tattooing of Rabbits: Changes in Physiological, Behavioural and Facial Expression Responses. *Plos One* 2012, 7, e44437, DOI 10.1371/journal.pone.0044437.

550. Goebel, L.; Orth, P.; Muller, A.; Zurakowski, D.; Bucker, A.; Cucchiaroni, M.; Pape, D.; Madry, H. Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 9.4 T--comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthritis Cartilage* 2012, 20, 1046-1055, DOI 10.1016/j.joca.2012.05.010 [doi].

551. Mainil-Varlet, P.; Van Damme, B.; Nestic, D.; Knutsen, G.; Kandel, R.; Roberts, S. A New Histology Scoring System for the Assessment of the Quality of Human Cartilage Repair: ICRS II. *Am J Sports Med* 2010, 38, 880-890, DOI 10.1177/0363546509359068.

552. Laverty, S.; Girard, C.A.; Williams, J.M.; Hunziker, E.B.; Pritzker, K.P.H. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage* 2010, 18, S53-S65, DOI 10.1016/j.joca.2010.05.029.

553. Sun, Y.; Feng, Y.; Zhang, C.Q.; Chen, S.B.; Cheng, X.G. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop* 2010, 34, 589-597, DOI 10.1007/s00264-009-0793-2.

554. Slimi, F.; Zribi, W.; Trigui, M.; Amri, R.; Couiaa, N.; Abid, C.; Rebai, M.A.; Boudawara, T.; Jebahi, S.; Keskes, H. The effectiveness of platelet-rich plasma gel on full-thickness cartilage defect repair in a rabbit model. *Bone & Joint Research* 2021, 10, 192-202, DOI 10.1302/2046-3758.103.BJR-2020-0087.R2.

555. Szponder, T.; Latalski, M.; Danielewicz, A.; Krac, K.; Kozera, A.; Drzewiecka, B.; Ngoc, D.N.; Dobko, D.; Wessely-Szponder, J. Osteoarthritis: Pathogenesis, Animal Models, and New Regenerative Therapies. *Journal of Clinical Medicine* 2023, 12, 5, DOI 10.3390/jcm12010005.

556. Chen, D.; Shen, J.; Zhao, W.; Wang, T.; Han, L.; Hamilton, J.L.; Im, H. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res* 2017, 5, 16044, DOI 10.1038/boneres.2016.44.

557. Marshall, W.G.; Bockstahler, B.A.; Hulse, D.A.; Carmichael, S. A review of osteoarthritis and obesity: current understanding of the relationship and benefit of obesity treatment and

prevention in the dog. *VETERINARY AND COMPARATIVE ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY* 2009, 22, 339-345, DOI 10.3415/VCOT-08-08-0069.

558. Tateiwa, D.; Yoshikawa, H.; Kaito, T. Cartilage and Bone Destruction in Arthritis: Pathogenesis and Treatment Strategy: A Literature Review. *Cells* 2019, 8, 818, DOI 10.3390/cells8080818.

559. Hunter, D.J.; Bierma-Zeinstra, S. Osteoarthritis. *Lancet* 2019, 393, 1745-1759, DOI S0140-6736(19)30417-9 [pii].

560. Van Spil, W.E.; Kubassova, O.; Boesen, M.; Bay-Jensen, A.; Mobasher, A. Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets. *Biochem Pharmacol* 2019, 165, 41-48, DOI 10.1016/j.bcp.2019.02.037.

561. Cohen-Solal, M.; Funck-Brentano, T.; Hay, E. Animal models of osteoarthritis for the understanding of the bone contribution. *BoneKEy reports* 2013, 2, 422, DOI 10.1038/bonekey.2013.156.

562. Poole, R.; Blake, S.; Buschmann, M.; Goldring, S.; Lavery, S.; Lockwood, S.; Matyas, J.; McDougall, J.; Pritzker, K.; Rudolph, K.; van den Berg, W.; Yaksh, T. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2010, 18, S10-S16, DOI 10.1016/j.joca.2010.05.027.

563. Kuyinu, E.L.; Narayanan, G.; Nair, L.S.; Laurencin, C.T. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2016, 11, 19, DOI 10.1186/s13018-016-0346-5.

564. Bendele, A.M. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuron Interact* 2001, 1, 363-76.

565. Esdaille, C.J.; Ude, C.C.; Laurencin, C.T. Regenerative Engineering Animal Models for Knee Osteoarthritis. *Regenerative Engineering and Translational Medicine* 2022, 8, 284-297, DOI 10.1007/s40883-021-00225-y.

566. Aulin, C.; Jensen-Waern, M.; Ekman, S.; Hägglund, M.; Engstrand, T.; Hilborn, J.; Hedenqvist, P. Cartilage repair of experimentally induced osteochondral defects in New Zealand White rabbits. *Lab Anim* 2013, 47, 58-65, DOI 10.1177/0023677212473716.

567. Altan, E.; Aydin, K.; Erkocak, O.; Senaran, H.; Ugras, S. The effect of platelet-rich plasma on osteochondral defects treated with mosaicplasty. *Int Orthop* 2014, 38, 1321-1328, DOI 10.1007/s00264-013-2275-9.

568. Du, D.; Sugita, N.; Liu, Z.; Moriguchi, Y.; Nakata, K.; Myoui, A.; Yoshikawa, H. Repairing Osteochondral Defects of Critical Size Using Multiple Costal Grafts: An Experimental Study. *Cartilage* 2015, 6, 241-251, DOI 10.1177/1947603515591628.

569. Meng, X.; Ziadlou, R.; Grad, S.; Alini, M.; Wen, C.; Lai, Y.; Qin, L.; Zhao, Y.; Wang, X. Animal Models of Osteochondral Defect for Testing Biomaterials. *Biochem Res Int* 2020, 2020, 9659412, DOI 10.1155/2020/9659412.
570. Chiang, E.; Ma, H.; Wang, J.; Liu, C.; Chen, T.; Hung, S. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in Combination with Hyaluronic Acid for the Treatment of Osteoarthritis in Rabbits. *Plos One* 2016, 11, e0149835, DOI 10.1371/journal.pone.0149835.
571. Chen, Y.; Hsu, Y.; Tan, K.P.; Fang, H.; Chang, C. Intraarticular injection for rabbit knee osteoarthritis: effectiveness among hyaluronic acid, platelet-rich plasma, and mesenchymal stem cells. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2018, 91, 138-145, DOI 10.1016/j.jtice.2018.05.051.
572. ASTM International. Standard Guide for In Vivo Assessment of Implantable Devices Intended to Repair or Regenerate Articular Cartilage. ASTM International 2005.
573. Guo, J.L.; Kim, Y.S.; Orchard, E.A.; van den Beucken, Jeroen J J P; Jansen, J.A.; Wong, M.E.; Mikos, A.G. A Rabbit Femoral Condyle Defect Model for Assessment of Osteochondral Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* 2020, 26, 554-564, DOI 10.1089/ten.TEC.2020.0261.
574. Berenbaum, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage* 2013, 21, 16-21, DOI 10.1016/j.joca.2012.11.012 [doi].
575. Liu-Bryan, R.; Terkeltaub, R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2015, 11, 35-44, DOI 10.1038/nrrheum.2014.162.
576. Loeser, R.F.; Pathmasiri, W.; Sumner, S.J.; McRitchie, S.; Beavers, D.; Saxena, P.; Nicklas, B.J.; Jordan, J.; Guermazi, A.; Hunter, D.J.; Messier, S.P. Association of urinary metabolites with radiographic progression of knee osteoarthritis in overweight and obese adults: an exploratory study. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016, 24, 1479-1486, DOI 10.1016/j.joca.2016.03.011.
577. Kumavat, R.; Kumar, V.; Malhotra, R.; Pandit, H.; Jones, E.; Ponchel, F.; Biswas, S. Biomarkers of Joint Damage in Osteoarthritis: Current Status and Future Directions. *Mediators Inflamm* 2021, 2021, 5574582, DOI 10.1155/2021/5574582 [doi].
578. Attur, M.; Krasnokutsky, S.; Statnikov, A.; Samuels, J.; Li, Z.; Friese, O.; Le Graverand-Gastineau, M.H.; Rybak, L.; Kraus, V.B.; Jordan, J.M.; Aliferis, C.F.; Abramson, S.B. Low-Grade Inflammation in Symptomatic Knee Osteoarthritis Prognostic Value of Inflammatory Plasma Lipids and Peripheral Blood Leukocyte Biomarkers. *Arthritis & Rheumatology* 2015, 67, 2905-2915, DOI 10.1002/art.39279.

579. Daghestani, H.N.; Pieper, C.F.; Kraus, V.B. Soluble Macrophage Biomarkers Indicate Inflammatory Phenotypes in Patients With Knee Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2015, 67, 956-965, DOI 10.1002/art.39006.

580. Hosnijeh, F.S.; Siebuhr, A.S.; Uitterlinden, A.G.; Oei, E.H.G.; Hofman, A.; Karsdal, M.A.; Bierma-Zeinstra, S.M.; Bay-Jensen, A.C.; van Meurs, J.B.J. Association between biomarkers of tissue inflammation and progression of osteoarthritis: evidence from the Rotterdam study cohort. *Arthritis Research & Therapy* 2016, 18, 81, DOI 10.1186/s13075-016-0976-3.

581. van Spil, W.E.; Szilagy, I.A. Osteoarthritis year in review 2019: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis and Cartilage* 2020, 28, 296-315, DOI 10.1016/j.joca.2019.11.007.

582. Kraus, V.B.; Collins, J.E.; Hargrove, D.; Losina, E.; Nevitt, M.; Katz, J.N.; Wang, S.X.; Sandell, L.J.; Hoffmann, S.C.; Hunter, D.J.; OA Biomarkers Consortium Predictive validity of biochemical biomarkers in knee osteoarthritis: data from the FNIH OA Biomarkers Consortium. *Ann Rheum Dis* 2017, 76, 186-195, DOI 10.1136/annrheumdis-2016-209252.

583. Vilar, J.M.; Rubio, M.; Spinella, G.; Cuervo, B.; Sopena, J.; Cugat, R.; Garcia-Ballebó, M.; Dominguez, J.M.; Granados, M.; Tvarijonaviciute, A.; Ceron, J.J.; Carrillo, J.M. Serum Collagen Type II Cleavage Epitope and Serum Hyaluronic Acid as Biomarkers for Treatment Monitoring of Dogs with Hip Osteoarthritis. *PLoS One* 2016, 11, e0149472, DOI 10.1371/journal.pone.0149472 [doi].

584. Chu, Q.; Lopez, M.; Hayashi, K.; Ionescu, M.; Billingham, R.C.; Johnson, K.A.; Poole, A.R.; Markel, M.D. Elevation of a collagenase generated type II collagen neoepitope and proteoglycan epitopes in synovial fluid following induction of joint instability in the dog. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002, 10, 662-669, DOI 10.1053/joca.2002.0812.

585. Goranov, N.V. Serum markers of lipid peroxidation, antioxidant enzymatic defense, and collagen degradation in an experimental (Pond-Nuki) canine model of osteoarthritis. *Vet Clin Pathol* 2007, 36, 192-195, DOI 10.1111/j.1939-165x.2007.tb00208.x [doi].

586. Lu, Y.; Markel, M.D.; Swain, C.; Kaplan, L.D. Development of partial thickness articular cartilage injury in an ovine model. *Journal of Orthopaedic Research* 2006, 24, 1974-1982, DOI 10.1002/jor.20249.

587. Coppelman, E.B.; David, F.H.; Toth, F.; Ernst, N.S.; Trumble, T.N. The association between collagen and bone biomarkers and radiographic osteoarthritis in the distal tarsal joints of horses. *Equine Vet J* 2020, 52, 391-398, DOI 10.1111/evj.13187.

588. Huebner, J.L.; Kraus, V.B. Assessment of the utility of biomarkers of osteoarthritis in the guinea. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006, 14, 923-930, DOI 10.1016/j.joca.2006.03.007.

589. Legrand, C.B.; Lambert, C.J.; Comblain, F.V.; Sanchez, C.; Henrotin, Y.E. Review of Soluble Biomarkers of Osteoarthritis: Lessons From Animal Models. *Cartilage* 2017, 8, 211-233, DOI 10.1177/1947603516656739.
590. Hayashi, K.; Kim, S.; Lansdowne, J.L.; Kapatkin, A.; Dejardin, L.M. Evaluation of a Collagenase Generated Osteoarthritis Biomarker in Naturally Occurring Canine Cruciate Disease. *Veterinary Surgery* 2009, 38, 117-121, DOI 10.1111/j.1532-950X.2008.00446.x.
591. Conrozier, T.; Poole, A.R.; Ferrand, F.; Mathieu, P.; Vincent, F.; Piperno, M.; Verret, C.; Ionescu, M.; Vignon, E. Serum concentrations of type II collagen biomarkers (C2C, C1, 2C and CPII) suggest different pathophysiologies in patients with hip osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2008, 26, 430-435, DOI 2329 [pii].
592. Furmann, D.; Necas, D.; Rebenda, D.; Cipek, P.; Vrbka, M.; Krupka, I.; Hartl, M. The Effect of Synovial Fluid Composition, Speed and Load on Frictional Behaviour of Articular Cartilage. *Materials* 2020, 13, 1334, DOI 10.3390/ma13061334.
593. Ohnishi, A.; Osaki, T.; Matahira, Y.; Tsuka, T.; Imagawa, T.; Okamoto, Y.; Minami, S. Evaluation of the Chondroprotective Effects of Glucosamine and Fish Collagen Peptide on a Rabbit ACLT Model Using Serum Biomarkers. *JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE* 2013, 75, 421-429, DOI 10.1292/jvms.12-0240.
594. Nganvongpanit, K.; Itthiarbha, A.; Ong-Chai, S.; Kongtawelert, P. Evaluation of serum chondroitin sulfate and hyaluronan: biomarkers for osteoarthritis in canine hip dysplasia. *Journal of Veterinary Science* 2008, 9, 317-325, DOI 10.4142/jvs.2008.9.3.317.
595. Pavelka, K.; Forejtova, S.; Gatterova, J.; Vilim, V.; Spacek, P.; Pavelkova, A. Pentisidine and hyaluronic acid serum levels may predict joint space narrowing in knee OA. *Ann Rheum Dis* 2003, 62, 259.
596. Kotaska, J.; Hanouskova, L.; Prusa, R.; Trc, T.; Kotaska, K. Concentration of Hyaluronic Acid in Synovial Fluid as an Indicator of Severity and Degree of Impairment in Patients Suffering from Gonarthrosis. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2021, 88, 83-86.
597. Martinez-Martinez, A.; Ruiz-Santiago, F.; Garcia-Espinosa, J. Platelet-rich plasma: myth or reality? *Radiologia* 2018, 60, 465-475, DOI 10.1016/j.rx.2018.08.006.
598. Andia, I.; Maffulli, N. Biological Therapies in Regenerative Sports Medicine. *Sports Medicine* 2017, 47, 807-828, DOI 10.1007/s40279-016-0620-z.
599. Anitua, E.; Prado, R.; Sanchez, M.; Orive, G. Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. *Operative Techniques in Orthopaedics* 2012, 22, 25-32, DOI 10.1053/j.oto.2012.01.004.

600. Weibrich, G.; Hansen, T.; Kleis, W.; Buch, R.; Hitzler, W. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004, 34, 665-671, DOI 10.1016/j.bone.2003.12.010.

601. Simental-Mendía, M.A.; Vílchez-Cavazos, J.F.; Martínez-Rodríguez, H.G. El plasma rico en plaquetas en osteoartrosis de rodilla: una alternativa de tratamiento. Artículo de revisión. *Cirugía y Cirujanos* 2015, DOI 10.1016/j.circir.2014.06.001.

602. Shuler, F.D.; Georgescu, H.I.; Niyibizi, C.; Studer, R.K.; Mi, Z.; Johnstone, B.; Robbins, R.D.; Evans, C.H. Increased matrix synthesis following adenoviral transfer of a transforming growth factor beta1 gene into articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2000, 18, 585-592, DOI 10.1002/jor.1100180411.

603. Madry, H.; Zurakowski, D.; Trippel, S.B. Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther* 2001, 8, 1443-1449, DOI 10.1038/sj.gt.3301535.

604. Madry, H.; Emkey, G.; Zurakowski, D.; Trippel, S.B. Overexpression of human fibroblast growth factor 2 stimulates cell proliferation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *J Gene Med* 2004, 6, 238-245, DOI 10.1002/jgm.488.

605. Fortier, L.A.; Barker, J.U.; Strauss, E.J.; McCarrel, T.M.; Cole, B.J. The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clin Orthop* 2011, 469, 2706-2715, DOI 10.1007/s11999-011-1857-3.

606. Elik, H.; Dogu, B.; Yilmaz, F.; Begoglu, F.A.; Kuran, B. Platelet rich plasma in osteoarthritis the efficiency of platelet rich plasma treatment in patients with knee osteoarthritis. *Journal of back and musculoskeletal rehabilitation* 2019, DOI 10.3233/BMR-181374.

607. Xie, X.; Zhang, C.; Tuan, R.S. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy* 2014, 16, 204, DOI 10.1186/ar4493.

608. Zubair, U.; Salam, O.; Zubair, Z. Role of Intra-articular Platelet Rich Plasma in the Management of Osteoarthritis: A Review. *Cureus* 2018, 10, e3359, DOI 10.7759/cureus.3359 [doi].

609. Martin, A.R.; Patel, J.M.; Zlotnick, H.M.; Carey, J.L.; Mauck, R.L. Emerging therapies for cartilage regeneration in currently excluded 'red knee' populations. *Npj Regenerative Medicine* 2019, 4, 12, DOI 10.1038/s41536-019-0074-7.

610. Mor, A.; Grijota, M.; Norgaard, M.; Munthe, J.; Lind, M.; Deruaz, A.; Pedersen, A.B. Trends in arthroscopy-documented cartilage injuries of the knee and repair procedures among 15-60-year-old patients. *Scand J Med Sci Sports* 2015, 25, e400-e407, DOI 10.1111/sms.12330.

611. Zylinska, B.; Silmanowicz, P.; Sobczynska-Rak, A.; Jarosz, L.; Szponder, T. Treatment of Articular Cartilage Defects: Focus on Tissue Engineering. *In Vivo* 2018, 32, 1289-1300, DOI 10.21873/invivo.11379.
612. Morrison, S.J.; Wandycz, A.M.; Hemmati, H.D.; Wright, D.E.; Weissman, I.L. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 1997, 124, 1929-1939.
613. Evans, M.; Kaufman, M. Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature* 1981, 292, 154-156, DOI 10.1038/292154a0.
614. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006, 126, 663-676, DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.
615. Wagers, A.J.; Weissman, I.L. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004, 116, 639-648, DOI 10.1016/S0092-8674(04)00208-9.
616. Majdic, G. Stem Cells in Veterinary Medicine - from Biology to Clinic. *Slovenian Veterinary Research* 2018, 55, 465-469, DOI 10.26873/SVR-676-2018. Available online:
617. Ilas, D.C.; Churchman, S.M.; Baboolal, T.; Giannoudis, P., V.; Aderinto, J.; McGonagle, D.; Jones, E. The simultaneous analysis of mesenchymal stem cells and early osteocytes accumulation in osteoarthritic femoral head sclerotic bone. *Rheumatology* 2019, 58, 1777-1783, DOI 10.1093/rheumatology/kez130.
618. Johnson, K.A. A Stem Cell-Based Approach to Cartilage Repair. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013, 21, S4, DOI 10.1016/j.joca.2013.02.019.
619. Wu, X.; Wang, W.; Meng, C.; Yang, S.; Duan, D.; Xu, W.; Liu, X.; Tang, M.; Wang, H. Regulation of differentiation in trabecular bone-derived mesenchymal stem cells by T cell activation and inflammation. *Oncol Rep* 2013, 30, 2211-2219, DOI 10.3892/or.2013.2687.
620. Lee, W.; Kim, H.J.; Kim, K.; Kim, G.B.; Jin, W. Intra-Articular Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase IIb, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Stem Cells Translational Medicine* 2019, 8, 504-511, DOI 10.1002/sctm.18-0122.
621. Neybecker, P.; Henrionnet, C.; Pape, E.; Mainard, D.; Galois, L.; Loeuille, D.; Gillet, P.; Pinzano, A. In vitro and in vivo potentialities for cartilage repair from human advanced knee osteoarthritis synovial fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 2018, 9, 329, DOI 10.1186/s13287-018-1071-2.
622. Greif, D.N.; Kouroupis, D.; Murdock, C.J.; Griswold, A.J.; Kaplan, L.D.; Best, T.M.; Correa, D. Infrapatellar Fat Pad/Synovium Complex in Early-Stage Knee Osteoarthritis: Potential New

Target and Source of Therapeutic Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2020, 8, 860, DOI 10.3389/fbioe.2020.00860.

623. Turajane, T.; Chaveewanakorn, U.; Fongsarun, W.; Aojanepong, J.; Papadopoulos, K.I. Avoidance of Total Knee Arthroplasty in Early Osteoarthritis of the Knee with Intra-Articular Implantation of Autologous Activated Peripheral Blood Stem Cells versus Hyaluronic Acid: A Randomized Controlled Trial with Differential Effects of Growth Factor Addition. *Stem Cells International* 2017, 2017, 8925132, DOI 10.1155/2017/8925132.

624. Xiang, X.; Zhu, S.; He, H.; Yu, X.; Xu, Y.; He, C. Mesenchymal stromal cell-based therapy for cartilage regeneration in knee osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy* 2022, 13, 14, DOI 10.1186/s13287-021-02689-9.

625. Xu, Y.; Malladi, P.; Wagner, D.R.; Longaker, M.T. Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration. *Curr Opin Mol Ther* 2005, 7, 300-305.

626. Sackett, S.D.; Mitchell, S.A.; Quirini, N.; Soh, C.; Caspi, I.; Mikat, A.; Huangfu, D.; Odorico, J. 209.7: An Inducible Genome Engineering Approach for Preventing Immune Rejection of hESC-derived Beta Cells. *Transplantation* 2021, 105, S16, DOI 10.1097/01.tp.0000804364.20737.4c.

627. Mizuno, H.; Tobita, M.; Uysal, A.C. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *Stem Cells* 2012, 30, 804-810, DOI 10.1002/stem.1076.

628. Pak, J.; Lee, J.H.; Pak, N.J.; Park, K.S.; Jeon, J.H.; Jeong, B.C.; Lee, S.H. Clinical Protocol of Producing Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction for Potential Cartilage Regeneration. *Jove-Journal of Visualized Experiments* 2018, e58363, DOI 10.3791/58363.

629. Astor, D.E.; Hoelzler, M.G.; Harman, R.; Bastian, R.P. Patient factors influencing the concentration of stromal vascular fraction (SVF) for adipose-derived stromal cell (ASC) therapy in dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* 2013, 77, 177-182.

630. Wang, M.; Crisostomo, P.R.; Herring, C.; Meldrum, K.K.; Meldrum, D.R. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 2006, 291, R880-R884, DOI 10.1152/ajpregu.00280.2006.

631. Wolf, D.; Wolf, A.M. Mesenchymal stem cells as cellular immunosuppressants. *Lancet* 2008, 371, 1553-1554, DOI 10.1016/S0140-6736(08)60666-2.

632. Manning, C.N.; Martel, C.; Sakiyama-Elbert, S.E.; Silva, M.J.; Shah, S.; Gelberman, R.H.; Thomopoulos, S. Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate tendon fibroblast

responses to macrophage-induced inflammation in vitro. *Stem Cell Research & Therapy* 2015, 6, 74, DOI 10.1186/s13287-015-0059-4.

633. Nava, M.M.; Raimondi, M.T.; Pietrabissa, R. Controlling Self-Renewal and Differentiation of Stem Cells via Mechanical Cues. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 797410, DOI 10.1155/2012/797410.

634. Frith, J.E.; Thomson, B.; Genever, P.G. Dynamic Three-Dimensional Culture Methods Enhance Mesenchymal Stem Cell Properties and Increase Therapeutic Potential. *Tissue Engineering Part C-Methods* 2010, 16, 735-749, DOI 10.1089/ten.tec.2009.0432.

635. Gegg, C.; Yang, F. The Effects of ROCK Inhibition on Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis Are Culture Model Dependent. *Tissue Engineering Part a* 2020, 26, 130-139, DOI 10.1089/ten.tea.2019.0068.

636. ter Huurne, M.; Schelbergen, R.; Blattes, R.; Blom, A.; de Munter, W.; Grevers, L.C.; Jeanson, J.; Noel, D.; Casteilla, L.; Jorgensen, C.; van den Berg, W.; van Lent, Peter L. E. M. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2012, 64, 3604-3613, DOI 10.1002/art.34626.

637. Park, M.; Moon, S.; Baek, J.; Lee, E.; Jung, K.; Kim, E.; Kim, D.; Lee, J.; Kwok, S.; Min, J.; Kim, S.J.; Park, S.; Cho, M. Metformin Augments Anti-Inflammatory and Chondroprotective Properties of Mesenchymal Stem Cells in Experimental Osteoarthritis. *Journal of Immunology* 2019, 203, 127-136, DOI 10.4049/jimmunol.1800006.

638. Bennell, K.L.; Hunter, D.J.; Paterson, K.L. Platelet-Rich Plasma for the Management of Hip and Knee Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2017, 19, 24, DOI 10.1007/s11926-017-0652-x.

639. Fusco, G.; Gambaro, F.M.; Di Matteo, B.; Kon, E. Injections in the osteoarthritic knee: a review of current treatment options. *Efort Open Reviews* 2021, 6, 501-509, DOI 10.1302/2058-5241.6.210026.

640. Xu, F.; Li, H.; Yin, Q.; Liang, Z.; Huang, M.; Chi, G.; Huang, L.; Liu, D.; Nan, H. Effect of activated autologous platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in vitro. *American Journal of Translational Research* 2015, 7, 257-270.

641. Ramezanifard, R.; Kabiri, M.; Ahvaz, H.H. Effects of Platelet Rich Plasma and Chondrocyte Co-Culture on Msc Chondrogenesis, Hypertrophy and Pathological Responses. *Excli Journal* 2017, 16, 1031-1045, DOI 10.17179/excli2017-453.

642. Zhu, Y.; Yuan, M.; Meng, H.Y.; Wang, A.Y.; Guo, Q.Y.; Wang, Y.; Peng, J. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013, 21, 1627-1637, DOI 10.1016/j.joca.2013.07.017.

643. Kasten, P.; Beverungen, M.; Lorenz, H.; Wieland, J.; Fehr, M.; Geiger, F. Comparison of Platelet-Rich Plasma and VEGF-Transfected Mesenchymal Stem Cells on Vascularization and Bone Formation in a Critical-Size Bone Defect. *Cells Tissues Organs (Print)* 2012, 196, 523-533, DOI 10.1159/000337490.

644. Lee, J.; Min, H.J.; Park, H.J.; Lee, S.; Seong, S.C.; Lee, M.C. Synovial Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells Supported by Platelet-Rich Plasma Can Repair Osteochondral Defects in a Rabbit Model. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2013, 29, 1034-1046, DOI 10.1016/j.arthro.2013.02.026.

645. Zhao, J.; Liang, G.; Han, Y.; Yang, W.; Xu, N.; Luo, M.; Pan, J.; Liu, J.; Zeng, L. Combination of mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) in the treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open* 2022, 12, e061008-061008, DOI 10.1136/bmjopen-2022-061008.

646. Vilar, J.M.; Morales, M.; Santana, A.; Spinella, G.; Rubio, M.; Cuervo, B.; Cugat, R.; Carrillo, J.M. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *Bmc Veterinary Research* 2013, 9, 131, DOI 10.1186/1746-6148-9-131.

647. Cuervo, B., 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. Universidad CEU Cardenal Herrera, Moncada (Valencia), 2015.

648. Arican, M.; Uney, K.; Parlak, K.; Uzunlu, E.O.; Sonmez, G. Proteases and Collagenase Enzymes Activity After Autologous Platelet-Rich Plasma, Bio-Physically Activated PRP and Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 2022, 28, 437-445, DOI 10.9775/kvfd.2022.27357.

649. Koh, Y.; Kwon, O.; Kim, Y.; Choi, Y. Comparative Outcomes of Open-Wedge High Tibial Osteotomy With Platelet-Rich Plasma Alone or in Combination With Mesenchymal Stem Cell Treatment: A Prospective Study. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2014, 30, 1453-1460, DOI 10.1016/j.arthro.2014.05.036.

650. Bastos, R.; Mathias, M.; Andrade, R.; Bastos, R.; Balduino, A.; Schott, V.; Rodeo, S.; Espregueira-Mendes, J. Intra-articular injections of expanded mesenchymal stem cells with and without addition of platelet-rich plasma are safe and effective for knee osteoarthritis. *Knee*

Surgery Sports Traumatology Arthroscopy 2018, 26, 3342-3350, DOI 10.1007/s00167-018-4883-9.

651. Bastos, R.; Mathias, M.; Andrade, R.; Amaral, R.J.F.C.; Schott, V.; Balduino, A.; Bastos, R.; Oliveira, J.M.; Reis, R.L.; Rodeo, S.; Espregueira-Mendes, J. Intra-articular injection of culture-expanded mesenchymal stem cells with or without addition of platelet-rich plasma is effective in decreasing pain and symptoms in knee osteoarthritis: a controlled, double-blind clinical trial. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 2020, 28, 1989-1999, DOI 10.1007/s00167-019-05732-8.

652. Lamo-Espinosa, J.M.; Blanco, J.F.; Sanchez, M.; Moreno, V.; Granero-Molto, F.; Sanchez-Guijo, F.; Crespo-Cullel, I.; Mora, G.; San Vicente, D.D.; Pompei-Fernandez, O.; Aquerreta, J.D.; Nunez-Cordoba, J.M.; Vitoria Sola, M.; Valenti-Azcarate, A.; Andreu, E.J.; del Consuelo del Canizo, M.; Valenti-Nin, J.R.; Prosper, F. Phase II multicenter randomized controlled clinical trial on the efficacy of intra-articular injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells with platelet rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis. *Journal of Translational Medicine* 2020, 18, 356, DOI 10.1186/s12967-020-02530-6.

653. Pan, J.; Zhou, X.; Li, W.; Novotny, J.E.; Doty, S.B.; Wang, L. In Situ Measurement of Transport between Subchondral Bone and Articular Cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 2009, 27, 1347-1352, DOI 10.1002/jor.20883.

654. Barr, A.J.; Campbell, T.M.; Hopkinson, D.; Kingsbury, S.R.; Bowes, M.A.; Conaghan, P.G. A systematic review of the relationship between subchondral bone features, pain and structural pathology in peripheral joint osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2015, 17, 228, DOI 10.1186/s13075-015-0735-x.

655. Madry, H.; Orth, P.; Cucchiari, M. On the Horizon From the ORS. *J Am Acad Orthop Surg* 2016, 24, E45-E46, DOI 10.5435/JAAOS-D-16-00096.

656. Palmer, A.J.R.; Brown, C.P.; McNally, E.G.; Price, A.J.; Tracey, I.; Jezzard, P.; Carr, A.J.; Glyn-Jones, S. Non-invasive imaging of cartilage in early osteo arthritis. *Bone & Joint Journal* 2013, 95B, 738-746, DOI 10.1302/0301-620X.95B6.31414.

657. Stewart, H.L.; Kawcak, C.E. The Importance of Subchondral Bone in the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Frontiers in Veterinary Science* 2018, 5, 178, DOI 10.3389/fvets.2018.00178.

658. Cohen, S.B.; Sharkey, P.F. Subchondroplasty for Treating Bone Marrow Lesions. *J Knee Surg* 2016, 29, 555-563, DOI 10.1055/s-0035-1568988 [doi].

659. Bonadio, M.B.; Giglio, P.N.; Helito, C.P.; Pécora, J.R.; Camanho, G.L.; Demange, M.K. Subchondroplasty for treating bone marrow lesions in the knee - initial experience. *Rev Bras Ortop* 2017, 52, 325-330, DOI 10.1016/j.rboe.2017.04.003 [doi].

660. Bessa, F.; Rasio, J.; Newhouse, A.; Nwachukwu, B.U.; Nho, S. Surgical Treatment of Subchondral Bone Cysts of the Acetabulum With Calcium Phosphate Bone Substitute Material in Patients Without Advanced Arthritic Hips. *Arthrosc Tech* 2020, 9, e1375-e1379, DOI 10.1016/j.eats.2020.05.018 [doi].

661. Chua, K.; Kang, J.Y.B.; Ng, F.D.J.; Pang, H.N.; Lie, D.T.T.; Silva, A.; Chang, P.C.C. Subchondroplasty for Bone Marrow Lesions in the Arthritic Knee Results in Pain Relief and Improvement in Function. *J Knee Surg* 2021, 34, 665-671, DOI 10.1055/s-0039-1700568 [doi].

662. Sanchez, M.; Delgado, D.; Sanchez, P.; Muinos-Lopez, E.; Paiva, B.; Granero-Molto, F.; Prosper, F.; Pompei, O.; Carlos Perez, J.; Azofra, J.; Padilla, S.; Fiz, N. Combination of Intra-Articular and Intraosseous Injections of Platelet Rich Plasma for Severe Knee Osteoarthritis: A Pilot Study. *Biomed Research International* 2016, 4868613, DOI 10.1155/2016/4868613.

663. Deppermann, C.; Kubes, P. Start a fire, kill the bug: The role of platelets in inflammation and infection. *Innate Immunity* 2018, 24, 335-348, DOI 10.1177/1753425918789255.

664. Everts, P.A.; van Erp, A.; DeSimone, A.; Cohen, D.S.; Gardner, R.D. Platelet Rich Plasma in Orthopedic Surgical Medicine. *Platelets* 2021, 32, 163-174, DOI 10.1080/09537104.2020.1869717.

665. Su, K.; Bai, Y.M.; Wang, J.; Zhang, H.S.; Liu, H.; Ma, S.Y. Comparison of hyaluronic acid and PRP intra-articular injection with combined intra-articular and intraosseous PRP injections to treat patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2018, 37, 1341-1350, DOI 10.1007/s10067-018-3985-6.

666. Barman, A.; Prakash, S.; Sahoo, J.; Mukherjee, S.; Maiti, R.; Roy, S.S. Single intra-articular injection with or without intra-osseous injections of platelet-rich plasma in the treatment of osteoarthritis knee: A single-blind, randomized clinical trial. *Injury-International Journal of the Care of the Injured* 2022, 53, 1247-1253, DOI 10.1016/j.injury.2022.01.012.

667. Fiz, N.; Delgado, D.; Garate, A.; Sanchez, P.; Oraa, J.; Bilbao, A.M.; Guadilla, J.; Sanchez, M. Intraosseous infiltrations of Platelet-Rich Plasma for severe hip osteoarthritis: A pilot study. *Journal of clinical orthopaedics and trauma* 2020, 11, S585-S590, DOI 10.1016/j.jcot.2019.12.012.

668. Lychagin, A., V.; Garkavi, A., V.; Islaieh, O.I.; Katunyan, P., I.; Bobrov, D.S.; Yavlieva, R.H.; Tselisheva, E.Y. Effectiveness of Intraosseous Infiltration of Autologous Platelet-Rich Plasma in the Area of the Bone Marrow Edema in Osteoarthritis of the Knee Joint. *Bulletin of Russian State Medical University* 2019, 50-56, DOI 10.24075/vrgmu.2019.053.

669. Lychagin, A.; Lipina, M.; Garkavi, A.; Islaieh, O.; Timashev, P.; Ashmore, K.; Kon, E. Intraosseous injections of platelet rich plasma for knee bone marrow lesions treatment: one year follow-up. *Int Orthop* 2021, 45, 355-363, DOI 10.1007/s00264-020-04546-5.

670. Jones, E.A.; English, A.; Henshaw, K.; Kinsey, S.E.; Markham, A.F.; Emery, P.; McGonagle, D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 817-827, DOI 10.1002/art.20203.

671. Sekiya, I.; Ojima, M.; Suzuki, S.; Yamaga, M.; Horie, M.; Koga, H.; Tsuji, K.; Miyaguchi, K.; Ogishima, S.; Tanaka, H.; Muneta, T. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research* 2012, 30, 943-949, DOI 10.1002/jor.22029.

672. Barman, A.; Bandyopadhyay, D.; Mohakud, S.; Sahoo, J.; Maiti, R.; Mukherjee, S.; Prakash, S.; Roy, S.S.; Viswanath, A. Comparison of clinical outcome, cartilage turnover, and inflammatory activity following either intra-articular or a combination of intra-articular with intra-osseous platelet-rich plasma injections in osteoarthritis knee: A randomized, clinical trial. *Injury* 2023, 54, 728-737, DOI 10.1016/j.injury.2022.11.036.

673. Philippart, P.; Meuleman, N.; Stamatopoulos, B.; Najjar, M.; Pieters, K.; De Bruyn, C.; Bron, D.; Lagneaux, L. In vivo production of mesenchymal stromal cells after injection of autologous platelet-rich plasma activated by recombinant human soluble tissue factor in the bone marrow of healthy volunteers. *Tissue Eng Part A* 2014, 20, 160-170, DOI 10.1089/ten.TEA.2013.0244.

674. Delgado, D.; Garate, A.; Vincent, H.; Bilbao, A.M.; Patel, R.; Fiz, N.; Sampson, S.; Sanchez, M. Current concepts in intraosseous Platelet-Rich Plasma injections for knee osteoarthritis. *Journal of clinical orthopaedics and trauma* 2019, 10, 36-41, DOI 10.1016/j.jcot.2018.09.017.

Anexos

Estudio de la Administración Intraósea de Células Mesenquimales Derivadas de la Grasa y su Asociación con Plasma Rico en Plaquetas en el Manejo de Lesiones Condrales Agudas. Modelo Experimental en Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Anexo 1. Treating full depth cartilage defects with intraosseous infiltration of plasma rich in growth factors: An experimental study in rabbits

Torres-Torrillas M, Damiá E, Cerón JJ, Carrillo JM, Pelaez P, Miguel L, del Romero A, Rubio M and Sopena JJ. Treating Full Depth Cartilage Defects with Intraosseous Infiltration of Plasma Rich in Growth Factors: An Experimental Study in Rabbits. CARTILAGE. 2021;13(2_suppl):766S-773S. doi:10.1177/19476035211057246.

Anexo 2. Intra-osseous infiltration of adipose mesenchymal stromal cells and plasma rich in growth factors to treat acute full depth cartilage defects in a rabbit model: Serum osteoarthritis biomarkers and macroscopical assessment

Torres-Torrillas M, Damiá E, Peláez P, Miguel-Pastor L, Cuervo B, Cerón JJ, Carrillo JM, Rubio M and Sopena JJ (2022) Intra-osseous infiltration of adipose mesenchymal stromal cells and plasma rich in growth factors to treat acute full depth cartilage defects in a rabbit model: Serum osteoarthritis biomarkers and macroscopical assessment. Front. Vet. Sci. 9:1057079. doi: 10.3389/fvets.2022.1057079.

Anexo 3. Intra-Osseous Plasma Rich in Growth Factors Enhances Cartilage and Subchondral Bone Regeneration in Rabbits with Acute Full Depth Chondral Defect: Histological Assessment

Torres-Torrillas M, Damiá E, del Romero A, Peláez P, Miguel-Pastor L, Chicharro D, Carrillo JM, Rubio M and Sopena JJ (2023) Intra-Osseous Plasma Rich in Growth Factors Enhances Cartilage and Subchondral Bone Regeneration in Rabbits with Acute Full Depth Chondral Defect: Histological Assessment. Front. Vet. Sci. 10. Ahead of print.

Anexo 4. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Promising Tool in the Treatment of Musculoskeletal Diseases

Torres-Torrillas M, Rubio M, Damia E, Cuervo B, del Romero A, Peláez P, Chicharro D, Miguel L, Sopena JJ (2019) Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Promising Tool in the Treatment of Musculoskeletal Diseases. Int J Mol Sci. 2019 Jun 25;20(12):3105. doi: 10.3390/ijms20123105.

Anexo 1

Cartilage repair mechanisms

Treating Full Depth Cartilage Defects with Intraosseous Infiltration of Plasma Rich in Growth Factors: An Experimental Study in Rabbits

CARTILAGE
2021, Vol. 13(Suppl 2) 7665–7735
© The Author(s) 2021
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/19476035211057246
journals.sagepub.com/home/CAR
SAGE

Marta Torres-Torrillas^{1,2}, Elena Damiá^{1,2} , José J. Cerón³, José M. Carrillo^{1,2}, Pau Peláez^{1,2}, Laura Miguel^{1,2}, Ayla Del Romero^{1,2}, Mónica Rubio^{1,2}, and Joaquín J. Sopena^{1,2}

Abstract

Objective. Intraarticular (IA) administration of platelet-rich plasma (PRP) has been proposed as a new strategy to halt osteoarthritis (OA) progression. In patients with severe OA, its potential is limited because it is unable to reach the subchondral bone, so a new strategy is needed, and intraosseous (IO) infiltration has been suggested. The purpose is to assess the impact of IA together with IO infiltration of plasma rich in growth factors (PRGF) in serum hyaluronic acid (HA) and type II collagen cleavage neopeptide (C2C) levels. **Design.** A total of 32 rabbits were included in the study and randomly divided into 2 groups: control and treatment. A 4-mm chondral defect was created in the medial femoral condyle and IA followed by IO infiltration were performed. Serum C2C and HA levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests before infiltration and 28, 56, and 84 days post-infiltration. **Results.** Significant lower C2C serum levels were obtained in treatment group (IA + IO infiltration of PRGF) at 84 days post-infiltration than in control group (IA infiltration of PRGF + IO infiltration of saline solution), while no significant differences between groups were reported at any other study times. Regarding HA, at 56 days post-infiltration, greater significant levels were seen in the treatment group. However, at 84 days post-infiltration, no significant differences were obtained, although lower levels were reported in the treatment group. **Conclusions.** Despite inconclusive, the results suggest that the combination of IA and IO infiltration with PRGF may enhance cartilage and subchondral bone regeneration, but further studies are needed.

Keywords

platelet-rich plasma, intraosseous infiltration, biomarkers, cartilage, osteoarthritis

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a chronic disease commonly associated with damage and loss of articular cartilage, together with progressive destruction of intraarticular (IA) structures, which leads to pain, loss of function, and poor quality of life.¹ Even though traditionally OA was considered a cartilage-driven disease, during the last decade, some studies have suggested a direct implication of the subchondral bone (SB) and synovial membrane (SM) in the degradation process of articular cartilage (AC).^{2–4} All the joint tissues are crucial for maintaining the homeostasis, and a disruption in the anabolic-catabolic balance results in cartilage degeneration, osteophyte formation, and inflammation of SM.⁵ Additionally, in severe cases of OA, the SB undergoes changes, including structural defects such as progressive

¹Bioregenerative Medicine and Applied Surgery Research Group, Department of Animal Medicine and Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, Valencia, Spain

²García Cugat Foundation CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, Valencia, Spain

³Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis, Interlab-UMU, Regional Campus of International Excellence, Campus Mare Nostrum, University of Murcia, Murcia, Spain

Supplementary material for this article is available on the Cartilage website at <http://cart.sagepub.com/supplemental>.

Corresponding Author:

Mónica Rubio, Bioregenerative Medicine and Applied Surgery Research Group, Department of Animal Medicine and Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, C/Tirant lo Blanc 7, Alfara del Patriarca, 46115 Valencia, Spain.
Email: mrubio@uchceu.es

replacement of the subchondral marrow with fibroneurovascular mesenchymal tissue, demineralization of bone, microcracks, and bone marrow lesions (BMLs).^{4,6}

Early diagnosis of the disease is crucial for its management, and with this purpose, several biomarkers have been identified and validated. In addition, these biomarkers allow clinicians to detect people at high risk of developing OA, monitor disease progression, and assess the response to treatments.⁷ Type II collagen cleavage neoepitope (C2C) is a collagenous biomarker, and it is a neoepitope created by the cleavage of type II collagen by collagenases. Type II collagen is the major form of collagen in the AC, and it has been proven that its cleavage products, including C2C, are upregulated in early stages of OA, while in chronic stages they are downregulated.^{8,9} Hyaluronic acid (HA) is the most important component of the synovial fluid (SF) and provides smoothness to the joint and resistance of cartilage to compression. Its serum and SF levels are correlated with radiographic progression of the disease and with the clinical severity of OA.^{10,11} HA has proven to be useful not only in OA diagnosis but also in identifying disease's severity and prognosis. The serum concentration of HA is thought to reflect the extent of synovitis, which accelerates the progression of the disease by producing proteases and cytokines.¹² Serum HA concentration is elevated in patients with osteoarthritis, and higher concentrations are correlated to radiological and clinical worsening of the pathology.¹³ On the contrary, HA levels decrease in the SF of patients with osteoarthritis.¹⁴

Conservative treatments, including nonsteroidal anti-inflammatory drugs, analgesics, and IA infiltrations of HA or steroids, are focused on relieving the symptoms, but none of these treatments can reverse the damage or halt the progression of OA, making arthroplasty the only solution for patients with osteoarthritis.¹⁵ In recent years, IA infiltrations with regenerative therapies such as mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) have emerged as an alternative treatment with promising results.¹⁶ Despite the positive outcomes reported in several studies, this therapy still has some limitations, such as the administration mode and the differences between PRP obtention protocols.⁵ The most used form of administration is IA injection, which is effective in patients with mild OA, but, in patients with severe OA, the therapeutic potential is limited because the PRP is unable to reach the deeper layers of the AC and the SB.^{6,17,18} Recent studies have shown the importance of the SB in the pathogenesis of OA, and the existing communication between the cartilage and the SB.¹⁹ Following these basis, intraosseous (IO) infiltration with PRP has been proposed.

We hypothesize that the combination of IA and IO infiltration of PRP will improve cartilage healing and regenerative properties observed when PRP is only IA infiltrated in patients with osteoarthritis, especially in those in which the

SB is affected. Based on this hypothesis, the purpose of the study is to assess the impact of IO infiltration of PRP together with IA infiltration of PRP in rabbits with acute chondral lesion by measuring serum OA biomarkers' (C2C and HA) levels.

Methods

This study was approved by the Ethics Committee of Animal Welfare (CEEA) of the university CEU Cardenal Herrera of Valencia (Spain) according to the Spanish Policy for Animal Protection (RD118/2021), which complies with European Union Directive 2010/63/UE, with the following approval code: 2019/VSC/PEA/0153.

The sample size was calculated by a power analysis considering results (mean = 10.83 and standard deviation = 2.041) published by Wang *et al.*²⁰ in a study in which only IA PRP was administered. An alpha level of 0.02 and a power of 80% were established.

Animals

A total of 32 healthy 6 months old, female New Zealand rabbits, with an average weight of 4.63 kg, were used to carry out a prospective randomized and blinded experimental study. Animals were housed in individual big cages, with room enough to move freely, and with water and food *ad libitum*. Rabbits were daily monitored for signs of pain, infection, and weight loss. An acclimatization period of 15 days was established before starting the experiment to allow animal adaptation.

Before surgery, a complete physical examination, hematology, and serum biochemical analyses were also performed, and all results were within normal reference range values, therefore no animals were excluded from the study.

After surgery, an anti-inflammatory drug (meloxicam 0.3 mg/kg SC q24h; Metacam®, Boehringer Ingelheim, Spain) together with an antibiotic (enrofloxacin 10 mg/kg SC q24h; Ganadexil®, Invesa, Spain) was given to each animal during a 7-day period. In addition, the rabbit Grimace scale was daily performed and if the score was equal or higher than 4, rescue analgesia was provided (buprenorphine 0.1 mg/kg SC q8h; Bupaq, Richter Pharma AG, Austria).

At the end of the study, all animals were sacrificed in compliance with Spanish Policy for Animal Protection (RD118/2021). After sedation with dexmedetomidine (0.05 mg/kg IM; Dexdomitor®, Esteve, Spain) and ketamine (10 mg/kg IM; Imalgene®, Merial, Spain), an IV injection of pentobarbital sodium (150 mg/kg) in the marginal ear vein was given.

Study Groups

Animals were randomly divided into 2 different groups following a simple random sampling method by using the

random number function in Microsoft Excel. Sixteen animals were included in each treatment group:

- Control group (CT): Animals in CT group received a single IA injection of Plasma Rich in Growth Factors® (PRGF) and a single IO injection of saline solution.
- Treatment group (TRT): Animals in TRT group received a single IA injection together with a single IO injection of PRGF.

Plasma Rich in Growth Factors Preparation

PRGF-Endoret® technology was used to obtain an autologous preparation of PRP. A total of 15 mL of blood was collected from the auricular artery of each rabbit under sterile conditions in vacutainer sodium citrate 3.8% tubes (BD Vacutainer® 9NC, New Jersey, USA). Animals were sedated with intramuscular dexmedetomidine (0.05 mg/kg; Dexdomitor®, Esteve, Spain), ketamine (10 mg/kg; Imalgene®, Merial, Spain), and morphine (1 mg/kg; B-Braun, Germany).

The tubes were centrifuged at 460g for 8 minutes (PRGF® System III, Biotechnology Institute®, Álava, Spain) to separate the different blood phases. A sterile pipette was used to collect the PRGF fraction and transfer it into a sterile tube.

Immediately before the IA and IO infiltration, 10% calcium chloride was added to PRGF (50 µL/mL of PRGF) to activate platelets for growth factors release.

Chondral Defect Model and Treatments

Rabbits were intramuscular premedicated with dexmedetomidine (0,05 mg/kg; Dexdomitor®, Esteve, Spain), ketamine (10 mg/kg; Imalgene®, Merial, Spain) and morphine (1 mg/kg; B-Braun, Germany). The medial area of both forelimbs was clipped and prepared for aseptic surgery. General anesthesia was mask induced and maintained with sevoflurane (Sevoflo®, Esteve, Spain).

A cutaneous skin incision of 10 mm was made in the margin of the medial femoral condyle, while a complete flexion of the knee was maintained. After the incision of the fascia and joint capsule, the medial femoral condyle was exposed. Keeping the joint in complete flexion, the loading area was identified and a defect of 4 mm in diameter and 5 mm in depth was created with a drill bit with the help of a drilling guide. A layer suture was performed using 3/0 polyglyconate (Novosyn® Quick, B-Braun, Germany), simple stitches were used in the joint capsule and fascia, while cross stitches were used for the subcutaneous tissue and the skin. Then, the same procedure was carried out in the contralateral knee.

Consecutively, IA infiltration of both knees with PRP was conducted with a 22-G needle. With the knee in flexion, the needle was inserted lateral to the patellar tendon

and an infiltration with 0.25 mL of PRP was performed in all animals. Finally, the IO infiltration was performed. An 18-G spinal needle was inserted with smooth rotation movements perpendicular to the femur, in the lateral supracondylar area, and the infiltration with 0.5 mL of saline solution or PRP (depending on the treatment group) was conducted.

Biomarkers' Study

A total of 3.5 mL of blood was collected from the auricular artery of each rabbit in vacutainer serum tubes with clot accelerator and gel serum separator (BD Vacutainer® SST™ II Advance, BD, New Jersey, USA). Blood samples were collected just before the surgery and 28, 56, and 84 days after the infiltration.

Blood samples were centrifuged at 3,000g for 5 minutes and the obtained serum was frozen at -80°C in eppendorf tubes. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests for C2C (IBEX® 60-1001-001) and HA (TECO® TE1017-2) were used to determine serum concentration of these biomarkers.

These commercially available kits consist of a multi-well microtiter plate, and these wells are coated with the antigen of interest. The wells are filled with dilutions of the rabbits' serum and if antibodies against the antigen are present, they will bind to the antigen fixed to the wells. The wells are then washed out to remove all unbound antibodies and then a secondary antibody covalently conjugated to an enzyme, bind to the primary antibodies. The wells are washed out again and a substrate which reacts with the enzymes is added producing a color change. Finally, the microtiter plate is placed into a plate reader to measure the coloring reaction.

Statistical Analysis

The data were processed using the SPSS 20.0 program for Windows (SPSS®Inc., Chicago, USA).

A descriptive study of the mean, standard deviation, and confidence intervals was made for each variable. A value of $P < 0.05$ was considered significant. Analysis of variance (ANOVA) tests were used to compare normally distributed variables, while nonparametric Kruskal-Wallis tests were used to compare the variables that did not follow a normal distribution. Normality of data was tested in every quantitative variable with Shapiro-Wilk test and variance homogeneity with Levene test.

Results

Serum Hyaluronic Acid Levels

No significant differences (P -value= 0.3254) between groups were demonstrated at baseline and both groups exhibited the

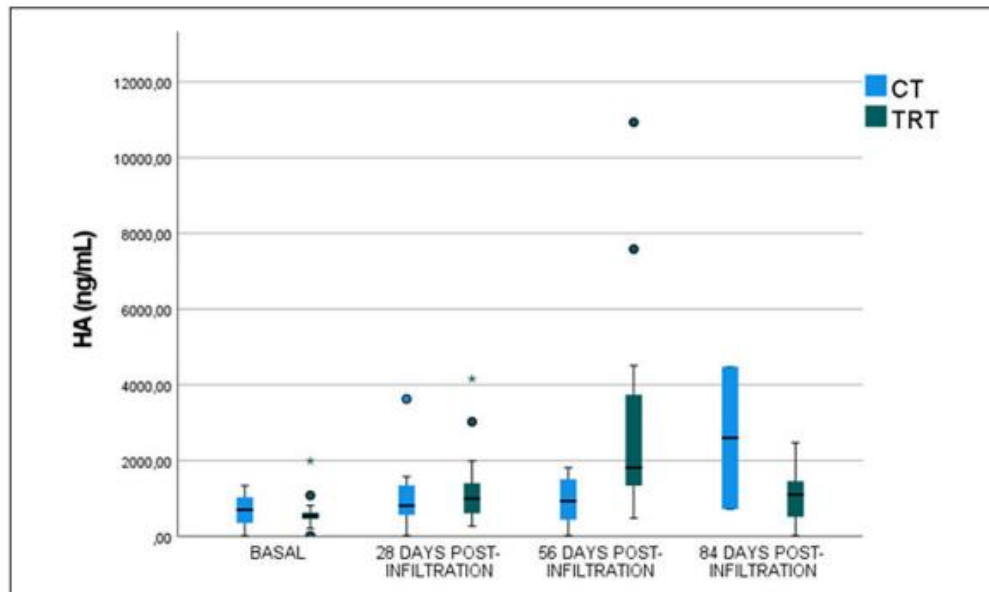


Figure 1. Serum HA levels before infiltration and 28, 56, and 84 days post-infiltration in both control and treatment groups. HA = hyaluronic acid; CT = control group; TRT = treatment group.

lowest serum HA concentration (CT: 683.86 ± 413.68 ng/mL; TRT: 631.62 ± 480.83 ng/mL) (Fig. 1).

No significant differences were observed in serum HA levels between groups (P -value = 0.5082) 28 days post-infiltration. However, rabbits in CT group showed lower HA concentrations ($1,058.54 \pm 933.49$ ng/mL) than rabbits included in TRT group ($1,336.20 \pm 1,114.80$ ng/mL) (Fig. 1).

Significantly greater (P -value = 0.02072) serum HA levels were obtained in animals included in TRT group, which received an IA infiltration of PRGF together with an IO infiltration of PRGF ($3,119.60 \pm 3,040.71$ ng/mL), than in CT rabbits (974.47 ± 623.86 ng/mL), 56 days post-infiltration (Fig. 1).

At 84 days post-infiltration, no significant differences were observed in serum HA concentration (P -value = 0.0721), although lower values were reported in TRT group ($1,099.86 \pm 762.32$ ng/mL) than in CT group ($1,554.59 \pm 1,722.73$ ng/mL) (Fig. 1).

Serum Type II Collagen Neoepitope Levels

At baseline, no significant differences (P -value = 0.4872) between groups were reported (CT group: 7.520 ± 3.91 ng/mL; TRT group: 9.64 ± 4.83 ng/mL) (Fig. 2).

No significant differences were obtained between groups 28 days post-infiltration (P -value = 0.5139); however, lower serum C2C concentration was reported in TRT group (14.59 ± 6.64 ng/mL) than in CT group (21.961 ± 28.52 ng/mL) (Fig. 2).

Furthermore, no significant differences were observed between groups (P -value = 0.8625) 56 days post-infiltration, but lower levels were reported in TRT group (15.13 ± 6.27 ng/mL) than in CT group (16.17 ± 20.27 ng/mL) (Fig. 2).

Significant lower C2C serum values were obtained 84 days post-infiltration (P -value = 0.0376) in TRT group (7.26 ± 3.29 ng/mL) than in CT group (24.15 ± 29.24 ng/mL) (Fig. 2).

Discussion

In our study, lower C2C and HA serum levels were obtained in rabbits 28 days after IA combined with IO PRGF infiltration, although no significant differences were reported. At 56 days follow-up, lower C2C serum levels were reported in TRT group, but contrarily, at the same study time, significant greater HA serum levels were reported in this group. On the contrary, significant lower C2C serum levels were obtained in rabbits 84 days after IA and IO infiltration of

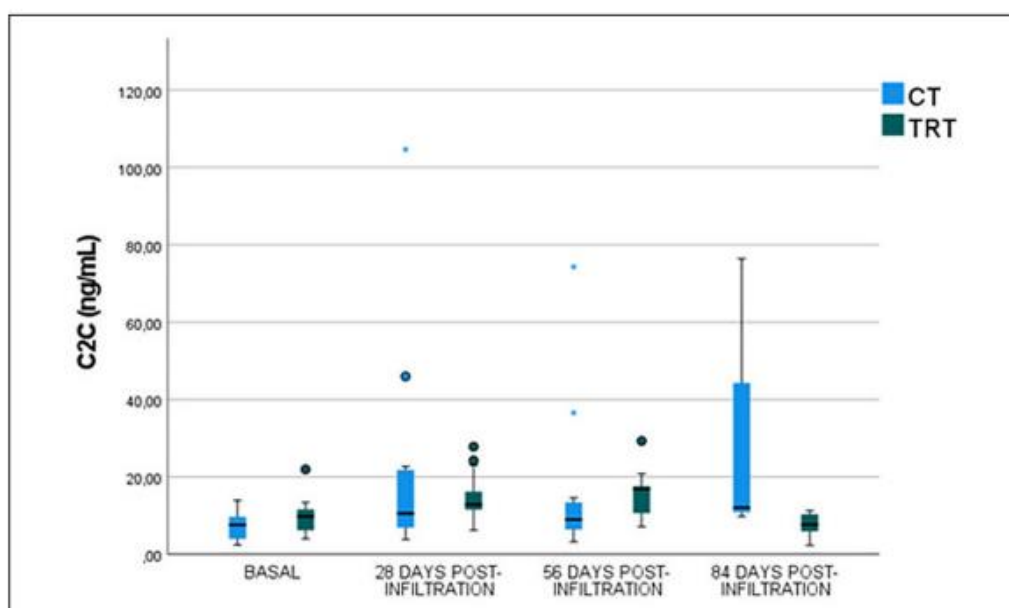


Figure 2. Serum C2C levels before infiltration and 28, 56, and 84 days post-infiltration in both control and treatment groups. C2C = type II collagen cleavage neopeptide; CT = control group; TRT = treatment group.

PRGF, as well as lower HA serum levels. In addition, no complications or adverse events were described.

The use of PRP to treat OA and other musculoskeletal disorders has gained interest in clinical practice during the last decade. The most used form of PRP administration is IA infiltration, and even though promising outcomes have been observed in patients with mild OA, this technique only targets the AC and the SM without reaching the SB.²¹ IA infiltrations combined with IO infiltrations to additionally target SB can provide a more comprehensive treatment.²² Moreover, it has been proposed that infiltrating PRP directly into the SB could act on the MSCs of this tissue, and these cells would be maintained within the PRP matrix and modulate the repair process of the SB.²³

Although the role of SB in OA etiology, development, and treatment still being discussed, for now, a crosstalk between cartilage and SB has been demonstrated in animal models, showing that vessels and channels from the SB reach the cartilage.²⁴ These vessels are more abundant in patients with OA and they are important to allow the transit of molecules involved in joint homeostasis and cartilage nutrition.^{18,19,25-27} Furthermore, it has been revealed that SB remodeling is an important process in OA pathogenesis.²⁸

Some IO injection techniques have been used in the past to treat other bony pathologies, such as BMLs with an

injectable form of calcium phosphate. This technique has shown good results in pain reduction with small risk of complications.²⁹⁻³² IO biologics have also been used to treat osteonecrosis by injecting PRP or MSCs into the area of necrosis, reporting positive radiological and clinical results.^{33,34} The literature regarding IO infiltration with PRP to treat OA is scarce, but in the last years, some small pilot or observational studies with favorable results have been published.^{5,21,35-38} The novel technique of IA combined with IO injections of PRP to treat patients suffering from OA was introduced by Sánchez *et al.*⁵ in 2014 and since then, some pilot studies have shown this treatment to be an effective method in relieving pain and improving joint functionality.^{5,21,35-38} All 4 published studies in this field showed improvements relative to baseline in patient-reported outcome measures (PROMs), and the 3 studies presenting visual analogue scale (VAS) measures reported a reduction in pain compared to baseline, as did the 3 studies reporting Western Ontario and McMaster Universities scores (WOMAC). Also, Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) rose compared with baseline scores in all studies.^{5,21,35-38} In addition to these scales, Sánchez *et al.*⁵⁵ assessed the inflammatory response by quantifying MSCs in SF and concluded that MSC levels were lower in patients after IO infiltration. On the contrary, in a study conducted

by Lychagin *et al.*,³⁸ serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels were initially high in the patients included in the experimental group compared to the same biomarker in healthy control patients, and continued to rise 1 and 3 months following the infiltration, but posterior analysis showed stable COMP levels.

In our study, C2C and HA biomarker levels were assessed in rabbits with acute cartilage full depth defect 28, 56, and 84 days after IA infiltration of PRGF together with IO infiltration of saline solution or PRGF (CT and TRT group, respectively). The utility of C2C concentration, both in serum and SF, to monitor disease progression and response to treatment has been reported in various animal models, including dogs,³⁹⁻⁴¹ sheep,⁴² horses,⁴³ mice,⁴⁴ guinea pigs,⁴⁵ and rabbits.^{46,47} In all studies, a correlation between C2C levels and OA severity was observed, and its serum or SF concentration was higher after joint damage. In our study, serum C2C levels were lower in rabbits treated with IA and IO infiltration of PRGF at 28, 56, and 84 days follow-up. No statistically significant differences were reported between groups at 28 and 56 days follow-up, while significant differences were obtained at 84 days follow-up. These results may suggest that IA PRGF combined with IO PRGF infiltration enhance cartilage healing better than IA infiltration of PRGF alone, and these differences are more remarkable 84 days after treatment.

Serum HA concentration is raised in patients with osteoarthritis, and higher concentrations are correlated with radiological and clinical worsening of the pathology in humans,¹³ dogs,^{40,48,49} and rabbits.⁵⁰ In our study, at 28 days follow-up, lower serum HA levels were reported in the TRT group, but contrarily, significant greater serum HA levels were observed in rabbits that underwent IA and IO infiltration of PRGF at 56 days, followed by a sudden fall of these levels at 84 days follow-up. Although no significant differences between groups were obtained 84 days after infiltration, lower serum levels were reported in TRT group. On the contrary, serum HA levels in CT group remained low and stable during all the study times, showing a little increase at 84 days follow-up. The high increase, followed by the abrupt fall in HA levels in rabbits treated with IA and IO PRGF, might be suggestive of an accelerated chondrogenesis process compared with rabbits only treated with IA PRGF, but further investigation is required.

The results obtained in the present study cannot be fully compared with the ones obtained in pilot or observational studies, in which better clinical outcomes were reported in patients with osteoarthritis after IO infiltration of PRP.^{5,21,35-38}

The present study is the first experimental animal study in this field; in addition, it is one of the first in which objective data have been assessed. The main limitation is the short follow-up period and the lack of studies to compare our results with. Moreover, only 2 OA biomarkers have

been analyzed. Despite the positive results that IO infiltration of PRP have shown in previous pilot studies, further experimental trials are needed to evaluate histological and biomechanical changes after treatment that could better explain the results obtained in our study. In addition, further clinical trials with greater sample size and longer follow-up period are required, so long-term IO PRP effects can be assessed. This study leaves a door open for future research in which other biological therapies, such as MSCs, could be IO infiltrated.

Conclusions

PRP is a promising, minimally invasive therapeutic tool for bone and cartilage pathologies, including OA; however, the route of administration seems to be important in its clinical efficacy. Some studies have reported hopeful results when PRP is IA administered in patients with mild OA; nevertheless, its efficacy is limited in patients with severe OA. It seems that the combination of IA application with IO infiltration targets AC, the SM as well as the SB, all the key tissues in the development of OA, which makes this administration route an auspicious tool in the pathology management.

Our results are inconclusive, but better outcomes in rabbits treated with IA together with IO PRGF are suggested, although further studies are needed in this field to correlate these results with histological chondral changes, and biomechanical and clinical outcomes. Even if no clinical complications were reported, studies with longer follow-up periods are needed to evaluate long-term IO PRGF infiltration impact.

Acknowledgments and Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This research was funded by Garcia Cugat Foundation CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery.


Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Ethical Approval

This study was approved by the Ethics Committee of Animal Welfare (CEEAA) of the university CEU Cardenal Herrera of Valencia (approval code: 2019/VSC/PEA/0153) and was conducted in accordance with the ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) guidelines.

ORCID iD

Elena Damiá  <https://orcid.org/0000-0003-2156-9207>

References

- Kloppenborg M, Berenbaum F. Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(3):242–8.
- Barr AJ, Campbell TM, Hopkinson D, Kingsbury SR, Bowes MA, Conaghan PG. A systematic review of the relationship between subchondral bone features, pain and structural pathology in peripheral joint osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:228.
- Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*. 2012;51(2):249–57.
- Campbell TM, Churchman SM, Gomez A, McGonagle D, Conaghan PG, Ponchel F, et al. Mesenchymal stem cell alterations in bone marrow lesions in patients with hip osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(7):1648–59.
- Sanchez M, Fiz N, Guadilla J, Padilla S, Anitua E, Sánchez P, et al. Intraosseous infiltration of platelet-rich plasma for severe knee osteoarthritis. *Arthrosc Tech*. 2014;3(6):e713–7.
- Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone*. 2012;51(2):204–11.
- van Spil WE, Szilagyi IA. Osteoarthritis year in review 2019: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(3):296–315.
- Conrozier T, Poole AR, Ferrand F, Mathieu P, Vincent F, Piperno M, et al. Serum concentrations of type II collagen biomarkers (C2C, C1, 2C and CPII) suggest different pathophysiological mechanisms in patients with hip osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(3):430–5.
- Gamero P, Ayril X, Rousseau JC, Christgau S, Sandell LJ, Dougados M, et al. Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(10):2613–24.
- Garvican ER, Vaughan-Thomas A, Clegg PD, Innes JF. Biomarkers of cartilage turnover. part 2: non-collagenous markers. *Vet J*. 2010;185(1):43–9.
- Filková M, Senolt L, Braun M, Hulejová H, Pavelková A, Sléglová O, et al. Serum hyaluronic acid as a potential marker with a predictive value for further radiographic progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(12):1615–9.
- Jiao Q, Wei L, Chen C, Li P, Wang X, Li Y, et al. Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronic acid are sensitive serum biomarkers for early cartilage lesions in the knee joint. *Biomarkers*. 2016;21(2):146–51.
- Kraus VB, Hargrove DE, Hunter DJ, Renner JB, Jordan JM. Establishment of reference intervals for osteoarthritis-related soluble biomarkers: the FNIH/OARSI OA biomarkers consortium. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):179–85.
- Kumavat R, Kumar V, Malhotra R, Pandit H, Jones E, Ponchel F, et al. Biomarkers of joint damage in osteoarthritis: current status and future directions. *Mediators Inflamm*. 2021;2021:5574582.
- Ambra LF, de Girolamo L, Mosier B, Gomoll AH. Review: interventions for cartilage disease: current state-of-the-art and emerging technologies. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(7):1363–73.
- Kennedy MI, Whitney K, Evans T, LaPrade RF. Platelet-rich plasma and cartilage repair. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2018;11(4):573–82.
- Kwan Tat S, Lajeunesse D, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(1):51–70.
- Pan J, Wang B, Li W, Zhou X, Scherr T, Yang Y, et al. Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints. *Bone*. 2012;51(2):212–7.
- Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(11):632–44.
- Wang Z, Zhai C, Fei H, Hu J, Cui W, Wang Z, et al. Intraarticular injection autologous platelet-rich plasma and bone marrow concentrate in a goat osteoarthritis model. *J Orthop Res*. 2018;36(8):2140–6.
- Sanchez M, Delfado D, Pompei O, Pérez JC, Sánchez P, Garate A, et al. Treating severe knee osteoarthritis with combination of intra-osseous and intra-articular infiltrations of platelet-rich plasma: an observational study. *Cartilage*. 2019;10(2):245–53.
- Delgado D, Garate A, Vincent H, Bilbao AM, Patel R, Fiz N, et al. Current concepts in intraosseous platelet-rich plasma injections for knee osteoarthritis. *J Clin Orthop Traum*. 2019;10(1):36–41.
- Yuan XL, Meng HY, Wang YC, Peng J, Guo QY, Wang AY, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(8):1077–89.
- Sundaram K, Vargas-Hernandez JS, Sanchez TR, Moreu NM, Mont MA, Higuera CA, et al. Are subchondral intraosseous injections effective and safe for the treatment of knee osteoarthritis? A systematic review. *J Knee Surg*. 2019;32:1046–57.
- Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):43–9.
- Gerter R, Kruegel J, Miosge N. New insights into cartilage repair—the role of migratory progenitor cells in osteoarthritis. *Matrix Biol*. 2012;31(3):206–13.
- Aaron RK, Racine JR, Voisinnet A, Evangelista P, Dyke JP. Subchondral bone circulation in osteoarthritis of the human knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(7):940–4.
- Mayerhoefer ME, Breitensteiner MJ, Kramer J, Aigner N, Norden C, Hofmann S. STIR vs. T1-weighted fat-suppressed gadolinium-enhanced MRI of bone marrow edema of the knee: computer-assisted quantitative comparison and influence of injected contrast media volume and acquisition parameters. *J Magn Reson Imaging*. 2005;22(6):788–93.
- Chua K, Kang JYB, Ng FDJ, Pang HN, Lie DTT, Silva A, et al. Subchondroplasty for bone marrow lesions in the arthritic knee results in pain relief and improvement in function. *J Knee Surg*. 2021;34(6):665–71.
- Bessa F, Rasio J, Newhouse A, Nwachukwu BU, Nho S. Surgical treatment of subchondral bone cysts of the acetabulum with calcium phosphate bone substitute material in patients without advanced arthritic hips. *Arthrosc Tech*. 2020;9(9):e1375–9.
- Bonadio MB, Giglio PN, Helito CP, Pécora JR, Camanho GL, Demange MK. Subchondroplasty for treating bone

- marrow lesions in the knee—initial experience. *Rev Bras Ortop.* 2017;52(3):325–30.
32. Cohen SB, Sharkey PF. Subchondroplasty for treating bone marrow lesions. *J Knee Surg.* 2016;29(7):555–63.
 33. Hemigou P, Trousselier M, Roubineau F, Bouthors C, Chevallier N, Rouard H, et al. Stem cell therapy for the treatment of hip osteonecrosis: a 30-year review of progress. *Clin Orthop Surg.* 2016;8(1):1–8.
 34. Guadilla J, Fiz N, Andia I, Sánchez M. Arthroscopic management and platelet-rich plasma therapy for avascular necrosis of the hip. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(2):393–8.
 35. Sánchez M, Delgado D, Sanchez P, Muiños-López E, Paiva B, Granero-Moltó F, et al. Combination of intra-articular and intraosseous injections of platelet rich plasma for severe knee osteoarthritis: a pilot study. *Biomed Res Int.* 2016;2016:4868613.
 36. Fiz N, Perez JC, Guadilla J, Garate A, Sánchez P, Padilla S, et al. Intraosseous infiltration of platelet-rich plasma for severe hip osteoarthritis. *Arthrosc Tech.* 2017;6(3):E821–5.
 37. Su K, Bai Y, Wang J, Zhang H, Liu H, Ma S. Comparison of hyaluronic acid and PRP intra-articular injection with combined intra-articular and intraosseous PRP injections to treat patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol.* 2018;37(5):1341–50.
 38. Lychagin A, Lipina M, Garkavi A, Islaiech O, Timashev P, Ashmore K, et al. Intraosseous injections of platelet rich plasma for knee bone marrow lesions treatment: one year follow-up. *Int Orthop.* 2021;45(2):355–63.
 39. Chu Q, Lopez M, Hayashi K, Ionescu M, Billingham RC, Johnson KA, et al. Elevation of a collagenase generated type II collagen neopeptide and proteoglycan epitopes in synovial fluid following induction of joint instability in the dog. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(8):662–9.
 40. Vilar JM, Rubio M, Spinella G, Cuervo B, Sopena J, Cugat R, et al. Serum collagen type II cleavage epitope and serum hyaluronic acid as biomarkers for treatment monitoring of dogs with hip osteoarthritis. *PLoS ONE.* 2016;11(2):e0149472.
 41. Goranov NV. Serum markers of lipid peroxidation, antioxidant enzymatic defense, and collagen degradation in an experimental (Pond-Nuki) canine model of osteoarthritis. *Vet Clin Pathol.* 2007;36(2):192–5.
 42. Lu Y, Markel MD, Swain C, Kaplan LD. Development of partial thickness articular cartilage injury in an ovine model. *J Orthop Res.* 2006;24(10):1974–82.
 43. Coppelman EB, David FH, Toth F, Ernst NS, Trumble TN. The association between collagen and bone biomarkers and radiographic osteoarthritis in the distal tarsal joints of horses. *Equine Vet J.* 2020;52(3):391–8.
 44. Ameye LG, Deberg M, Oliveira M, Labasse A, Aeschlimann JM, Henrotin Y. The chemical biomarkers C2C, Coll2-1, and Coll2-INO(2) provide complementary information on type II collagen catabolism in healthy and osteoarthritic mice. *Arthritis Rheum.* 2007;56(10):3336–46.
 45. Huebner JL, Kraus VB. Assessment of the utility of biomarkers of osteoarthritis in the guinea. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(9):923–30.
 46. Lindhorst E, Wachsmuth L, Kimmig N, Raiss R, Aigner T, Atley L, et al. Increase in degraded collagen type II in synovial fluid early in the rabbit meniscectomy model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(2):139–45.
 47. Nemirowskiy OV, Dufield DR, Sunyer T, Aggarwal P, Welsch DJ, Mathews WR. Discovery and development of a type II collagen neopeptide (TIINE) biomarker for matrix metalloproteinase activity: from in vitro to in vivo. *Anal Biochem.* 2007;361(1):93–101.
 48. de Bakker E, Stroobants V, VanDael F, Van Ryssen B, Meyer E. Canine synovial fluid biomarkers for early detection and monitoring of osteoarthritis. *Vet Rec.* 2017;180(13):328–9.
 49. Cuervo B, Rubio M, Sopena J, Dominguez JM, Vilar J, Morales M, et al. Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *Int J Mol Sci.* 2014;15(8):13437–60.
 50. Ohnishi A, Osaki T, Matahira Y, Tsuka T, Imagawa T, Okamoto Y, et al. Evaluation of the chondroprotective effects of glucosamine and fish collagen peptide on a rabbit ACLT model using serum biomarkers. *J Vet Med Sci.* 2013;75(4):421–9.

Anexo 2



OPEN ACCESS

EDITED BY
Gustavo Rosa,
São Paulo State University
(UNESP), Brazil

REVIEWED BY
Ana Ivanovska,
University of Galway, Ireland
Charlotte Beerts,
Boehringer Ingelheim Veterinary
Medicine Belgium, Belgium

*CORRESPONDENCE
Mónica Rubio
✉ mrubio@uchceu.es

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Veterinary Regenerative Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

RECEIVED 29 September 2022
ACCEPTED 05 December 2022
PUBLISHED 20 December 2022

CITATION
Torres-Torrillas M, Damiá E, Peláez P,
Miguel-Pastor L, Cuervo B, Cerón JJ,
Carrillo JM, Rubio M and Sopena JJ
(2022) Intra-osseous infiltration of
adipose mesenchymal stromal cells
and plasma rich in growth factors to
treat acute full depth cartilage defects
in a rabbit model: Serum osteoarthritis
biomarkers and macroscopical
assessment. *Front. Vet. Sci.* 9:1057079.
doi: 10.3389/fvets.2022.1057079

COPYRIGHT
© 2022 Torres-Torrillas, Damiá, Peláez,
Miguel-Pastor, Cuervo, Cerón, Carrillo,
Rubio and Sopena. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

Intra-osseous infiltration of adipose mesenchymal stromal cells and plasma rich in growth factors to treat acute full depth cartilage defects in a rabbit model: Serum osteoarthritis biomarkers and macroscopical assessment

Marta Torres-Torrillas^{1,2}, Elena Damiá^{1,2}, Pau Peláez^{1,2},
Laura Miguel-Pastor^{1,2}, Belén Cuervo^{1,2}, José J. Cerón³,
José M. Carrillo^{1,2}, Mónica Rubio^{1,2*} and Joaquín J. Sopena^{1,2}

¹Bioregenerative Medicine and Applied Surgery Research Group, Department of Animal Medicine and Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, Valencia, Spain, ²García Cugat Foundation, CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, Valencia, Spain, ³Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis, Interlab-UMU, Regional Campus of International Excellence, Campus Mare Nostrum, University of Murcia, Murcia, Spain

Introduction: Intra-articular infiltration of plasma rich in growth factors (PRGF) and adipose mesenchymal stromal cells (AMSCs) are known to inhibit osteoarthritis progression. However, in severely affected patients, the treatment cannot reach the deeper layers of the articular cartilage; thus, its potential is limited. To overcome this limitation, intra-osseous infiltrations have been suggested. The purpose of this study is to assess the impact of intra-osseous infiltration therapies on serum biomarkers of osteoarthritis and to assess cartilage regeneration macroscopically.

Materials and methods: A total of 80 rabbits were divided into four groups based on the intra-osseous treatment administered on the day of surgery: control, PRGF, AMSCs and a combination of PRGF + AMSCs. In addition, all groups received a single intra-articular administration of PRGF on the same day. Serum biomarker levels were measured before infiltration and 28-, 56-, and 84-days post infiltration, and macroscopical assessment was conducted at 56- and 84-days follow-up post infiltration.

Results: In the PRGF + AMSCs group, significantly lower concentrations of hyaluronic acid and type II collagen cleavage neoepitope were recorded at all time points during the study, followed by PRGF, AMSCs and control groups. Regarding macroscopical assessment, lower scores were obtained in PRGF + AMSCs group at all study times.

Discussion: The results suggest that the combination of intra-articular PRGF with intra-osseous PRGF or AMSCs achieves better results in rabbits with acute chondral defects and that intra-osseous infiltration is a safe procedure.

KEYWORDS

adipose mesenchymal stromal cells, platelet rich plasma, osteoarthritis, chondral defect, articular cartilage, biomarkers, bioregenerative therapies

Introduction

Articular cartilage (AC) has a limited self-repair potential due to its avascularity and low cellular mitotic activity of chondrocytes. Although small chondral lesions may heal spontaneously, larger defects can lead to progressive joint degeneration and osteoarthritis (OA) (1). OA is the most commonly diagnosed joint disease in companion animals and affects over 20% of the canine population (2, 3). Moreover, although it can be diagnosed in cats as young as 1 year old, evidence of radiographic OA is greater in older cats, with 90% of cats over 12 years of age being affected (4, 5).

OA is characterized by degeneration of AC and progressive destruction of intra-articular (IA) structures, including subchondral bone (SB) and synovial membrane (SM) (6, 7). All these tissues play a vital role in joint homeostasis, and any disturbance of its balance results in AC and SB degeneration, osteophyte formation and swelling of the SM (7–9).

Due to the poor regenerative ability of AC and currently limited clinical treatments, there has been a growing interest in bioregenerative therapies, such as autologous conditioned serum, expanded or non-expanded mesenchymal stromal cells (MSCs) products and platelet concentrates (10). All of these therapies contribute to tissue regeneration, cartilage synthesis, inhibition of cartilage breakdown, and reduction in local inflammation (11, 12). Of these, IA infiltrations with platelet-rich plasma (PRP) and MSCs, more specifically adipose-derived mesenchymal stem cells (AMSCs), have emerged as treatments with encouraging results (13).

PRP contains different growth factors (GF) and proteins, such as fibronectin, vitronectin and fibrinogen, that play a significant role during AC repair and regeneration (14). Currently, IA infiltration is the most commonly administration route, which has shown to be effective in patients with mild OA; however, these therapies cannot reach the deeper layers of the AC and the SB, limiting their therapeutic potential (8, 15, 16). Furthermore, a recent study has shown the key role that SB plays in the pathogenesis of OA (17). Although literature is scarce, some authors have achieved positive outcomes after intra-osseous (IO) infiltration with PRP both in rabbits (18) and humans (9, 19–21).

MSCs have immunoregulatory and regenerative properties. They can stimulate the synthesis of angiogenic, mitogenic,

and antiapoptotic mediators, encouraging the regeneration of damaged joint tissues (22). Additionally, MSCs can control the inflammation process by regulating the immune response (23). MSCs can be obtained from different tissues, including bone marrow, peripheral blood, umbilical cord, synovial fluid, placenta, and adipose tissue (AMSCs) (24). AMSCs have two major advantages: a greater proliferation capacity and an ability to maintain the differentiation potential for longer periods when cultured (25). Furthermore, adipose tissue is abundant and easy to obtain, and it has a lower risk of rejection as *in vitro* culture is not necessary (22, 26, 27). AMSCs secrete several anti-inflammatory substances, like interleukin-1 receptor antagonist, transforming growth factor β , stromal cell-derived factor 1 and others, which alleviate the inflammation state in the diseased joint (28). Different clinical trials on the use of AMSCs alone or in combination with PRP have demonstrated the safety and effectiveness of this therapy. No side effects have been reported, and a decrease in lameness and pain, along with an increase in joint functionality, were demonstrated. As a general trend, better outcomes were reported when the AMSCs were in combination with PRP (29–33). To our knowledge, no previous studies have described the IO injection of AMSCs to treat chondral defects.

On the other hand, several wet biomarkers have been identified and validated to facilitate the diagnosis of OA in the initial stages of the disease. These biomarkers can be detected in blood, urine, or synovial fluid and allow clinicians to identify patients at considerable risk for developing OA, control disease evolution and measure the response to treatments (34). Type II collagen cleavage neoepitope (C2C) is created by the cleavage of type II collagen by collagenases. It has been proven that C2C is increased in initial stages of OA, while it is decreased in chronic stages (35, 36). The utility of C2C concentration to monitor disease progression and response to treatment has been reported in several animal models, including dogs (37, 38), sheep (39), horses (40), mice (41), and guinea pigs (42). Another well-studied OA biomarker is hyaluronic acid (HA). Serum HA concentration is elevated in OA patients, and higher levels are associated with clinical and radiological worsening of pathology both in humans (43) and dogs (37, 44).

The present study hypothesizes that IA infiltration of platelet rich in growth factors (PRGF) together with IO infiltration of AMSCs, PRGF, or a combination of both could improve the therapeutic potential of IA-only PRGF infiltrations by targeting

AC, SB, and SM. Based on this hypothesis, the aim of the study is (1) to assess the impact of IO infiltration of PRGF, AMSCs, or PRGF + AMSCs together with IA infiltration of PRGF in serum OA biomarkers (C2C and HA) in a model of acute full depth chondral defect in rabbits, and (2) to macroscopically assess the chondral defects using a validated scale (45). To our knowledge, this is the first study in which AMSCs and the combination of PRGF + AMSCs are IO infiltrated.

Materials and methods

The study was approved by the Ethics Committee of Animal Welfare (CEEAA) of the University CEU Cardenal Herrera of Valencia (Spain) in concordance to the Spanish Policy for Animal Protection (RD118/2021), which complies with European Union Directive 2010/63/UE with the following approval code: 2019/VSC/PEA/0153.

Animals

A total of 80 healthy female New Zealand rabbits from the Polytechnic University in Valencia and specially bred for research purposes were used to accomplish a prospective randomized and blinded experimental study. The rabbits were 6 months old and with an average weight of 4.46 kg. The rabbits were allowed to eat, drink and move without restriction in individual big pens. All animals were monitored daily to detect signs of infection, pain and weight loss. To allow rabbits adaptation, an acclimatization period of 15 days prior to beginning the experiment was established. Inclusion criteria consisted of a normal physical examination and a normal hematology and serum biochemical analysis. All tests were performed 10 days before surgery, and results were within normal reference range values. No rabbits were excluded from the study.

During a 7-day period after the surgery, all animals received meloxicam 0.3 mg/kg SC q24h (Metacam[®], Boehringer Ingelheim, Spain) and enrofloxacin 10 mg/kg SC q24h (Ganadexil[®], Invesa, Spain). To evaluate the safety of the treatment, all animals were monitored daily, and a rabbit Grimace Scale was performed. If a score equal or >4 was obtained, buprenorphine 0.1 mg/kg SC q8h (Bupaq[®], Richter Pharma AG, Austria) was given as a rescue analgesia. If during the study any animal showed drastic worsening in their physical or functional condition, they were excluded from the study. Severe and untreatable local infection and severe traumatic lesions (e.g., fractures) were considered exclusion criteria.

At the end of the study, all animals were euthanized in agreement with Spanish Policy for Animal Protection (RD118/2021). Rabbits were sedated with dexmedetomidine 0.05 mg/kg IM (Dexdomitor[®], Esteve, Spain) and ketamine

(10 mg/kg IM; Imalgene[®], Merial, Spain), followed by an IV injection of pentobarbital sodium (150 mg/kg).

Study groups

Rabbits were randomly divided into four groups of 20 animals, depending on the IO treatment administered:

- ❖ Control group (CT): single IA injection of PRGF, followed by a single IO injection of saline solution.
- ❖ PRGF group: single IA injection of PRGF, followed by a single IO injection of PRGF.
- ❖ AMSCs group: single IA injection of PRGF, followed by a single IO injection of AMSCs.
- ❖ PRGF + AMSCs group: single IA injection of PRGF, followed by a single, combined IO injection of PRGF and AMSCs.

Additionally, animals were divided into two subgroups of ten animals each, according to the survival time (56 or 84 days).

Plasma rich in growth factors and adipose derived mesenchymal stromal cells

To obtain an autologous preparation of PRP, PRGF-Endoret[®] technology was used. After sedating the animals with IM dexmedetomidine (0.05 mg/kg; Dexdomitor[®], Esteve, Spain), IM ketamine (10 mg/kg; Imalgene[®], Merial, Spain), and IM morphine (1 mg/kg; B-Braun[®], Germany), a total of 15 mL of blood were collected from the auricular artery of each rabbit under sterile conditions in vacutainer sodium citrate 3.8% tubes (BD Vacutainer[®] 9NC, New Jersey, USA). The tubes were centrifuged at 460 g for 8 min (PRGF[®] System III, Biotechnology Institute[®], Álava, Spain) to separate the PRGF from the platelets poor plasma, the white blood cells and the red blood cells. A sterile pipette was used to collect the PRGF fraction and transfer it into a sterile tube, where platelets were activated for GF release just prior to infiltration by adding 10% calcium chloride (50 µL/mL of PRGF).

Adipose derived mesenchymal stromal cells

Allogenic AMSCs from an individual donor rabbit from Principe Felipe Research Centre were used. A total of 30 g of inguinal adipose tissue were obtained. Moreover, a 20 mL blood sample was collected into blood collection tubes without anticoagulant.

Adipose tissue was washed with Phosphate Buffered Saline Solution (PBS) and incubated in a PBS solution containing penicillin, streptomycin and type 1-A collagenase and dispase. The tissue was then digested overnight at 37°C. The next day, the adipose tissue was washed, and the obtained stromal vascular fraction was cultured in an autologous serum. The cells were allowed to grow to 1×10^6 cells per gram and were then amplified during four passages. Thereafter, cells were resuspended in 10% PBS supplemented DMEM for tissue transplantation.

Cell viability was assessed by using trypan blue dye, and cell viability was >90%.

Chondral defect model and treatments

After sedation and blood extraction, the medial aspect of both hindlimbs was prepared for aseptic surgery. General anesthesia was mask induced and maintained with sevoflurane (Sevoflo[®], Esteve, Spain).

With the rabbit's knee in complete flexion, a skin incision of 10 mm long was performed over the margin of the medial femoral condyle, followed by an incision of the fascia and joint capsule to expose the medial femoral condyle. The loading area was then identified, and a defect of 4 mm in diameter and 5 mm in depth was created with a drill bit (Figure 1). Finally, simple stitches were used to close the different layers using 3/0 polyglyconate (Novosyn[®] Quick, B-Braun, Germany). The same procedure was performed in the contralateral knee.

After surgery, IA infiltration of both knees with PRGF was performed using a 22-G needle. The needle was inserted laterally to the patellar tendon, while the knee was kept in flexion, and a single infiltration with 0.25 mL of PRGF was performed in all animals (Figure 2A) regardless of the treatment group. Finally, the IO infiltration occurred by inserting an 18-G spinal needle perpendicular to the femur in the lateral supracondylar area with gentle rotating movements. This was followed by a single infiltration of 0.5 mL saline solution, PRGF, AMSCs, or PRGF + AMSCs, depending on the treatment group (Figure 2B). A mean time of 29.16 min elapsed from blood collection to PRGF injection.

Serum biomarkers study

A total 3.5 mL of blood was collected from the auricular artery of each rabbit in vacutainer serum tubes with a clot accelerator and a gel serum separator (BD Vacutainer[®] SST[™] II Advance, BD, New Jersey, USA). Blood samples were extracted just prior to surgery (baseline) and 28-, 56-, and 84-days after infiltration.

After centrifugation of the blood samples at 3,000 g for 5 min, the obtained serum was frozen in Eppendorf tubes at

−80°C. To determine the serum concentration of C2C and HA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests IBEX[®] 60-1001-001 and TECO[®] TE1017-2 were used, respectively.

Macroscopical assessment

After the animals were euthanized (56- and 84- days after infiltration), both right and left femurs were excised to perform the macroscopical assessment. Cartilage repair was graded by four blinded observers with experience in cartilage research. Goebel et al. semiquantitative scale was followed. The scale consists of five major parameters and 25 items, where 20 points is the worst possible result (45).

Statistical analysis

The sample size was calculated by a power analysis consistent with results published in prior research in which only IA PRP was administered (mean = 10.83 and standard deviation = 2.041) (46). An alpha level of 0.02 and a power of 80% were established.

The data were processed using the SPSS 20.0 program for Windows (SPSS[®] Inc., Chicago, USA). For each variable, a descriptive study of the mean, standard deviation and confidence intervals was performed. A *p*-value < 0.05 was considered significant. The Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of data in every quantitative variable, while the Leven test was used to assess the variance homogeneity. All variables adhered to a normal distribution; hence, a mixed ANOVA test was used to compare the variables.

3. Results

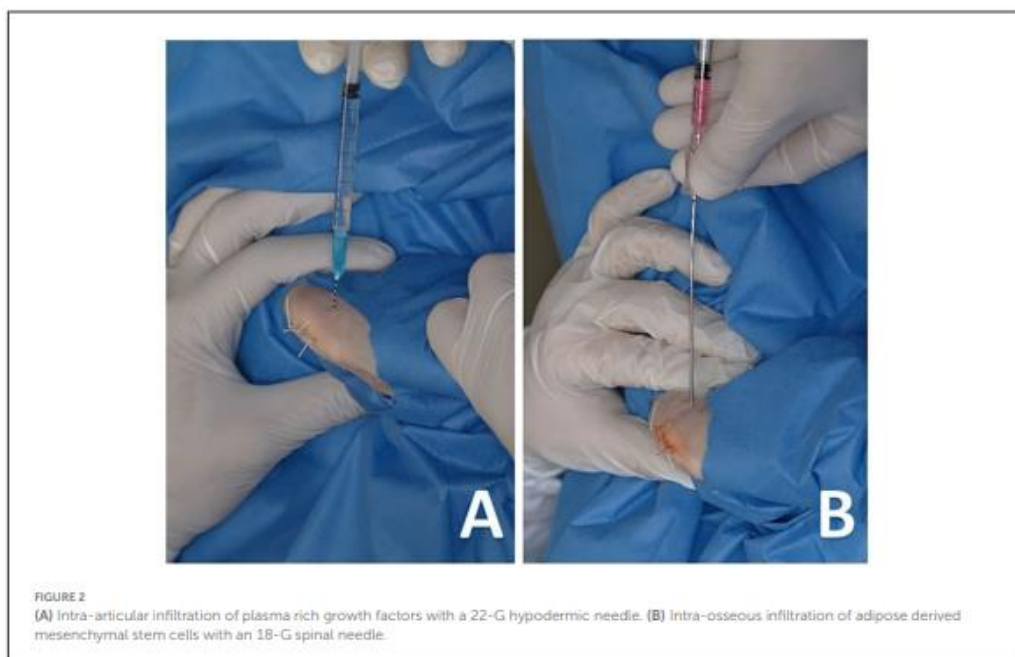
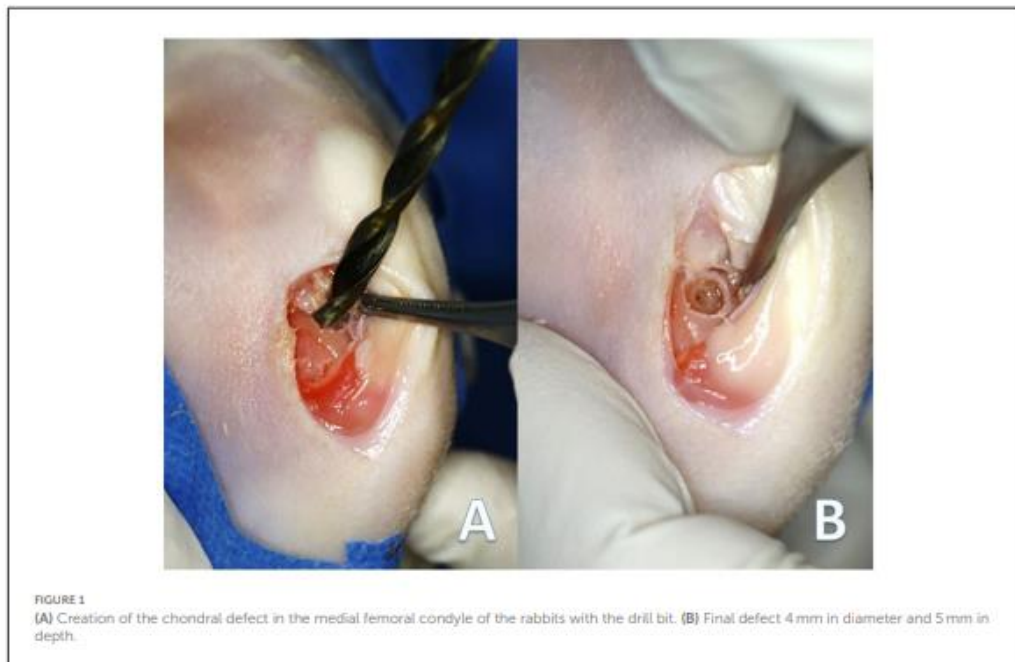
3.1. Treatment safety

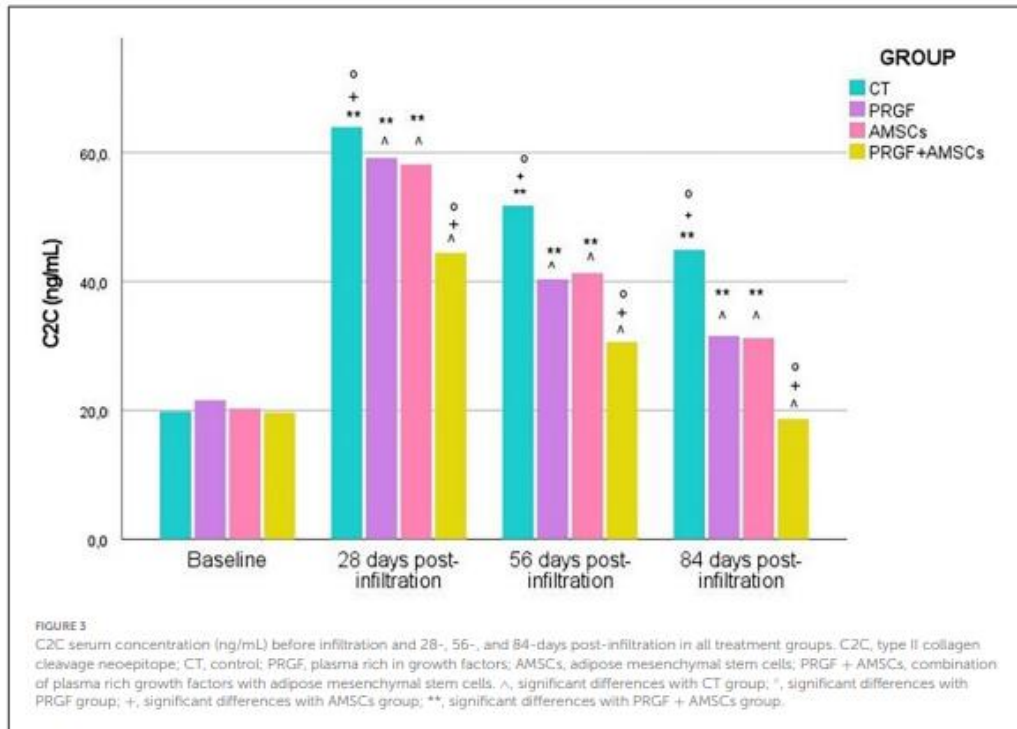
A total of 78 rabbits completed the study (97.5% of the animals). Two rabbits were excluded from the study due to a severe worsening of their physical condition. One of them was excluded due to a severe infection in the surgical area with multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. The other animal had a molar abscessation, which caused extreme weight loss.

3.2. Serum biomarkers assessment

3.2.1. Type II collagen neopeptide

No significant differences (*p*-value = 0.509) in C2C serum concentration between groups were demonstrated at baseline. However, significantly higher values were observed 28 days after infiltration in the CT group than in the PRGF (*p*-value = 0.009),





AMSCs (p -value = 0.007), and PRGF + AMSCs (p -value < 0.001) groups. No significant differences between PRGF and AMSC groups (p -value = 0.925) were demonstrated, and the PRGF + AMSCs group showed significantly lower C2C values than the PRGF and AMSCs groups (p -value < 0.001) (Figure 3).

Similar results were shown 56 days after infiltration. CT group showed significantly higher values (p -value < 0.001) of C2C than the PRGF, AMSCs, and PRGF + AMSCs groups. The group treated with PRGF + AMSCs showed significantly lower concentrations of C2C (p -value < 0.001) than the PRGF and AMSCs groups; nevertheless, no significant differences were reported between the PRGF and AMSCs groups (p -value = 0.936) (Figure 3).

At 84 days follow-up, the CT group showed significantly higher C2C concentrations than the PRGF, AMSCs, and PRGF + AMSCs groups (p -value < 0.001). Moreover, the PRGF + AMSCs group showed significantly lower concentrations than the PRGF and AMSCs groups (p -value < 0.001), while no differences were seen between the PRGF and AMSCs groups (p -value = 0.997) (Figure 3).

A significantly higher C2C concentration level was reported in the CT (p -value < 0.001), PRGF (p -value = 0.032), and AMSCs (p -value = 0.028) groups 84 days after infiltration than

at baseline. However, no significant differences were observed in the PRGF + AMSCs group between baseline and 84 days after infiltration (p -value = 0.428).

The mean and standard deviation of C2C serum concentration (ng/mL) in different treatment groups at each study time are described in Table 1.

3.2.2. Hyaluronic acid

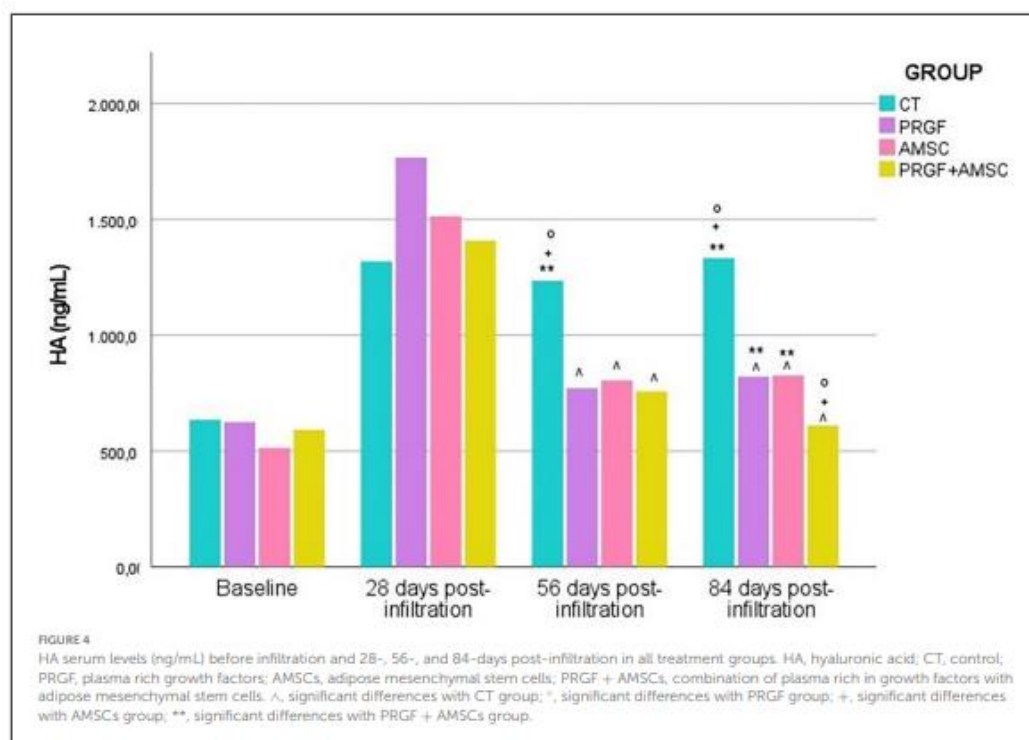
No significant differences in HA concentrations were demonstrated between groups at baseline (p -value = 0.091) nor 28 days after the infiltration (p -value = 0.460), except higher concentrations were reported in the PRGF group. However, 56 days after infiltration, the CT group showed significantly higher values of HA concentrations (p -value < 0.001) than the PRGF, AMSCs, and PRGF + AMSCs groups (Figure 4).

On the other hand, 84 days after the infiltration significantly higher HA concentration were observed in the CT group (p -value < 0.001). No significant differences between the PRGF and AMSCs groups were reported (p -value = 1.00); nevertheless, the PRGF + AMSCs group showed significantly lower values than the PRGF (p -value = 0.010) and AMSCs (p -value = 0.006) groups (Figure 4).

TABLE 1 Serum C2C means standard deviation at different study times and treatment groups.

Study time	CT	PRGF	AMSCs	PRGF + AMSCs
Baseline	19.80 ± 2.46	21.59 ± 3.70	20.27 ± 4.70	19.66 ± 2.54
28 days post-infiltration	63.94 ± 3.92	59.16 ± 3.65	58.15 ± 3.31	44.43 ± 2.98
56 days post-infiltration	51.75 ± 3.44	40.34 ± 3.36	41.29 ± 3.50	30.61 ± 2.94
84 days post-infiltration	44.89 ± 2.94	31.54 ± 2.84	31.20 ± 4.02	18.66 ± 3.17

CT, control; PRGF, plasma rich in growth factors; AMSCs, adipose mesenchymal stromal cells; PRGF + AMSCs, combination of plasma rich growth factors with adipose mesenchymal stromal cells.



No significant differences between baseline HA concentration values and 84 days after treatment values were reported in the PRGF + AMSCs treatment group (p -value = 0.214). However, significantly higher values have been reported in the CT (p -value < 0.01), PRGF (p -value = 0.042), and AMSCs (p -value = 0.023) groups at the end of the study compared to baseline values.

The mean and standard deviation of serum HA concentrations (ng/mL) in different treatment groups at each study time are described in Table 2.

3.3. Macroscopical assessment

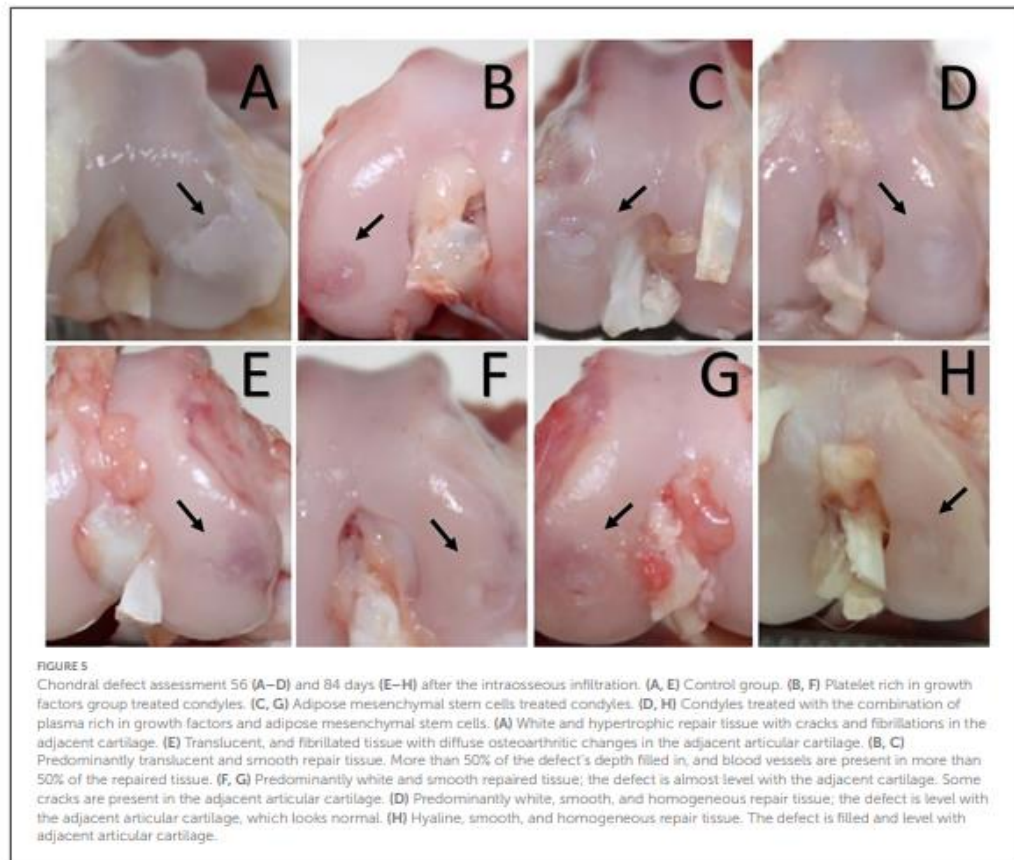
3.3.1. Fifty-six days after infiltration

Cartilage treated with the combination of PRGF + AMSCs showed a significantly lower macroscopical assessment total score compared to the CT (p -value < 0.001), PRGF (p -value = 0.025), and AMSCs (p -value = 0.004) groups (Figures 5, 6). Additionally, no significant differences were observed between the PRGF and AMSCs groups (p -value = 0.641), but both groups showed significantly lower total

TABLE 2 Serum HA means standard deviation at different study times and treatment groups.

Study time	CT	PRGF	AMSCs	PRGF + AMSCs
Baseline	635.67 ± 76.64	625.18 ± 114.26	513.87 ± 174.65	592.13 ± 86.57
28 days post-infiltration	1,319.04 ± 524.36	1,767.22 ± 936.37	1,513.78 ± 716.37	1,408.60 ± 533.21
56 days post-infiltration	1,234.96 ± 391.67	770.99 ± 104.67	804.99 ± 50.21	757.93 ± 46.12
84 days post-infiltration	1,333.54 ± 265.19	821.90 ± 43.29	826.92 ± 59.66	610.05 ± 64.44

CT, control; PRGF, plasma rich in growth factors; AMSCs, adipose mesenchymal stromal cells; PRGF + AMSCs, combination of plasma rich in growth factors with adipose mesenchymal stromal cells.



scores compared to the CT group (p -value = 0.001 and 0.011, respectively).

Means and standard deviations for each evaluated parameter and total points are shown in Table 3.

3.3.2. Eighty-four days after infiltration

Cartilage treated with the combination of PRGF + AMSCs showed a significantly lower macroscopical assessment total

score compared to the CT (p -value < 0.001), PRGF (p -value < 0.001), and AMSCs (p -value < 0.001) groups (Figures 5, 6). Additionally, no significant differences were observed between the PRGF and AMSCs groups (p -value = 0.198). Moreover, the PRGF and AMSCs groups showed significantly lower total scores compared to the CT group (p -value < 0.001 and = 0.032, respectively).

Means and standard deviations for each evaluated parameter and total points are shown in Table 4.

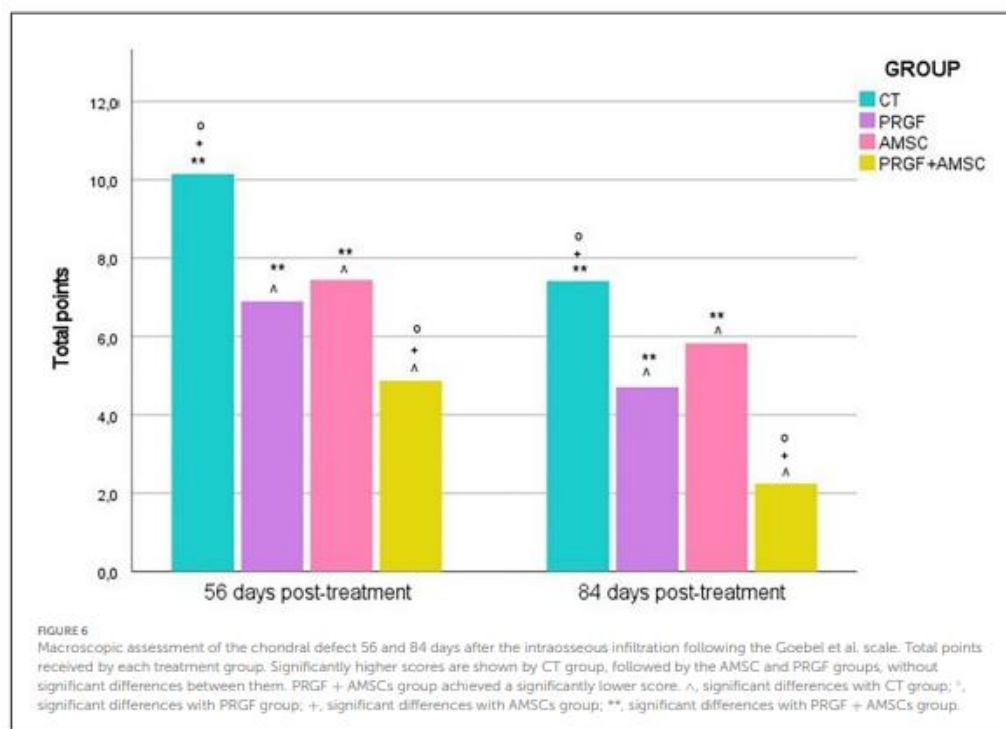


TABLE 3 Macroscopical scores 56 days after infiltration.

Parameter	CT	PRGF	AMSCs	PRGF + AMSCs
Color of the repair tissue	2.11 ± 0.69	1.21 ± 0.48	1.32 ± 0.30	0.62 ± 0.21
Presence of blood vessels in the repair tissue	0.92 ± 0.99	2.33 ± 0.53	1.25 ± 0.46	1.62 ± 0.52
Surface of the repair tissue	2.31 ± 1.07	1.08 ± 0.75	1.62 ± 0.28	0.79 ± 0.35
Filling of the defect	2.27 ± 0.66	1.12 ± 0.50	1.83 ± 0.25	0.83 ± 0.19
Degeneration of adjacent articular cartilage	1.95 ± 0.65	1.21 ± 0.30	1.41 ± 0.23	0.99 ± 0.44
Total points	9.57 ± 1.75	6.96 ± 1.41	7.44 ± 0.71	4.87 ± 0.47

CT, control; PRGF, plasma rich in growth factors; AMSCs, adipose mesenchymal stromal cells; PRGF + AMSCs, combination of plasma rich in growth factors with adipose mesenchymal stromal cells.

Mean and standard deviation.

Discussion

During the last decade, bioregenerative therapies, such as MSCs and PRP, have been used to treat several musculoskeletal conditions, including chondral defects and OA. PRP and MSCs are commonly IA infiltrated. Even though promising results have been reported in patients with mild OA, in severely affected patients therapeutic potential is limited, as these

regenerative therapies cannot reach the deeper layers of AC or the SB (47). Thus, it has been postulated that IA infiltrations combined with IO infiltrations could target SB, providing a more comprehensive treatment (48, 49).

IO injections with bone marrow concentrate have been proposed to treat knee OA in humans and some success in pain relief, functionality and lack of subsequent surgery has been achieved (48, 50). However, to our knowledge, no article on IO

TABLE 4 Macroscopical scores 84 days after infiltration.

Parameter	CT	PRGF	AMSCs	PRGF + AMSCs
Color of the repair tissue	1.55 ± 0.57	0.87 ± 0.52	0.98 ± 0.44	0.44 ± 0.27
Presence of blood vessels in the repair tissue	0.79 ± 0.40	0.89 ± 0.45	0.58 ± 0.35	0.23 ± 0.17
Surface of the repair tissue	1.78 ± 0.41	0.89 ± 0.57	1.47 ± 0.39	0.50 ± 0.28
Filling of the defect	1.57 ± 0.39	0.98 ± 0.43	1.53 ± 0.36	0.51 ± 0.34
Degeneration of adjacent articular cartilage	1.61 ± 0.35	1.09 ± 0.49	1.23 ± 0.22	0.57 ± 0.47
Total points	7.26 ± 1.02	4.71 ± 1.66	5.79 ± 0.82	2.24 ± 0.99

CT, control; PRGF, plasma rich in growth factors; AMSCs, adipose mesenchymal stromal cells; PRGF + AMSCs, combination of plasma rich in growth factors with adipose mesenchymal stromal cells.

Mean and standard deviation.

infiltration of AMSCs has been published either in animals or in humans.

The literature regarding IO injections of PRP to treat severe OA is also sparse, and to our knowledge, no treatment related to veterinary medicine has been published. The IO infiltration technique was introduced by Sánchez et al. in 2014 (9), and since then, some pilot studies in humans have reported positive outcomes, such as pain relief and joint function improvements (9, 19, 20, 47, 51, 52). These positive clinical outcomes could be correlated with the significantly better macroscopical regeneration of the AC shown in our study in PRGF, AMSCs, and PRGF + AMSCs groups. Nonetheless, further studies to compare the macroscopical assessment with the histology of the regenerated tissue are needed.

A total lower macroscopical score was achieved in the PRGF + AMSCs group, followed by the PRGF, AMSCs, and CT groups. Regarding the color of the repair tissue, 56- and 84-days after infiltration the PRGF + AMSCs group showed a hyaline color, while the PRGF and AMSCs groups showed predominantly white color with some translucent areas. On the other hand, the CT group showed mainly translucent color. Fifty-six days after treatment blood vessels were present in more than 50% of the repair tissue in the PRGF and PRGF + AMSCs groups. Our research team believes that the lower total scores shown in the PRGF + AMSCs and PRGF treatment groups, meaning a faster and improved regeneration process, are correlated with the increased presence of blood vessels showed in the macroscopical scales in these groups. The angiogenic activities of PRP are modulated by stimulatory pro-angiogenic platelet-derived vascular endothelial growth factor, together with several other mediators in PRP, such as fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor- β , that stimulate endothelial cells to produce new blood vessels (53). This angiogenesis process is known to be essential for tissue healing to withstand the high metabolic activity of the AC repair process (54). Regarding the surface of the repair tissue, predominantly fibrillated tissue was present in the CT group at both study times, while in the PRGF + AMSCs group a smooth and homogeneous tissue was present. Moreover, <50% of the depth of the defect was filled in the CT

group at 56 days follow-up, in contrast to the PRGF, AMSCs and PRGF + AMSCs groups, where more than 50% of the lesion was filled. At 84 days follow-up, the defect in the PRGF + AMSCs group was level with the adjacent cartilage. The adjacent cartilage in the CT group showed diffuse osteoarthritic changes at both study times, while the PRGF and AMSCs groups showed cracks and fibrillations in the integration zone and the PRGF + AMSCs group showed an almost normal appearance.

On the other hand, Muinos-Lopez et al. assessed the effect of IA or a combination of IA and IO infiltrations of PRP on the cellular content of synovial fluid (55). Synovial fluid was collected before and 1 week after the infiltration and the presence of MSCs, monocytes and lymphocytes were determined. It was concluded that the IO infiltration induced a greater reduction in the population of monocytes and lymphocytes, and an increase in MSCs modulation was observed when the PRP was directly infiltrated in the SB (55). Lychagin et al. additionally assessed the inflammatory response by quantifying an OA biomarker (serum oligomeric matrix protein) level and concluded that the concentration was initially higher in osteoarthritic patients than in healthy control patients. These levels continue to increase 1 and 3 months after the IO infiltration, but posterior analysis showed constant serum oligomeric matrix protein levels (51).

Similar results have been obtained in our study, where serum C2C and HA concentrations were assessed. In the present study, an increase in serum C2C concentration was reported 28 days after the creation of the chondral defect in all study groups, matching the acute damage. Moreover, at 56 days follow-up, serum C2C concentration started to decrease in all study groups, and this decrease still was evident at 84 days follow-up. Significantly higher serum levels were observed in the CT group at all study times, while the PRGF + AMSCs group showed the lowest levels, followed by the PRGF and AMSCs groups without significant differences between the last two. No significant differences were reported between baseline and 84 days follow-up values in the PRGF + AMSCs group; however, in the other three treatment groups, serum levels 84 days after the infiltration remained statistically higher than baseline levels. These results suggest that IA PRGF combined with IO PRGF + AMSCs

infiltration improve cartilage healing more than IA infiltration of PRGF or AMSCs itself. Furthermore, the IO combination of PRGF and AMSCs have shown better results than the IO infiltration of one of these therapies by itself. Comparable results were observed in our previous study, in which lower C2C serum concentration was reported in treatment groups 84 days after the infiltration, compared to the CT group. Moreover, the PRGF group showed stable concentrations at 84 days follow-up, while in the CT group C2C levels continued to rise (18).

On the other hand, statistically lower serum HA levels have been reported in the CT group at 28 days follow-up, while the PRGF group showed the highest concentration, followed by the AMSCs and the PRGF + AMSCs groups. However, 56 and 84 days after the infiltration, the CT group showed statistically higher values than the other groups. A sudden fall of serum HA levels in the PRGF, AMSCs, and PRGF + AMSCs groups was reported at 56 days follow-up, as it did in our previous study (18). This great rise, followed by the sudden fall of HA levels in animals treated with IO PRGF or AMSCs might be suggestive of a faster chondrogenesis process. Additionally, at 84 days follow-up, the PRGF + AMSCs group showed statistically lower HA concentrations than the CT, PRGF, and AMSCs groups, and no significant differences between baseline values and 84 days follow-up values were reported in this group.

In the present study, significantly better results have been reported in the PRGF + AMSCs group, in concordance with previous studies in which this combination has shown some beneficial effects, such as enhanced proliferation of MSCs and improvements in joint function (29, 30, 56). Additionally, this combination has shown enhanced collagen type II expression and reduced chondrocyte apoptosis. Moreover, PRP has an anabolic effect on both MSCs and chondrocytes, prompting proliferation and strengthening matrix development, together with an increase in proteoglycans concentration in AC (57–59).

Although several studies have shown that IO approach is safe, the technique has some limitations. It is an invasive procedure, and it should be performed in the operating room with the aid of ultrasound or fluoroscopy. Sedation and general or local anesthesia are required, making the technique more expensive, and animal owners might be reluctant to consent to the treatment.

This study is one of the first experimental animal studies in this subject; moreover, it is one of the first in which objective records have been assessed. The major limitation of the study is the short follow-up period, and the paucity of experimental studies with which to compare our results. Despite the positive results that IO infiltration with PRGF, AMSCs or a combination of both have shown, further studies are required to evaluate histological and biomechanical alterations. Additionally, further clinical trials in companion animals are needed, opening the door to further research in this field.

Conclusions

The combination of IA infiltrations of PRGF with IO infiltration of PRGF, AMSCs or a mixture of both targets the AC, the SM and the SB tissues implicated in the development of OA. Thus, the IO administration method is a potential tool in managing full depth chondral defects or severe OA.

Better outcomes have been observed in rabbits treated with IA PRGF together with IO PRGF, AMSCs or a combination of PRGF + AMSCs, and no clinical complications have been reported. Nevertheless, further studies in this field are necessary to link these results with histological, biomechanical, and clinical outcomes. No adverse effects were reported during the study time, suggesting IO infiltration is a safe treatment strategy.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Animal Welfare (CEEAA) of the University CEU Cardenal Herrera of Valencia (approval code: 2019/VSC/PEA/0153) and was conducted in accordance with the ARRIVE (Animal Research: Reporting *in vivo* Experiments) guidelines.

Author contributions

JS and JCa: conceptualization. JS and MR: methodology and visualization. MR: software. MR, JS, ED, and JCa: validation. JCe and MT-T: formal analysis. MT-T, LM-P, BC, ED, and PP: investigation. JS: resources and project administration. MT-T, PP, and JCa: data curation. MT-T: writing—original draft preparation. MT-T and ED: writing—review and editing. ED and MR: supervision. JCa: funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by the García Cugat Foundation, CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery.

Acknowledgments

The authors would like to thank the García Cugat Foundation for their technical support and all collaborators at the Veterinary Hospital of CEU Cardenal Herrera University for their assistance.

Conflict of interest

MT-T, ED, PP, LM-P, BC, JCa, MR, and JS were employed by García Cugat Foundation.

The remaining author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial

relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Slimi F, Zrihi W, Trigui M, Amri R, Couiaa N, Abid C, et al. The effectiveness of platelet-rich plasma gel on full-thickness cartilage defect repair in a rabbit model. *Bone Joint Res.* (2021) 10:192–202. doi: 10.1302/2046-3758.103.BJR-2020-0087.R2
- Anderson KL, O'Neill DG, Brodbelt DC, Church DB, Meeson RL, Sargan D, et al. Prevalence, duration and risk factors for appendicular osteoarthritis in a UK dog population under primary veterinary care. *Sci Rep.* (2018) 1:8. doi: 10.1038/s41598-018-23940-z
- Marshall WG, Bockstahler BA, Hulse DA, Carmichael S. A review of osteoarthritis and obesity: current understanding of the relationship and benefit of obesity treatment and prevention in the dog. *Vet Comp Orthopaed Traumatol.* (2009) 22:339–45. doi: 10.3415/VCOOT-08-08-0069
- Lascelles BD, Henry John B III, Brown J, Robertson I, Sumrell AT, Simpson W, et al. Cross-sectional study of the prevalence of radiographic degenerative joint disease in domesticated cats. *Vet Surg.* (2010) 39:535–44. doi: 10.1111/j.1532-950X.2010.00708.x
- Hardie EM, Roe SC, Martin FR. Radiographic evidence of degenerative joint disease in geriatric cats: 100 cases (1994–1997). *J Am Vet Med Assoc.* (2002) 220:628–32. doi: 10.2460/javma.2002.220.628
- Barr AJ, Campbell TM, Hopkinson D, Kingsbury SR, Bowes MA, Conaghan PG. A systematic review of the relationship between subchondral bone features, pain and structural pathology in peripheral joint osteoarthritis. *Arthritis Res Therapy.* (2015) 1:228. doi: 10.1186/s13075-015-0735-x
- Campbell TM, Churchman SM, Gomez A, McGonagle D, Conaghan PG, Ponchel F, et al. Mesenchymal stem cell alterations in bone marrow lesions in patients with hip osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* (2016) 68:1648–59. doi: 10.1002/art.39622
- Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone.* (2012) 51:204–11. doi: 10.1016/j.bone.2011.10.010
- Sánchez M, Fiz N, Guadilla J, Padilla S, Anitua E, Sanchez P, et al. Intraosseous infiltration of platelet-rich plasma for severe knee osteoarthritis. *Arthrosc Tech.* (2014) 3:713. doi: 10.1016/j.eats.2014.09.006
- Bogers SH. Cell-based therapies for joint disease in veterinary medicine: what we have learned and what we need to know. *Front Vet Sci.* (2018) 5:70. doi: 10.3389/fvets.2018.00070
- Knop E, de Paula LE, Fuller R. Platelet-rich plasma for osteoarthritis treatment. *Rev Bras Reumatol.* (2016) 56:152–64. doi: 10.1016/j.rbr.2015.01.007
- Stief M, Gottschalk J, Ionita J, Einspanier A, Oechtering G, Boettcher P. Concentration of platelets and growth factors in canine autologous conditioned plasma. *Vet Comp Orthopaed Traumatol.* (2011) 24:122–5. doi: 10.3415/VCOOT-10-04-0064
- Kennedy MI, Whitney K, Evans T, LaPrade RF. Platelet-rich plasma and cartilage repair. *Curr Rev Musculoskelet Med.* (2018) 11:573–82. doi: 10.1007/s12178-018-9516-x
- Ha C, Park Y, Jang JW, Kim M, Kim J, Park Y. Variability of the composition of growth factors and cytokines in platelet-rich plasma from the knee with osteoarthritis. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* (2019) 35:2878. doi: 10.1016/j.arthro.2019.04.010
- Kwan Tat S, Lajeunesse D, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* (2010) 24:51–70. doi: 10.1016/j.berh.2009.08.004
- Pan J, Wang B, Li W, Zhou X, Scherr T, Yang Y, et al. Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints. *Bone.* (2012) 51:212–7. doi: 10.1016/j.bone.2011.11.030
- Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol.* (2016) 12:632–44. doi: 10.1038/nrrheum.2016.148
- Torres-Torrillas M, Damià E, Cerón JJ, Carrillo JM, Peláez P, Miguel L, et al. Treating full depth cartilage defects with intraosseous infiltration of plasma rich in growth factors: an experimental study in rabbits. *Cartilage.* (2021) 2:766–73. doi: 10.1177/19476035211057246
- Fiz N, Perez JC, Guadilla J, Garate A, Sanchez P, Padilla S, et al. Intraosseous infiltration of platelet-rich plasma for severe hip osteoarthritis. *Arthrosc Tech.* (2017) 6:e821–5. doi: 10.1016/j.eats.2017.02.014
- Sanchez M, Delgado D, Sanchez P, Muinos-Lopez E, Paiva B, Granero-Molto F, et al. Combination of intra-articular and intraosseous injections of platelet rich plasma for severe knee osteoarthritis: a pilot study. *Biomed Res Int.* (2016) 4868613. doi: 10.1155/2016/4868613
- Sanchez M, Anitua E, Delgado D, Sanchez P, Prado R, Jose Goiriena J, et al. A new strategy to tackle severe knee osteoarthritis: combination of intra-articular and intraosseous injections of platelet rich plasma. *Exp Opin Biol Ther.* (2016) 16:627–43. doi: 10.1517/14712598.2016.1157162
- Lopa S, Colombini A, Moretti M, de Girolamo L. Injective mesenchymal stem cell-based treatments for knee osteoarthritis: from mechanisms of action to current clinical evidences. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* (2019) 27:2003–20. doi: 10.1007/s00167-018-5118-9
- Mancuso P, Raman S, Glynn A, Barry E, Murphy JM. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: the critical role of the cell secretome. *Front Bioeng Biotechnol.* (2019) 7:9. doi: 10.3389/fbioe.2019.00009
- Tavakoli S, Jafarbeigloo HRG, Shariati A, Jahangiryan A, Jadidi F, Kouhbanani MAJ, et al. Mesenchymal stromal cells; a new horizon in regenerative medicine. *J Cell Physiol.* (2020) 235:9185–210. doi: 10.1002/jcp.29803
- Jeyaraman M, Muthu S, Ganie PA. Does the source of mesenchymal stem cell have an effect in the management of osteoarthritis of the knee? Meta-analysis of randomized controlled trials. *Cartilage.* (2021) 13(1_Suppl):15325–47S. doi: 10.1177/1947603520951623
- Peláez P, Damià E, Torres-Torrillas M, Chicharro D, Cuervo B, Miguel L, et al. Cell and cell free therapies in osteoarthritis. *Biomedicines.* (2021) 9:1726. doi: 10.3390/biomedicines9111726
- Kuroda Y, Matsumoto T, Hayashi S, Hashimoto S, Takayama K, Kirizaki S, et al. Intra-articular autologous uncultured adipose-derived stromal cell

- transplantation inhibited the progression of cartilage degeneration. *J Orthopaed Res.* (2019) 37:1376–86. doi: 10.1002/jor.24174
28. Mocchi M, Dotti S, Bue MD, Villa R, Bari E, Perteghella S, et al. Veterinary regenerative medicine for musculoskeletal disorders: can mesenchymal stem/stromal cells and their secretome be the new frontier? *Cells.* (2020) 9:1453. doi: 10.3390/cells9061453
29. Vilar JM, Morales M, Santana A, Spinella G, Rubio M, Cuervo B, et al. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endorep in osteoarthritic dogs. *BMC Vet Res.* (2013) 9:131. doi: 10.1186/1746-6148-9-131
30. Vilar JM, Batista M, Morales M, Santana A, Cuervo B, Rubio M, et al. 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 Vet Res.* (2014) 10:143. doi: 10.1186/1746-6148-10-143
31. Cuervo B, Rubio M, Sopena J, Manuel Dominguez J, Vilar J, Morales M, et al. Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *Int J Mol Sci.* (2014) 15:13437–60. doi: 10.3390/ijms150813437
32. Black LL, Gaynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, et al. 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. *Vet Ther.* (2007) 8:272–84.
33. Black L, Gaynor J, Adams C, Dhupa S, Sams A, Taylor R, et al. Effect of Intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Vet Ther.* (2008) 9.
34. van Spil WE, Szilagyi IA. Osteoarthritis year in review 2019: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis Cartil.* (2020) 28:296–315. doi: 10.1016/j.joca.2019.11.007
35. Conrozier T, Poole AR, Ferrand F, Mathieu P, Vincent F, Piperno M, et al. Serum concentrations of type II collagen biomarkers (C2C, C1, 2C and CPH) suggest different pathophysiologies in patients with hip osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol.* (2008) 26:430–5.
36. Garnero P, Ayril X, Rousseau JC, Christgau S, Sandell LJ, Dougados M, et al. Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* (2002) 46:2613–24. doi: 10.1002/art.10576
37. Vilar JM, Rubio M, Spinella G, Cuervo B, Sopena J, Cugat R, et al. Serum collagen type II cleavage epitope and serum hyaluronic acid as biomarkers for treatment monitoring of dogs with hip osteoarthritis. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0149472. doi: 10.1371/journal.pone.0149472
38. Chu Q, Lopez M, Hayashi K, Ionescu M, Billingham RC, Johnson KA, et al. Elevation of a collagenase generated type II collagen neoepitope and proteoglycan epitopes in synovial fluid following induction of joint instability in the dog. *Osteoarthritis Cartil.* (2002) 10:662–9. doi: 10.1053/joca.2002.0812
39. Lu Y, Markel MD, Swain C, Kaplan LD. Development of partial thickness articular cartilage injury in an ovine model. *J Orthopaed Res.* (2006) 24:1974–82. doi: 10.1002/jor.20249
40. Coppelman EB, David FH, Toth F, Ernst NS, Trumble TN. The association between collagen and bone biomarkers and radiographic osteoarthritis in the distal tarsal joints of horses. *Equine Vet J.* (2020) 52:391–8. doi: 10.1111/evj.13187
41. Amey LG, Deberg M, Oliveira M, Labasse A, Aeschlimann JM, Henrotin Y. The chemical biomarkers C2C, Coll2-1, and Coll2-1NO provide complementary information on type II collagen catabolism in healthy and osteoarthritic mice. *Arthritis Rheum.* (2007) 56:3336–46. doi: 10.1002/art.22875
42. Huebner JL, Kraus VB. Assessment of the utility of biomarkers of osteoarthritis in the guinea. *Osteoarthritis Cartil.* (2006) 14:923–30. doi: 10.1016/j.joca.2006.03.007
43. Kraus VB, Hargrove DE, Hunter DJ, Renner JB, Jordan JM. Establishment of reference intervals for osteoarthritis-related soluble biomarkers: the FNIH/OARSI OA Biomarkers Consortium. *Ann Rheum Dis.* (2017) 76:179–85. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209253
44. de Bakker E, Stroobants V, VanDael F, Ryssen BV, Meyer E. Canine synovial fluid biomarkers for early detection and monitoring of osteoarthritis. *Vet Rec.* (2017) 180:328–9. doi: 10.1136/vr.103982
45. Goebel L, Orth P, Muller A, Zurakowski D, Buckner A, Cucchiari M, et al. Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 94 T-comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthritis Cartil.* (2012) 20:1046–55. doi: 10.1016/j.joca.2012.05.010
46. Zhai C, Fei H, Hu J, Cui W, Li Z, Fan W, et al. Intraarticular injection autologous platelet-rich plasma and bone marrow concentrate in a goat osteoarthritis model. *J Orthopaed Res.* (2018) 36:2140–6. doi: 10.1002/jor.23877
47. Sanchez M, Delfado D, Pompei O, Carlos Perez J, Sanchez P, Garate A, et al. Treating severe knee osteoarthritis with combination of intra-osseous and intra-articular infiltrations of platelet-rich plasma: an observational study. *Cartilage.* (2019) 10:245–53. doi: 10.1177/1947603518756462
48. Malanin DA, Sikilinda VD, Gorbatenko AI, Demeshchenko MV, Suchilin IA, Kondrashenko VV, et al. Intraosseous injection of autologous bone marrow aspirate concentrate and platelet-rich plasma for treatment of knee osteoarthritis. *Travmatol Ortopediya Rossi.* (2021) 27:69–81. doi: 10.21823/2311-2905-1669
49. Delgado D, Garate A, Vincent H, Bilbao AM, Patel R, Fiz N, et al. Current concepts in intraosseous platelet-rich plasma injections for knee osteoarthritis. *J Clin Orthopaed Trauma.* (2019) 10:36–41. doi: 10.1016/j.jcot.2018.09.017
50. Hernigou P, Auregan JC, Dubory A, Flouzat-Lachaniette CH, Chevallier N, Rouard H. Subchondral stem cell therapy versus contralateral total knee arthroplasty for osteoarthritis following secondary osteonecrosis of the knee. *Int Orthop.* (2018) 42:2563–71. doi: 10.1007/s00264-018-3916-9
51. Lychagin A, Lipina M, Garkavi A, Isaiet O, Timashev P, Ashmore K, et al. Intraosseous injections of platelet rich plasma for knee bone marrow lesions treatment: one year follow-up. *Int Orthop.* (2021) 45:355–63. doi: 10.1007/s00264-020-04546-5
52. Su K, Bai YM, Wang J, Zhang HS, Liu H, Ma SY. Comparison of hyaluronic acid and PRP intra-articular injection with combined intra-articular and intraosseous PRP injections to treat patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol.* (2018) 37:1341–50. doi: 10.1007/s10067-018-3985-6
53. Deppermann C, Kubers P. Start a fire, kill the bug: the role of platelets in inflammation and infection. *Innate Immun.* (2018) 24:335–48. doi: 10.1177/1753425918789255
54. Everts PA, van Erp A, DeSimone A, Cohen DS, Gardner RD. Platelet rich plasma in orthopedic surgical medicine. *Platelets.* (2021) 32:163–74. doi: 10.1080/09537104.2020.1869717
55. Muinos-Lopez E, Delgado D, Sanchez P, Paiva B, Anita E, Fiz N, et al. Modulation of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells by intra-articular and intraosseous platelet rich plasma administration. *Stem Cells Int.* (2016) 2016:1247950. doi: 10.1155/2016/1247950
56. Van Pham P, Bai KH, Ngo DQ, Vu NB, Truong NH, Phan NL, et al. Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage. *Stem Cell Res Therapy.* (2013) 11:2285–95. doi: 10.1186/s12927
57. Ahmad MR, Badar W, Khan MAU, Mahmood A, Latif N, Iqbal T, et al. Combination of preconditioned adipose-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma improves the repair of osteoarthritis in rat. *Regen Med.* (2020) 15:2285–95. doi: 10.2217/rme-2020-0040
58. Javier Rodriguez-Jimenez F, Valdes-Sanchez T, Carrillo JM, Rubio M, Monleon-Prades M, Mercedes Garcia-Cruz D, et al. Platelet-rich plasma favors proliferation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells in methacrylate-encapsulated caprolactone porous scaffold niches. *J Funct Biomater.* (2012) 3:556–68. doi: 10.3390/jfb3030556
59. Beigi MH, Atefi A, Ghanai HR, Labbaf S, Ejeian F, Nasr-Esfahani MH. Activated platelet-rich plasma improves cartilage regeneration using adipose stem cells encapsulated in a 3D alginate scaffold. *J Tissue Eng Regen Med.* (2018) 12:1327–38. doi: 10.1002/term.2663

Anexo 3



OPEN ACCESS

EDITED BY
Gustavo Rosa,
São Paulo State University (UNESP), Brazil

REVIEWED BY
Elisabetta Chiaradia,
University of Perugia, Italy
Mudasir Bashir Gugjoo,
Sher-e-Kashmir University of Agricultural
Sciences and Technology of Kashmir, India

*CORRESPONDENCE
Mónica Rubio
✉ mrubio@uchceu.es

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Veterinary Regenerative Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

RECEIVED 25 December 2022
ACCEPTED 13 March 2023
PUBLISHED xx xx 2023

CITATION
Torres-Torrillas M, Damiá E, Romero Ad,
Pelaez P, Miguel-Pastor L, Chicharro D,
Carrillo JM, Rubio M and Sopena JJ (2023)
Intra-osseous plasma rich in growth factors
enhances cartilage and subchondral bone
regeneration in rabbits with acute full thickness
chondral defects: Histological assessment.
Front. Vet. Sci. 10:1131666.
doi: 10.3389/fvets.2023.1131666

COPYRIGHT
© 2023 Torres-Torrillas, Damiá, Romero,
Pelaez, Miguel-Pastor, Chicharro, Carrillo,
Rubio and Sopena. This is an open-access
article distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License (CC BY).
The use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in this
journal is cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Intra-osseous plasma rich in growth factors enhances cartilage and subchondral bone regeneration in rabbits with acute full thickness chondral defects: Histological assessment

Marta Torres-Torrillas^{1,2}, Elena Damiá^{1,2}, Ayla del Romero^{1,2}, Pau Pelaez^{1,2}, Laura Miguel-Pastor^{1,2}, Deborah Chicharro^{1,2}, José M. Carrillo^{1,2}, Mónica Rubio^{1,2*} and Joaquín J. Sopena^{1,2}

¹Bioregenerative Medicine and Applied Surgery Research Group, Department of Animal Medicine and Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, Valencia, Spain, ²García Cugat Foundation CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, Valencia, Spain

Background: Intra-articular (IA) combined with intra-osseous (IO) infiltration of plasma rich in growth factors (PRGF) have been proposed as an alternative approach to treat patients with severe osteoarthritis (OA) and subchondral bone damage. The aim of the study is to evaluate the efficacy of IO injections of PRGF to treat acute full depth chondral lesion in a rabbit model by using two histological validated scales (OARSI and ICRS II).

Methodology: A total of 40 rabbits were included in the study. A full depth chondral defect was created in the medial femoral condyle and then animals were divided into 2 groups depending on the IO treatment injected on surgery day: control group (IA injection of PRGF and IO injection of saline) and treatment group (IA combined with IO injection of PRGF). Animals were euthanized 56 and 84 days after surgery and the condyles were processed for posterior histological evaluation.

Results: Better scores were obtained in treatment group in both scoring systems at 56- and 84-days follow-up than in control group. Additionally, longer-term histological benefits have been obtained in the treatment group.

Conclusions: The results suggests that IO infiltration of PRGF enhances cartilage and subchondral bone healing more than the IA-only PRGF infiltration and provides longer-lasting beneficial effects.

KEYWORDS

platelet rich plasma, growth factors, osteoarthritis, chondral defect, articular cartilage, histology, bioregenerative therapies

1. Introduction

Osteoarthritis (OA) developing from age-related wear and tear, chronic diseases or traumatic injuries can lead to progressive cartilage degeneration and damage to osteochondral junction and subchondral bone (SB) (1). Pathological changes observed in OA joints include progressive destruction of articular cartilage (AC), thickening of the SB, swelling of the synovium, degeneration of intra-articular (IA) structures such as ligaments and menisci, osteophytes formation, and hypertrophy of the joint capsule (2). The relevance of the pathology lies in its high prevalence and the continuous pain suffered by the patient, limiting its quality of life. OA affects over 20% of canine population (3, 4), 90% of cats over 12 years of age (5, 6), and more than 50% of horses older than 15 years (7–9), which makes OA the most diagnosed joint disease in companion animals.

Although a great variety of treatment, such as anti-inflammatory drugs and analgesics, have been used to reduce pain and improve functionality, so far these treatments can only relieve symptoms and do not regenerate the damaged tissue (10). AC lacks blood vessels, giving it a very limited natural regenerative potential, so full thickness chondral defects generally require clinical intervention to enable lesion healing (11). During the last years AC repair through tissue engineering has become a promising alternative, and IA infiltrations of platelet rich plasma (PRP) have been widely used as an effective biological approach to improve AC regeneration due to its chondro-inductive properties and abundant pool of growth factors (GF) (12, 13).

PRP is composed of different GF and proteins such as fibrinogen, vitronectin and fibronectin that play a key role during AC repair (14). Several GF have demonstrated to be crucial in cartilage regeneration including transforming growth factor β , involved in matrix production, cell proliferation and chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) implicated in collagen type II expression; insulin-like growth factor-1, which modulates chondrogenesis and induce MSCs proliferation; platelet-derived growth factor (PDGF) that stimulates angiogenesis and proteoglycan production; and fibroblast growth factor-2, which promotes chondrocyte and MSCs proliferation (15).

Despite the positive outcomes reported in several studies, this cell free therapy still has some limitations, such as the differences between PRP obtention protocols and thus differences in composition and platelet concentration. Plasma rich in growth factors (PRGF) (PRGF[®]-Endoret[®], BTI Biotechnology Institute, Spain) is a specific technology that allows obtaining, in a single centrifugation process, an autologous PRP preparation with a platelet concentration 2.5 times higher than that of whole blood, and with absence of white and red blood cells (16, 17). This technology reduces proinflammatory activity, and several studies have assessed its clinical use in orthopedics and other medical fields (18).

Another limitation of this bioregenerative therapy is due its administration route. PRP is commonly administrated via IA injections, which have shown to be effective in patients with mild or moderate OA (19, 20). However, some authors have recently described its limitation in patients with severe degrees of OA, when the SB is affected since, PRP cannot reach the deeper layers of the AC or the SB (21, 22).

The SB is the bony tissue lying beneath the calcified zone of the AC and includes both, the cortical plate and the subchondral trabecular bone. The subchondral bone plate is a thin layer of cortical bone underlying the calcified cartilage that provides mechanical strength to support the AC. Additionally, in the cortical plate there are canals that allow the exchange of nutrients and molecules between the SB and the AC (23). The subchondral trabecular bone lies underneath the subchondral bone plate, and it is more porous and metabolically active (24). The osteochondral unit in the joint consists of AC, calcified cartilage, and SB; and it is responsible for transfer loads during joint movement. In OA, the integrity of the osteochondral unit is breached, and the cross-talk between cartilage and SB is increased. SB undergoes drastic changes in composition and structural organization that negatively affects the overlying AC (24). In early stages of the disease, bone loss is found, followed by increased trabecular thickness and, in severe stages, cancellous bone collapse can be present (25). These structural changes in the SB lead to the activation of proinflammatory cytokines, both in the SB and the AC, thus perpetuating OA (26). Increasing evidence points to SB as the primary tissue responsible for pain and chronic inflammation, which may be the main driver of OA (27–29). Moreover, the SB is an important element in maintaining joint homeostasis and it is directly communicated with the AC, so any change in the SB microenvironment can affect cartilage metabolism (30, 31).

Combining intra-osseous (IO) and IA PRP injections to target SB can provide a more complete treatment by stimulating biological processes that lead to a homeostatic environment in the whole joint, which also influences the behavior of MSCs that coordinate SB and AC remodeling (32, 33). Various research groups have already showed that the IO approach is safe and provides longer-term functional and clinical benefits compared to IA injections of PRP alone (34–37). Moreover, our research team has previously investigated the efficacy of the IO infiltration technique in acute chondral lesions in rabbits, and better macroscopical and serum biomarkers results were obtained in animals in which IA PRP was combined with IO infiltration (38, 39).

The present study hypothesizes that IA together with IO infiltration of PRGF could improve the regenerative potential of IA PRGF infiltration alone. With that basis, the aim of the study is to histologically assess the effectiveness of IO PRGF in a model of full depth chondral defects in rabbits by using two validated scales (40, 41).

2. Materials and methods

The Ethics Committee of Animal Welfare (CEEA) of the University CEU Cardenal Herrera de Valencia (Spain) approved the study with the following approval code: 2019/VSC/PEA/0153, in accordance with the Spanish policy for Animal Protection (RD118/2021), which conforms with the European Union Directive 2010/63/UE.

2.1. Animals

A total of 40 female New Zealand rabbits (6 months old), 20 animals per treatment group (control or treatment) with a mean

weight of 4.24 kg were used to complete a prospective randomized experimental study. Animals were allowed to have food and water ad libitum and were housed in individual big cages without movement restriction. An acclimation period of 15 days was established at the beginning of the study to allow rabbits adaptation. Inclusion criterion consisted of a normal physical examination and a normal hematology and serum biochemical analysis. These tests were completed 10 days prior to beginning the experiment and all results were considered normal reference values for the species.

During all the study time, rabbits were examined daily to detect signs of pain, infection, and weight loss. The rabbit Grimace Scale was performed twice a day during the first 7 days after the surgery and once a day during the rest of the study. If a score equal or >4 was obtained, buprenorphine 0.1 mg/kg SC q8h (Bupaq[®], Richter Pharma AG, Austria) was given as a rescue analgesia. If any animal showed critical aggravation of their functional or physical condition, they were excluded from the study. Only one animal was excluded due to a severe infection in the surgical area.

At the end of the study, rabbits were euthanized in agreement with Spanish Policy for Animal Protection (RD118/2021).

2.2. Study groups

Depending on the IO treatment received, animals were divided into 2 groups of 20 animals each:

- Control group (CT): IA infiltration with PRGF combined with IO infiltration with sterile saline solution.
- Treatment group (TRT): IA infiltration with PRGF combined with IO infiltration with PRGF.

2.3. Plasma rich in growth factors

Rabbits were sedated with IM dexmedetomidine (0.05 mg/kg; Dexdomitor[®], Esteve, Spain), IM ketamine (10 mg/kg; Imalgene[®], Merial, Spain), and IM morphine (1 mg/kg; B-Braun[®], Germany). After sedation, a total of 15 mL of blood were collected from the auricular artery of each rabbit under sterile conditions in vacutainer sodium citrate 3.8% tubes (BD Vacutainer[®] 9NC, New Jersey, USA) (Figure 1). PRGF[®]-Endoret[®] technology was used to obtain an autologous preparation of PRP. The blood tubes were centrifugated at 460 g for 8 min (PRGF[®] System III, Biotechnology Institute[®], Álava, Spain) to separate the different blood phases. A sterile fractionation tube was used to collect PRGF with sterile pipettes. Just before IA or IO infiltration, 10% calcium chloride was added to the PRGF (50 µl/ml of PRGF) to activate platelets for GF release.

2.4. Articular cartilage defect model

Following sedation and anesthesia induction with sevoflurane (Sevoflo[®], Esteve, Spain), a full thickness chondral defect was created in the rabbits' knees. Both lower limbs were shaved and trimmed with an antiseptic solution prior to surgical intervention.



FIGURE 1
Blood extraction from the auricular artery for PRGF obtention. A 21G Venofix connected to a 21G hypodermic needle by a male-male luer-lock connector was used for this purpose. The blood was collected in vacutainer sodium citrate 3.8% tubes.

The rabbit's knee was kept in complete flexion to perform a skin incision 10 mm long over the margin of the medial femoral condyle, followed by an incision of the fascia and joint capsule. The medial femoral condyle was then exposed, and the loading area was identified. A full thickness chondral defect, 4 mm in diameter and 5 mm in depth was then created with a drill bit and with the help of a drilling guide. The blood that oozed out after the creation of the defect has cleared with sterile saline solution and dried with sterile gauzes. Both knees were subjected to an identical surgical procedure. After creating the defect, simple stitches were used to close the joint capsule, fascia and skin using 3/0 polyglyconate (Novosyn[®] Quick, B-Braun, Germany).

Following surgery all animals were treated with anti-inflammatory drugs (meloxicam 0.3 mg/kg SC q24h; Metacam[®], Boehringer Ingelheim, Spain) and antibiotic (enrofloxacin 10 mg/kg SC q24h; Ganadexil[®], Invesa, Spain) for a 7-day period. Rabbits were monitored daily, if any animal showed radical worsening in their physical or functional condition, such as severe local infection or severe traumatic lesions, they were excluded from the study.



FIGURE 2
Intra-articular infiltration with plasma rich in growth factors. A 22-G needle was inserted laterally to the patellar tendon and 0.25 mL of plasma rich in growth factors were IA injected.



FIGURE 3
Intra-osseous infiltration of plasma rich in growth factors. An 18-G spinal needle was inserted perpendicular to the femur in the lateral supracondylar region with gentle rotation movements.

2.5. Intra-articular and intra-osseous infiltration

With the knee in complete flexion, a 22-G needle was inserted laterally to the patellar tendon and 0.25 mL of PRGF were IA injected in all animals regardless of the treatment group (Figure 2). Finally, with the limb in a relaxed position, the IO infiltration was performed with an 18-G spinal needle inserted perpendicular to the femur in the lateral supracondylar region with gentle rotation movements, and 0.5 mL of sterile saline solution or PRGF depending on the treatment group (CT or TRT respectively) were injected (Figure 3). A mean time of 7.21 min elapsed from defect creation to IA and IO infiltration.

TABLE 1 OARSI Histological assessment of articular cartilage changes in rabbit model of OA.

Parameter	Score	Description
Safranin-O staining	0	Uniform staining throughout articular cartilage
	1	Loss of staining in superficial zone of hyaline cartilage < 50% of the length of the condyle
	2	Loss of staining in superficial zone of hyaline cartilage ≥ 50% of the length of the condyle
	3	Loss of staining in the upper 2/3's of hyaline cartilage < 50% of the length of the condyle
	4	Loss of staining in the upper 2/3's of hyaline cartilage ≥ 50% of the length of the condyle
	5	Loss of staining in all the hyaline cartilage < 50% of the length of the condyle
	6	Loss of staining in all the hyaline cartilage ≥ 50% of the length of the condyle
Structure	0	Normal
	1	Surface irregularities
	2	Fissures in < 50% of the surface
	3	Fissures in ≥ 50% of the surface
	4	Erosion 1/3 hyaline cartilage < 50% of the surface
	5	Erosion 1/3 hyaline cartilage ≥ 50% of the surface
	6	Erosion 2/3 hyaline cartilage < 50% of the surface
	7	Erosion 2/3 hyaline cartilage ≥ 50% of the surface
	8	Full depth erosion hyaline cartilage < 50% of the surface
	9	Full depth erosion hyaline cartilage ≥ 50% of the surface
	10	Full depth erosion hyaline and calcified cartilage to the subchondral bone < 50% of the surface
11	Full depth erosion hyaline and calcified cartilage to the subchondral bone ≥ 50% of the surface	
Chondrocyte Density	0	No decrease in cells
	1	Focal decrease in cells
	2	Multifocal decrease in cells
	3	Multifocal confluent decrease in cells
	4	Diffuse decrease in cells
Cluster Formation	0	Normal
	1	< 4 clusters
	2	≥ clusters but < 8 clusters
	3	≥ 8 clusters

Obtained from The OARSI histopathology initiative. For the purposes of the OARSI histological score for rabbits, articular cartilage is divided into four zones: superficial zone (upper 1/3 of hyaline cartilage), middle zone (middle 1/3 of hyaline cartilage), deep zone (deep 1/3 of hyaline cartilage), and the calcified cartilage. The scale ranges from 0 to 24 points, being 24 the worst possible result (41).

TABLE 2 ICERS II Parameters and scores description.

Parameter	Score	Description
Matrix staining	0%	No staining
	100%	Full metachromasia
Cell morphology	0%	No round/oval cells
	100%	Mostly round/oval cells
Chondrocyte clustering	0%	Present
	100%	Absent
Surface architecture	0%	Delamination, major irregularity
	100%	Smooth surface
Basal integration	0%	No integration
	100%	Complete integration
Formation of a tidemark	0%	No calcification front
	100%	Tidemark
Subchondral bone abnormalities	0%	Abnormal
	100%	Normal marrow
Inflammation	0%	Present
	100%	Absent
Abnormal calcification	0%	Present
	100%	Absent
Vascularization	0%	Present
	100%	Absent
Superficial assessment	0%	Total loss or complete disruption
	100%	Resembles intact articular cartilage
Mid/deep zone assessment	0%	Fibrous tissue
	100%	Normal hyaline cartilage
Overall assessment	0%	Bad (fibrous tissue)
	100%	Good (hyaline cartilage)

The criteria identified to represent the ICERS II scoring system comprise 13 parameters. Each criterion should be evaluated based on the visual analog scale and graded from 0 (worst) to 100 (best) (41).

2.6. Animals' euthanasia

Animals were euthanized in compliance with Spanish Policy for Animal Protection (RD118/2021). Rabbits were sedated with dexmedetomidine (0.05 mg/kg IM; Dexdomitor[®], Esteve, Spain) and ketamine (10 mg/kg IM; Imalgene[®], Merial, Spain), and thereafter and IV injection of pentobarbital sodium (150 mg/kg; Dolethal[®], Vetoquinol, France) in the marginal ear vein was given.

A total of 19 rabbits were euthanized 56-days following the infiltration (9 animals from the CT group and 10 animals from the TRT group). The rest of the animals (10 animals from the CT group and 10 animals from the TRT group) were euthanized at 84-days follow up.

2.7. Tissue processing, sectioning, and staining

After animals were euthanized both femurs were excised and fixed in neutral buffered formaldehyde 4% for 15 days and then decalcified in bisodic EDTA in acid buffer (Osteodec[®], Bio-Optica, Milano, Italy) for 5 weeks. Every week the samples were re-fixed in neutral buffered formaldehyde 4% for 48 h. Then, the decalcified tissue was dehydrated for 50 h in a tissue processor (Leica biosystems[®], Amsterdam, Netherlands) using a series of 70–100% ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin. Paraffin-embedded sections were cut at 5 µm on a microtome in parasagittal plane and six sections per condyle were evaluated. The sections were stained with Weigert's Hematoxylin and Safranin-O Fast Green and the joint degeneration was evaluated using the OARSI histological score proposed for rabbits (41), and an adaptation of the ICERS II scoring system (40). A photomicroscope and an attached digital camera were used to digitalize the stained sections, which were evaluated by a blinded pathologist.

The OARSI histological assessment of articular cartilage changes in the rabbit model of OA is described in Table 1 (41), and the adapted ICERS II scoring system is explained in Table 2 (40).

2.8. Statistical analysis

A power analysis consistent with results published in previous research, in which only IA PRP was infiltrated (42), was used to calculate the sample size. An alpha level of 0.02 and a power of 80% were established.

The data were processed using the SPSS 20.0 program for Windows (SPSS[®] Inc., Chicago, USA). A descriptive study of the mean and standard deviation was performed for each variable. Mann-Whitney test was used to compare the variables. A $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

A total of 39 rabbits completed the study (19 in the CT group and 20 in the TRT group). One rabbit was excluded from the study due to a severe multidrug resistant infection in the surgical area.

Regarding the platelet concentration in whole blood, a mean value of $439,984 \times 10^3 \pm 180,179 \times 10^3 / \mu\text{l}$ was obtained. However, after blood centrifugation, the mean platelet concentration within the PRGF fraction was $1023 \times 10^3 \pm 341,183 \times 10^3 / \mu\text{l}$.

3.1. OARSI histological score

Significant differences between the CT group and the TRT group were demonstrated for each studied parameter at both study times.

In the group of rabbits sacrifice at 56-days follow-up, significantly higher scores were observed in the CT group for criterion safranin-O staining ($p < 0.001$), AC structure ($p < 0.001$), chondrocyte density ($p < 0.001$) and cluster formation ($p = 0.001$) than in the TRT group. Accordingly, the CT group showed a

TABLE 3 OARSI Score means, standard deviation and *p*-values.

OARSI Score	56- days			84- days		
	CT	TRT	<i>P</i> -value	CT	TRT	<i>P</i> -value
Safranin-O Staining	3.80 ± 1.15	1.88 ± 0.50	< 0.001	3.29 ± 1.07	0.94 ± 0.85	< 0.001
Articular Cartilage Structure	6.00 ± 1.41	2.13 ± 0.81	< 0.001	4.71 ± 1.73	1.13 ± 0.81	< 0.001
Chondrocyte Density	3.40 ± 0.99	1.31 ± 0.87	0.001	2.79 ± 0.96	1.13 ± 0.62	< 0.001
Cluster Formation	2.40 ± 0.51	1.56 ± 0.51	< 0.001	2.29 ± 0.83	0.94 ± 0.772	< 0.001
Total score	15.60 ± 2.41	6.88 ± 1.63	< 0.001	13.07 ± 2.73	4.13 ± 2.16	< 0.001

CT, Control group; TRT, treatment group.

significantly greater total score than the TRT group ($p < 0.001$). The mean and standard deviation for each parameter are described in Table 3.

Similar results were shown in rabbits 84-days after infiltration. Significantly higher scores were reported in the CT group than in the TRT group for the following OARSI scale parameters: safranin-O staining ($p < 0.001$), AC structure ($p < 0.001$), chondrocyte density ($p < 0.001$) and cluster formation (p -value < 0.001). Hence, the TRT group showed significantly lower total score than the CT group ($p < 0.001$). The mean and standard deviation for each criterion are described in Table 3.

Moreover, the CT group showed significantly higher scores at 56 days follow-up than at 84-days follow-up for the parameter AC structure ($p = 0.037$), while no significant differences between sacrifice time were reported for the criterion: safranin-O staining ($p = 0.2239$), chondrocyte density ($p = 0.103$), cluster formation ($p = 0.654$) and total score ($p = 0.062$).

On the other hand, significantly higher scores were showed in the TRT group 56-days following infiltration than 84-days after the infiltration for the following parameters: safranin-O staining ($p < 0.001$), AC structure ($p = 0.001$), cluster formation ($p = 0.011$) and total score ($p < 0.001$) (Figure 1). No significant differences between sacrifice time were reported in the TRT group for the criteria chondrocyte density ($p = 0.489$).

Regarding the parameter safranin-o staining, a loss of staining in the superficial and mid/ deep zones was reported in the CT group at both study times, thus meaning a lack in proteoglycan content; however, in the TRT group the staining was uniform throughout AC (Figure 4). Moreover, for the parameter structure, in the TRT group some small fissures and surface irregularities were reported at both studied times; nonetheless, in the CT group full depth erosions of the hyaline cartilage were reported at 56 days follow up, and erosions of 2/3 of hyaline cartilage were reported 84 days following infiltration (Figure 5). With regards to chondrocyte density, multifocal areas of chondrocytes decrease were identified in the condyles of CT rabbits at both study times, while for TRT animals focal decrease was reported (Figure 6). Finally, regarding cluster formation, the CT group showed an elevated presence of chondrocytes clusters both at 56- and 84-days follow-up; however, a lower presence of clusters was reported for the TRT group (Figure 6).

3.2. ICRS II histological score

Significant differences were demonstrated between groups at both study times for each variable of the ICRS II Histological Score.

In the rabbits euthanized 56-days after the infiltration, significantly higher scores were reported in the TRT group than in the CT group for the following studied parameters: matrix staining ($p < 0.001$), cell morphology ($p < 0.001$), chondrocyte clustering (p -value 0.01), surface architecture ($p < 0.001$), basal integration (p -value 0.001), formation of a tidemark ($p < 0.001$), SB abnormalities and marrow fibrosis ($p < 0.001$), inflammation ($p < 0.001$), abnormal calcification ($p = 0.001$), surface assessment ($p < 0.001$), mid/deep zone assessment ($p < 0.001$) and overall assessment ($p < 0.001$). Contrarily, significantly lower score was showed in the TRT group for the criteria vascularization ($p = 0.001$) than in the CT group. The mean and standard deviation for each parameter are described in Table 5.

Furthermore, in rabbits euthanized 84-days following the infiltration, significantly higher scores were reported in the TRT group than in the CT group for all the criterion included in the ICRS II score: matrix staining ($p < 0.001$), cell morphology ($p < 0.001$), chondrocyte clustering ($p < 0.001$), surface architecture ($p < 0.001$), basal integration ($p < 0.001$), formation of a tidemark ($p < 0.001$), SB abnormalities and marrow fibrosis ($p < 0.001$), inflammation ($p < 0.001$), abnormal calcification ($p = 0.001$), vascularization ($p = 0.004$), surface assessment ($p < 0.001$), mid/deep zone assessment ($p < 0.001$) and overall assessment ($p < 0.001$). The mean and standard deviation of each parameter are described in Table 5.

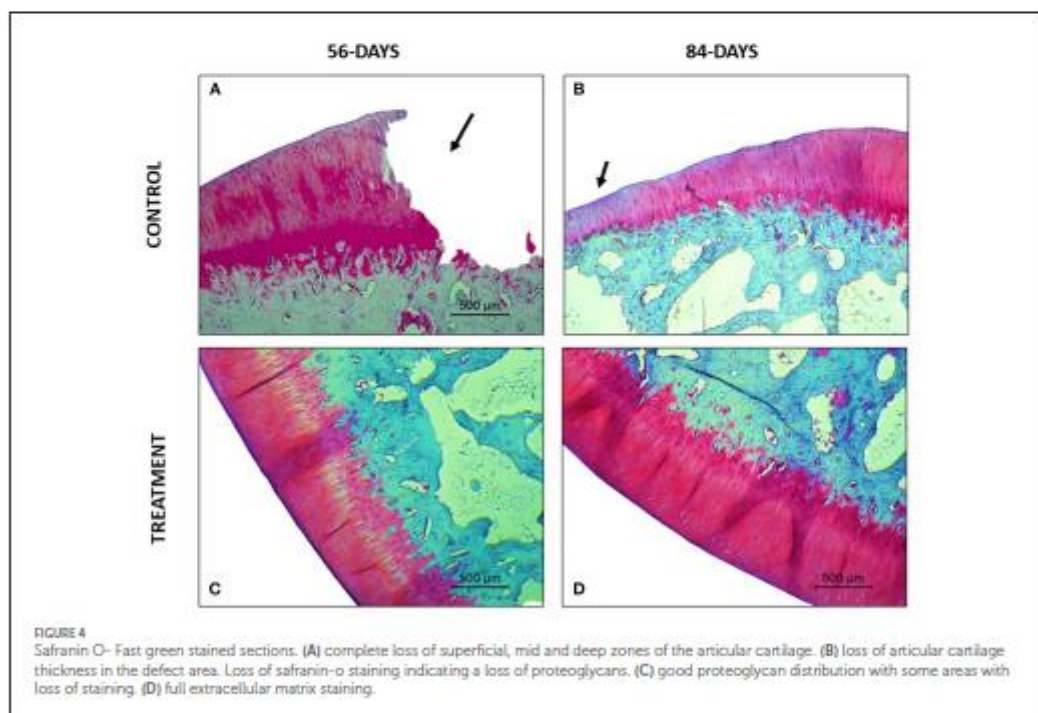
Moreover, the CT group showed no statistical differences between the obtained score at 56-days follow-up and at 84 days follow-up for the following criterion: matrix staining ($p = 0.30$), chondrocyte clustering ($p = 0.79$), SB architecture ($p = 0.06$), inflammation ($p = 0.45$), abnormal calcification ($p = 0.22$) and vascularization ($p = 0.26$). However, statistical differences between different the sacrifice points were reported for the following criterion: cell morphology ($p = 0.003$), surface architecture ($p = 0.001$), basal integration ($p < 0.001$), formation of a tidemark ($p = 0.014$), surface assessment ($p = 0.001$), mid/deep zone assessment ($p < 0.001$) and overall assessment ($p < 0.001$).

Regarding TRT group, no statistical differences between the results obtained 56-days following the infiltration and the ones obtained at 84-days were reported for the following parameters: matrix staining ($p = 0.083$), basal integration ($p = 0.126$),

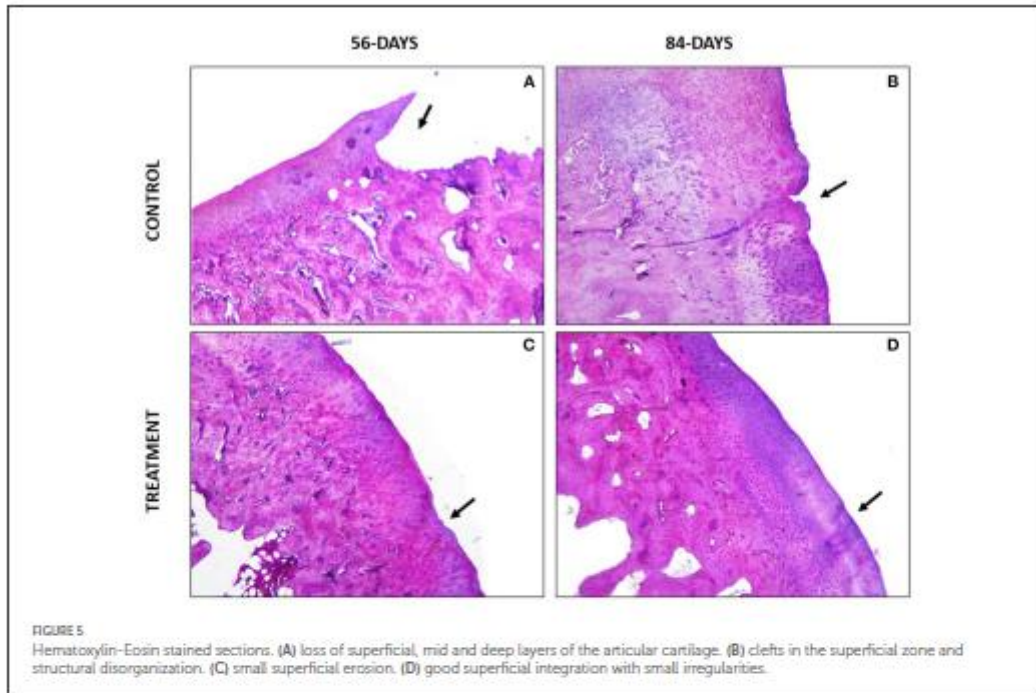
TABLE 4 ICRS II Score mean and standard deviation at 56 and 84 days follow-up.

ICRS II score	56-days			84-days		
	CT	TRT	P-value	CT	TRT	P-value
Matrix staining	52.50 ± 14.83	77.81 ± 11.10	< 0.001	47.14 ± 12.67	84.69 ± 10.56	< 0.001
Cell morphology	40.00 ± 9.66	71.88 ± 10.47	< 0.001	53.57 ± 13.36	85.00 ± 8.94	< 0.001
Chondrocyte clustering	45.63 ± 13.65	61.88 ± 16.82	0.01	47.14 ± 18.16	85.00 ± 10.94	< 0.001
Surface architecture	45.63 ± 14.13	68.13 ± 9.11	< 0.001	56.07 ± 11.13	78.75 ± 8.66	< 0.001
Basal integration	28.13 ± 21.05	74.38 ± 13.65	0.001	61.43 ± 10.99	81.25 ± 10.88	< 0.001
Formation of a tidemark	23.75 ± 8.85	67.50 ± 13.43	< 0.001	35.08 ± 14.14	80.06 ± 11.55	< 0.001
Subchondral bone abnormalities and marrow fibrosis	43.75 ± 9.57	82.50 ± 11.26	< 0.001	60.03 ± 10.38	81.88 ± 9.81	< 0.001
Inflammation	65.00 ± 16.73	86.25 ± 8.06	< 0.001	58.57 ± 28.52	94.06 ± 7.58	< 0.001
Abnormal calcification	67.50 ± 16.93	87.50 ± 10.00	< 0.001	71.43 ± 19.16	98.75 ± 3.42	< 0.001
Vascularization	60.63 ± 16.92	50.31 ± 6.45	0.001	67.14 ± 13.82	78.44 ± 8.11	0.004
Surface assessment	42.81 ± 14.60	69.69 ± 6.48	< 0.001	53.57 ± 12.77	80.09 ± 7.30	< 0.001
Mid/deep zone assessment	34.06 ± 4.91	66.56 ± 11.06	< 0.001	52.86 ± 10.08	79.38 ± 6.81	< 0.001
Overall assessment	38.44 ± 5.07	71.56 ± 11.21	< 0.001	53.57 ± 10.08	81.88 ± 8.34	< 0.001
Mean score	43.08 ± 6.56	72.28 ± 4.81	< 0.001	53.10 ± 9.31	83.77 ± 4.06	< 0.001

CT, Control group; TRT, Treatment group.



formation of a tidemark ($p = 0.095$) and SB abnormalities (0.868). On the other hand, statistical differences between the two sacrifice times were reported for the following criterion: cell morphology ($p < 0.001$), chondrocytes clustering ($p < 0.001$), surface architecture ($p = 0.002$), inflammation ($p = 0.008$), abnormal calcification ($p < 0.001$), vascularization ($p < 0.001$), surface assessment (p



< 0.001), mid/deep zone assessment ($p < 0.001$) and overall assessment ($p = 0.006$).

For the parameter matrix staining, a lack of safranin-O staining was present in the CT group (Figure 4) and, when hematoxylin-eosin stained the repaired cartilage in the CT group showed to be more eosinophilic than the repaired cartilage in the TRT group at both follow-up times. With regards to cell morphology, the CT group showed a lower presence of rounded or oval cells, while in the TRT group most cells were rounded. Moreover, an increased presence of chondrocytes clusters was reported in the CT group compared to TRT group (Figure 6). Regarding the criteria surface architecture, surface assessment and mid/deep zone assessment, in the TRT group small surface fissures with mostly normal organization of chondrocytes along the different cartilage zones was reported, with the highest results shown at 84 days follow-up, but contrarily, the CT showed deep clefts and deep erosions of the AC, with an abnormal distribution of chondrocytes (Figures 5, 6). A bad basal integration, a lack of tidemark formation and SB abnormalities were reported in the CT group, but better results were obtained 84 days after the infiltration. Regarding the parameter inflammation, inflammatory infiltration was reported in the CT group both at 56- and 84-days follow-up, whereas little presence of inflammatory cells was showed in the TRT group. The presence of blood vessels was specially increased 56 days after infiltration in the TRT group, however, the same group showed the best score for this parameter at 84 days follow-up. Finally, regarding overall assessment, the repaired tissue in the TRT group had characteristics similar of those of normal hyaline cartilage, however,

the defect in the CT group was regenerated with fibrocartilage-like tissue (Figure 7).

4. Discussion

In our study, better histological scores were obtained in rabbits treated with IA combined with IO injections of PRGF. The use of PRP to treat musculoskeletal disorders, including OA and chondral defects, has gained interest in veterinary clinical practice during the last years and IA infiltration has shown positive clinical and functional outcomes (43–47). However, in patients severely affected, the IA therapy is not able to reach all the structures involved in OA pathology, especially the SB (48).

Accordingly, several authors have proposed IA combined with IO infiltration of PRP to provide a more comprehensive treatment to patients severely affected, and previous results have already showed that this infiltration methodology is secure and provides better and longer functional and clinical improvements compared with IA injections alone (28, 34–37, 48–51). Moreover, our research team has recently reported that rabbits with acute full depth chondral defect treated with IA together with IO PRGF infiltrations showed better macroscopical AC repair than those treated with single IA injections of PRGF at 56- and 84-days follow-up (38).

The results obtained in the present research are in concordance with the ones previously published. The OARSI grading system uses 4 different parameters to assess the repair tissue and the defect gets a score ranging from 0 (normal AC), to 24 (extremely damaged

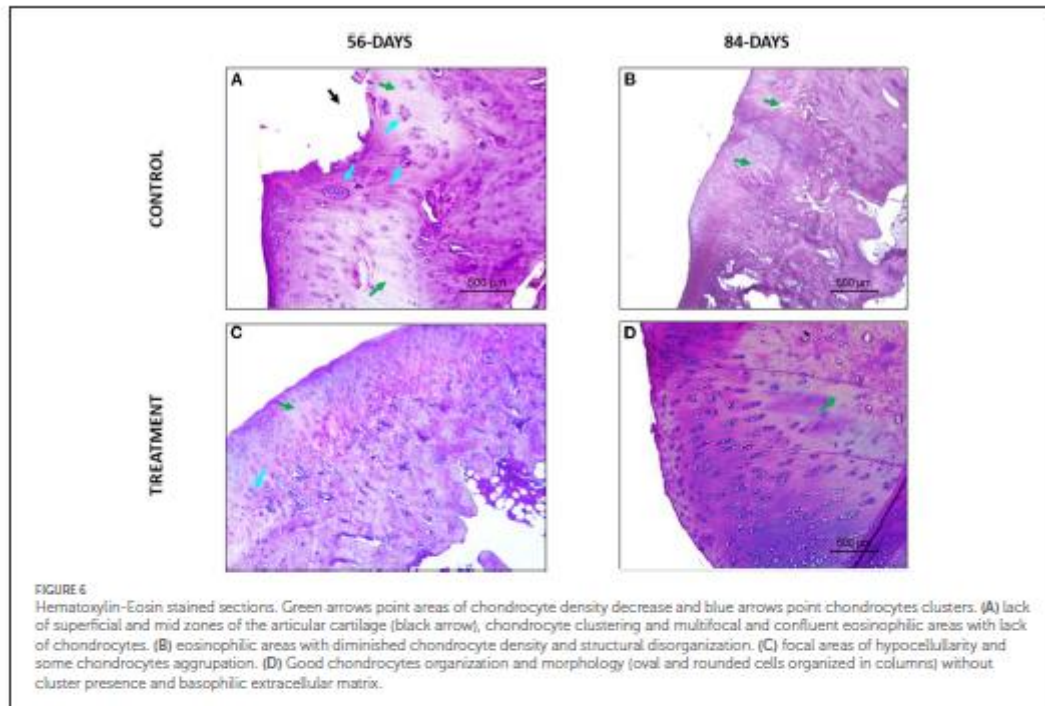


FIGURE 6
Hematoxylin-Eosin stained sections. Green arrows point areas of chondrocyte density decrease and blue arrows point chondrocytes clusters. (A) lack of superficial and mid zones of the articular cartilage (black arrow), chondrocyte clustering and multifocal and confluent eosinophilic areas with lack of chondrocytes. (B) eosinophilic areas with diminished chondrocyte density and structural disorganization. (C) focal areas of hypocellularity and some chondrocytes aggregation. (D) Good chondrocytes organization and morphology (oval and rounded cells organized in columns) without cluster presence and basophilic extracellular matrix.

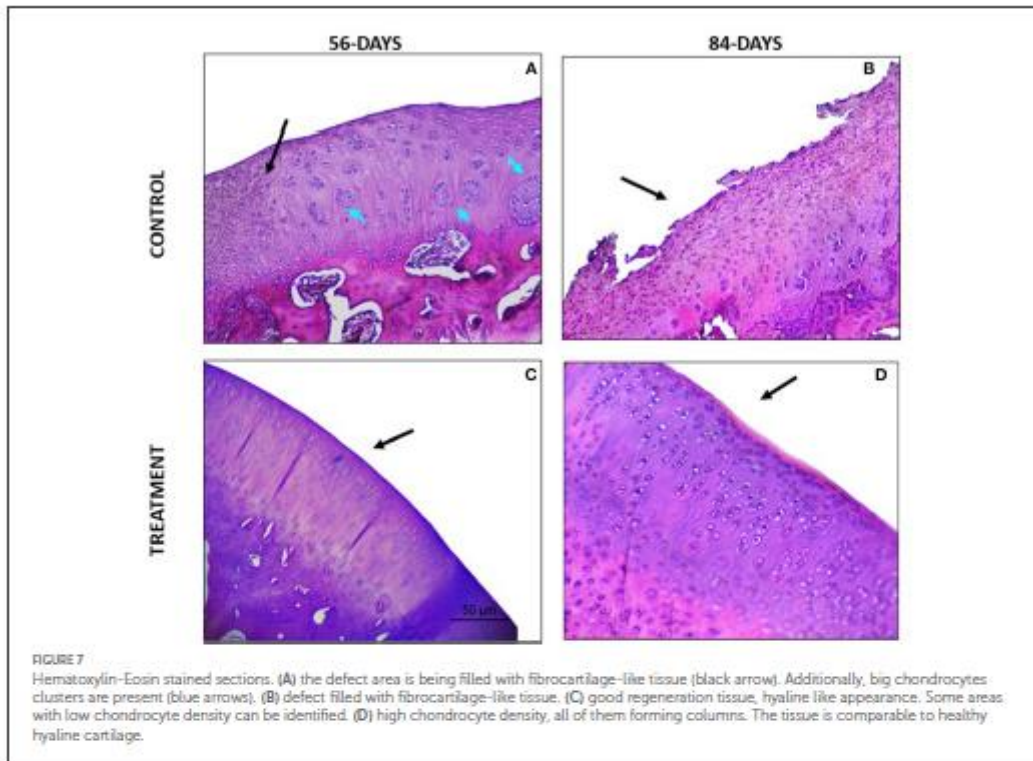
AC) (41). For all studied parameters included in the OARSI score, rabbits treated with the combination of IA and IO injections of PRGF showed significantly lower score than those treated with IA-only PRGF injection both at 56- and 84 days follow up.

On the other hand, the ICRS II Histology Scoring System is composed by 13 parameters that should be evaluated based on the visual analog scale and graded from 0 (extremely damaged AC, with fibrous tissue appearance) to 100 (normal hyaline cartilage) (40). In the present study higher scores were obtained for all parameters in rabbits treated with both, IA and IO PRGF at 56- and 84-days follow-up. However, for the criteria "vascularity" at 56- days follow up, the rabbits in TRT group showed significantly lower score, thus meaning greater presence of blood vessels, compared to CT group. These results agree with the ones previously published by our research team, in which a higher macroscopical presence of blood vessels was reported in the IO treated rabbits (38). This angiogenic activity showed in the TRT group is mainly modulated by the presence of pro-angiogenic platelet-derived vascular endothelial growth factor within the PRGF, and other mediators such as transforming growth factor- β and fibroblast growth factor-2, which produce new blood vessels by stimulating endothelial cells (52–54). The angiogenesis process contributes to the healing of musculoskeletal disorders in areas of poor vascularization, such as chondral defects, meniscal tears, tendon injuries and other areas with poor vascularity (55).

Moreover, in our study, the TRT group showed significant lower presence of inflammatory cells than the CT group at both

study points. This could be due to the anti-inflammatory nature of PRP. Several authors have demonstrated that platelets modulate inflammation, both *in vitro* and *in vivo* (56–58). Osterman et al. studied the effect of leukocyte-poor PRP and leukocyte-rich PRP *in vitro* and both preparations showed decreased expression of genes correlated with the inflammatory process in OA cartilage (56). In the same line, Lacko et al. investigated the effect of PRP injections in patients with knee OA and a significant decrease in pro-inflammatory makers was reported (57). Our results are also in concordance with the ones published by Muinos-Lopez et al. (59) that concluded that IO infiltration of PRP induced a greater reduction than IA infiltration in the population of monocytes and lymphocytes of the synovial fluid (59). Furthermore, Lychagin et al. assessed the inflammatory response of OA patients after IO infiltration of PRP by quantifying the serum oligomeric matrix protein. They concluded that, after IO infiltration, the biomarker level started to decrease (51).

Additionally, in our study, in the TRT group most of the surface of the repair tissue was integrated well with the surrounded healthy cartilage, while in the CT group, clefts in the superficial, transitional, and deep zones were reported. Furthermore, in some CT rabbits a complete loss of superficial, mid and deep zones of the AC were reported. In the TRT group, a normal hyaline cartilage morphology was achieved. Elongated cells were arranged parallel to the surface in the superficial zone, while in the mid/deep zone spherical cells were arranged forming columns. However, the repair tissue in the CT group was mainly fibrous and the presence



of chondrocytes clusters and hypocellularity of chondrocytes in the mid/deep zone was significantly higher than in the TRT group. In terms of SB repair, a continuous layer of trabecular bone was well formed below the cartilage in the TRT group. Contrarily, in the CT group the SB was not well regenerated and large areas of structural disorganization and fibrocartilage were present. The obtained histological results could explain the clinical and functional improvements reported by some authors after IO infiltration of PRP in osteoarthritic human patients (34–37, 48).

SB lies subjacent to the deeper layer of AC and provides nutritional and mechanical support for the hyaline cartilage, indicating that microenvironmental changes in SB can affect cartilage metabolism (60). Recently, several studies elucidating bone–cartilage crosstalk and SB metabolism have reported that OA is not a cartilage-only pathology, but a whole-joint disorder (30). In general terms, it is believed that abnormal mechanical loads lead to an increase in SB turnover, accelerating bone remodeling beneath the tidemark. Finally, aberrant mechanical support due to SB sclerosis induces AC destruction (61–63). In our study, IO PRGF enhances SB healing and prevented OA progression. The IO infiltration with PRGF might enhance the performance of the SB by inducing the influx of additional MSCs, that help to maintain tissue homeostasis, thus diminishing the activation of proinflammatory cytokines preventing further cartilage loss. Moreover, Ganguly et al. (33) have recently investigated the changes in SB MSCs before and

after combined IA and IO infiltrations of PRP in patients with hip OA. Their data showed that combined IO and IA infiltrations of this biological therapy, enhanced SB MSCs proliferative and stress-resistance capacities (33). This could be another reason why the IO infiltration of PRGF provides a greater regeneration of the SB and the AC in rabbits with full depth chondral defects.

Furthermore, the combination of IA and IO infiltration with PRGF seems to exhibit longer lasting effects than the IA infiltration alone. In the ORSI scale, significant better scores were achieved by the TRT group 84-days following infiltration compared to those obtained at 56-days follow-up for all studied parameters unless chondrocyte density. However, in the CT group, only the criterion articular cartilage surface showed a significant improvement at 84-days follow up. These results suggest that the IO PRGF still playing an important role in the regeneration process of full depth chondral defect 84-days after infiltration, however, the therapeutic potential of IA PRGF by this time seems limited.

Despite various studies have reported that IO infiltration of PRGF is a safe technique, this approach has some limitations. The procedure is invasive, and it should be performed in the surgery room, using fluoroscopy or ultrasounds. Sedation and general or local anesthesia are needed, which makes IO infiltration a more expensive technique than IA infiltration. To our knowledge, this research is the first one in this study

field in which histological AC changes have been assessed after IO infiltration of PRGF. Even if positive outcomes have been reported with this new approach, further clinical studies are required in companion animals to evaluate clinical and biomechanical improvements

5. Conclusions

The combination of IA and IO infiltration of PRGF provides a more comprehensive treatment of full depth chondral defects in severely affected patients. The treatment can reach all tissues implicated in OA pathogenesis, including the SB.

Better histological outcomes have been achieved in rabbits treated with the combination of IA and IO injections of PRGF than in the ones treated with IA-only PRGF injections. The benefits of IO infiltration of this therapy are durable and additionally, no clinical complications associated with the treatment have been reported. Although the results are positive, further studies in this field are necessary to assess the clinical and functional improvements that this new approach could contribute to veterinary practice.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by the Ethics Committee of Animal Welfare (CEEA) of the university CEU Cardenal Herrera of Valencia.

Author contributions

Conceptualization: JS and JC. Methodology and visualization: MR and JS. Software: MR. Validation: MR, JS, ED, and JC.

References

- Shimizu H, Shimoura K, Iijima H, Suzuki Y, Aoyama T. Functional manifestations of early knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol*. (2022) 41:2923. doi: 10.1007/s10067-022-06236-6
- Chen D, Shen J, Zhao W, Wang Y, Han L, Hamilton JL, et al. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res*. (2017) 5:16044. doi: 10.1038/boneres.2016.44
- Anderson KL, O'Neill DG, Brodbelt DC, Church DB, Meeson RL, Sargan D, et al. Prevalence, duration and risk factors for appendicular osteoarthritis in a UK dog population under primary veterinary care. *Sci Rep*. (2018) 4:8. doi: 10.1038/s41598-018-23940-z
- Marshall WC, Bockstahler BA, Hulse DA, Carmichael S. A review of osteoarthritis and obesity: current understanding of the relationship and benefit of obesity treatment and prevention in the dog. *Vet Comp Orthop Traumatol*. (2009) 22:339–45. doi: 10.3415/VCOOT-08-08-0069
- Hardie EM, Roe SC, Martin FR. Radiographic evidence of degenerative joint disease in geriatric cats: 100 cases (1994–1997). *J Am Vet Med Assoc*. (2002) 220:628–32. doi: 10.2460/javma.2002.220.628
- Lascelles BD, Henry I, John B, Brown J, Robertson I, Sumrell AT, et al. Cross-sectional study of the prevalence of radiographic degenerative joint disease in domesticated cats. *Vet Surg*. (2010) 39:535–44. doi: 10.1111/j.1532-950X.2010.00708.x
- Ireland JL, Clegg PD, McGowan CM, McKane SA, Chandler KJ, Pinchbeck GL. Disease prevalence in geriatric horses in the United Kingdom: veterinary clinical assessment of 200 cases. *Equine Vet J*. (2012) 44:101–6. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00361.x
- Ireland JL, Clegg PD, McGowan CM, Platt L, Pinchbeck GL. Factors associated with mortality of geriatric horses in the United Kingdom. *Prev Vet Med*. (2011) 101:204–18. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.06.002
- van Waeren PR, Back W. Musculoskeletal disease in aged horses and its management. *Vet Clin Equine Pract*. (2016) 32:229. doi: 10.1016/j.cveq.2016.04.003

Formal analysis and writing – original draft preparation: MT-T. Investigation: MT-T, LM-P, AR, ED, and PP. Resources and project administration: JS. Data curation: MT-T, PP, and JC. Writing – review and editing: MT-T and ED. Supervision: ED and MR. Funding acquisition: JC. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This research was funded by the García Cugat Foundation [CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery].

Acknowledgments

The authors would like to thank the García Cugat Foundation for their technical support, and all collaborators at the Veterinary Hospital of CEU Cardenal Herrera University for their assistance.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

10. Chen Y, Hsu Y, Tan KP, Fang H, Chang C. Intra-articular injection for rabbit knee osteoarthritis: effectiveness among hyaluronic acid, platelet-rich plasma, and mesenchymal stem cells. *J Taiwan Inst Chem Eng.* (2018) 91:138–45. doi: 10.1016/j.jtice.2018.05.051
11. Wei W, Dai H. Articular cartilage and osteochondral tissue engineering techniques: recent advances and challenges. *Bioactive Materials.* (2021) 6:4830–55. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.011
12. Kennedy MI, Whitney K, Evans T, LaPrade RF. Platelet-rich plasma and cartilage repair. *Curr Rev Musculoskelet Med.* (2018) 11:573–82. doi: 10.1007/s12178-018-9516-x
13. Vmod E, Amirham SM, Kachroo U, Goyal A, Ozbey O, James JV, et al. Articular chondroprogenitors in platelet rich plasma for treatment of osteoarthritis and osteochondral defects in a rabbit knee model. *Knee.* (2021) 30:51–62. doi: 10.1016/j.knee.2021.03.010
14. Ha C, Park Y, Jung JW, Kim M, Kim J, Park Y. Variability of the composition of growth factors and cytokines in platelet-rich plasma from the knee with osteoarthritis. *Arthritis Arthro Related Surg.* (2019) 35:2878. doi: 10.1016/j.arthro.2019.04.010
15. Garbin LC, Över CS. Platelet-rich products and their application to osteoarthritis. *J Equine Vet Sci.* (2020) 86:102820. doi: 10.1016/j.jevs.2019.102820
16. Ikumi A, Hara Y, Yoshioka T, Kanamori A, Yamazaki M. Effect of local administration of platelet-rich plasma (PRP) on peripheral nerve regeneration: an experimental study in the rabbit model. *Microsurgery.* (2018) 38:300–9. doi: 10.1002/micr.30263
17. Anttala E, Sanchez M, Orive G. The importance of understanding what is platelet-rich growth factor (PRGF) and what is not. *J Shoulder Elbow Surg.* (2011) 20:e23–4. doi: 10.1016/j.jse.2010.07.005
18. Anttala E, Sanchez M, Orive G, Andia I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* (2007) 28:4551–60. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.037
19. Vilar JM, Manera ME, Santana A, Spinella G, Rodriguez O, Rubio M, et al. Effect of leukocyte-reduced platelet-rich plasma on osteoarthritis caused by cranial cruciate ligament rupture: a canine gait analysis model. *PLoS ONE.* (2018) 13:3. doi: 10.1371/journal.pone.0194752
20. Vilar JM, Batista M, Morales M, Santana A, Cuervo B, Rubio M, et al. Assessment of the effect of intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Vet Res.* (2014) 10:143. doi: 10.1186/1746-6148-10-143
21. Pan J, Wang B, Li W, Zhou X, Scherr T, Yang Y, et al. Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints. *Bone.* (2012) 51:212–7. doi: 10.1016/j.bone.2011.11.030
22. Kwan Tat S, Lajeunesse D, Pelletier JB, Martel-Pelletier J. Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* (2010) 24:51–70. doi: 10.1016/j.berh.2009.08.004
23. Bian W, Lian Q, Li D, Wang J, Zhang W, Jin Z, et al. Morphological characteristics of cartilage-bone transitional structures in the human knee joint and CAD design of an osteochondral scaffold. *Biomed Eng Online.* (2016) 15:82. doi: 10.1186/s12938-016-0200-3
24. Zhu X, Chan YT, Yung PSH, Tuan RS, Jung Y. Subchondral bone remodeling: a therapeutic target for osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol.* (2021) 8:607764. doi: 10.3389/fcell.2020.607764
25. Madry H, Orth P, Cucchiarni M. Role of the Subchondral Bone in Articular Cartilage Degeneration and Repair. *J Am Acad Orthop Surg.* (2016) 24:45. doi: 10.5435/JAAOS-D-16-00096
26. Coaccioli S, Sarzi-Puttini F, Zis P, Rinonapoli G, Varrassi G. Osteoarthritis: new insight on its pathophysiology. *J Clin Med.* (2022) 11:6013. doi: 10.3390/jcm11206013
27. Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, van de Palle L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis.* (2006) 65:1261–4. doi: 10.1136/ard.2006.058347
28. Lana AR, Diaz HI, Martinez MV, Prado R, Padilla S, Anttala E. Office-based intraosseous infiltrations of PRGF in knee osteoarthritis: description of technique. *Arthr Tech.* (2022) 11:E917–21. doi: 10.1016/j.ats.2022.01.009
29. Surti S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone.* (2012) 51:204–11. doi: 10.1016/j.bone.2011.10.010
30. Hu Y, Chen X, Wang S, Jing Y, Su J. Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. *Bone Res.* (2021) 9:20. doi: 10.1038/s41413-021-00147-z
31. Donell S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *Efori Open Rev.* (2019) 4:221–9. doi: 10.1302/2058-5241.4.180102
32. Ilas DC, Churchman SM, McGonagle D, Jones E. Targeting subchondral bone mesenchymal stem cell activities for intrinsic joint repair in osteoarthritis. *Future Sci.* (2017) 3:FSO228. doi: 10.4155/fsoa-2017-0055
33. Ganguly P, Fitz N, Betts M, Owston HE, Delgado D, Jones E, et al. Effect of combined intraosseous and intra-articular infiltrations of autologous platelet-rich plasma on subchondral bone marrow mesenchymal stromal cells from patients with hip osteoarthritis. *J Cite Med.* (2022) 11:3891. doi: 10.3390/jcm11133891
34. Sanchez M, Fitz N, Guadilla J, Padilla S, Anttala E, Sanchez P, et al. Intraosseous infiltration of platelet-rich plasma for severe knee osteoarthritis. *Arthr Tech.* (2014) 3:713. doi: 10.1016/j.ats.2014.09.006
35. Fitz N, Perez JC, Guadilla J, Garate A, Sanchez P, Padilla S, et al. Intraosseous infiltration of platelet-rich plasma for severe hip osteoarthritis. *Arthr Tech.* (2017) 6:821–5. doi: 10.1016/j.ats.2017.02.014
36. Sanchez M, Delgado D, Sanchez P, Muñoz-Lopez E, Patva B, Granero-Mollo E, et al. Combination of intra-articular and intraosseous injections of platelet rich plasma for severe knee osteoarthritis: a pilot study. *Biomed Res Int.* (2016) 2016:4868613. doi: 10.1155/2016/4868613
37. Su K, Bai YM, Wang J, Zhang HS, Liu H, Ma SY. Comparison of hyaluronic acid and PRP intra-articular injection with combined intra-articular and intraosseous PRP injections to treat patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol.* (2018) 37:1341–50. doi: 10.1007/s10067-018-3985-6
38. Torres-Torrillas M, Damà E, Peláez P, Miguel-Pastor L, Cuervo B, Cerón JJ, et al. Intra-osseous infiltration of adipose mesenchymal stromal cells and plasma rich in growth factors to treat acute full depth cartilage defects in a rabbit model: serum osteoarthritis biomarkers and macroscopical assessment. *Front Vet Sci.* (2022) 9:1057079. doi: 10.3389/fvets.2022.1057079
39. Torres-Torrillas M, Damà E, Cerón JJ, Carrillo JM, Peláez P, Miguel L, et al. Treating full depth cartilage defects with intraosseous infiltration of plasma rich in growth factors: an experimental study in rabbits. *Cartilage.* (2021) 13:19476035211057246. doi: 10.1177/19476035211057246
40. Maimil-Variet F, Van Damme B, Nestic D, Knutsen G, Kandel R, Roberts S, et al. New histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair. *ICRS II. Am J Sports Med.* (2010) 38:880–90. doi: 10.1177/0363546509359068
41. Laverly S, Girard CA, Williams JM, Hunziker EB, Pritzker KP. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage.* (2010) 18:S53–65. doi: 10.1016/j.joca.2010.05.029
42. Zhai C, Fet H, Hu J, Cai W, Li Z, Fan W, et al. Intra-articular injection autologous platelet-rich plasma and bone marrow concentrate in a goat osteoarthritis model. *J Orthop Res.* (2018) 36:2140–6. doi: 10.1002/jor.23877
43. Carr BJ. Platelet-rich plasma as an orthobiologic clinically relevant considerations. *Vet Clin Small Anim Pract.* (2022) 52:977–95. doi: 10.1016/j.cvsm.2022.02.005
44. Alves JC, Santos A, Jorge P. Platelet-rich plasma therapy in dogs with bilateral hip osteoarthritis. *BMC Vet Res.* (2021) 5:17. doi: 10.1186/s12917-021-02913-x
45. Okamoto-Okubo C, Cassa RN, Fernandes Joaquim JG, dos Reis Mesquita L, Bahal SC, Oliveira HSS, et al. Chronic pain and gait analysis in dogs with degenerative hip joint disease treated with repeated intra-articular injections of platelet-rich plasma or allogeneic adipose-derived stem cells. *J Vet Med Sci.* (2021) 83:881–8. doi: 10.1292/jvms.20-0730
46. Cuervo B, Rubio M, Chicharro D, Damà E, Santana A, Carrillo JM, et al. Objective comparison between platelet rich plasma alone and in combination with physical therapy in dogs with osteoarthritis caused by hip dysplasia. *Animals.* (2020) 1:175. doi: 10.3390/ani10020175
47. Catarino J, Carvalho P, Santos S, Martins A, Requiça J. Treatment of canine osteoarthritis with allogeneic platelet-rich plasma: review of five cases. *Open Vet J.* (2020) 10:226–31. doi: 10.4314/ovj.v10i2.12
48. Sanchez M, Delgado D, Pompei O, Carlos Perez J, Sanchez P, Garate A, et al. Treating severe knee osteoarthritis with combination of intra-osseous and intra-articular infiltrations of platelet-rich plasma: an observational study. *Cartilage.* (2019) 10:245–53. doi: 10.1177/1947603518756462
49. Malanin DA, Sitilinda VD, Gorbatenko AI, Demeshchenko MV, Suchilin IA, Kondrashenko VV, et al. Intraosseous injection of autologous bone marrow aspirate concentrate and platelet-rich plasma for treatment of knee osteoarthritis. *Traumatol Ortho Russi.* (2021) 27:69–81. doi: 10.21823/2311-2905-1669
50. Delgado D, Garate A, Vincent H, Hübner AM, Patel R, Fitz N, et al. Current concepts in intraosseous Platelet-Rich Plasma injections for knee osteoarthritis. *J Clin Orthop Trauma.* (2019) 10:36–41. doi: 10.1016/j.jcot.2018.09.017
51. Lychagin A, Lipina M, Garkavi A, Isaksh O, Timashev P, Ashmore K, et al. Intraosseous injections of platelet rich plasma for knee bone marrow lesions treatment: one year follow-up. *Int Orthop.* (2021) 45:355–63. doi: 10.1007/s00264-020-04546-5
52. Hara GR, Basu Y. Platelet-rich plasma in regenerative medicine. *Biomed Res Ther.* (2014) 1:25–31. doi: 10.7603/40730-014-0005-6
53. Deppermann C, Kubus P. Start a fire, kill the bug: The role of platelets in inflammation and infection. *Isaacs Immun.* (2018) 24:335–48. doi: 10.1177/1753425918789255
54. Everts P, Ontshik K, Jayaram P, Lana JE, Mautner K. Platelet-rich plasma: new performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *Int J Mol Sci.* (2020) 21:7794. doi: 10.3390/jms21207794
55. Lamsdown DA, Fortier LA. Platelet-rich plasma: formulations, preparations, constituents, and their effects. *Oper Tech Sports Med.* (2017) 25:7–12. doi: 10.1053/j.otsm.2016.12.002

56. Osterman C, McCarthy MB, Cote MP, Bettel K, Bradley J, Polkowski G, et al. Platelet-rich plasma increases anti-inflammatory markers in a human coculture model for osteoarthritis. *Am J Sports Med.* (2015) 43:1474–84. doi: 10.1177/0363546515570463
57. Lacko M, Harvanova D, Slovinska I, Matuska M, Balog M, Lackova A, et al. Effect of intra-articular injection of platelet-rich plasma on the serum levels of osteoarthritic biomarkers in patients with unilateral knee osteoarthritis. *J Clin Med.* (2021) 10:5801. doi: 10.3390/jcm10245801
58. Trams E, Malesa K, Pomianowski S, Kaminski R. Role of platelets in osteoarthritis—updated systematic review and meta-analysis on the role of platelet-rich plasma in osteoarthritis. *Cells.* (2022) 11:1080. doi: 10.3390/cells11071080
59. Munos-Lopez E, Delgado D, Sanchez P, Patra B, Anttala E, Fitz N, et al. Modulation of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells by intra-articular and intrasosseous platelet rich plasma administration. *Stem Cells Int.* (2016) 2016:1247950. doi: 10.1155/2016/1247950
60. Aaron HK, Racine JR, Voisinet A, Evangelista P, Dyke JP. Subchondral bone circulation in osteoarthritis of the human knee. *Osteoarthritis Cartil.* (2018) 26:940–4. doi: 10.1016/j.joca.2018.04.003
61. Holzer LA, Kraiger M, Talacic E, Fritz GA, Avian A, Hofmeister A, et al. Microstructural analysis of subchondral bone in knee osteoarthritis. *Osteoporosis Int.* (2020) 31:2037–45. doi: 10.1007/s00198-020-05461-6
62. Pouran B, Arhavi V, Bileys RLAW, van Weeren FR, Zadpoor AA, Wetmans H. Solute transport at the interface of cartilage and subchondral bone plate: effect of micro-architecture. *J Biomech.* (2017) 52:148–54. doi: 10.1016/j.jbiomech.2016.12.025
63. Gatenholm B, Lindahl C, Brittberg M, Stadelmann VA. Spatially matching morphometric assessment of cartilage and subchondral bone in osteoarthritic human knee joint with micro-computed tomography. *Bone.* (2019) 120:393–402. doi: 10.1016/j.bone.2018.12.003

Anexo 4







International Journal of
Molecular Sciences



Review

Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Promising Tool in the Treatment of Musculoskeletal Diseases

Marta Torres-Torrillas ¹, Monica Rubio ^{1,2,*} , Elena Damia ¹, Belen Cuervo ¹ ,
Ayla del Romero ¹, Pau Peláez ¹, Deborah Chicharro ¹ , Laura Miguel ¹
and Joaquin J. Sopena ^{1,2} 

¹ Bioregenerative Medicine and Applied Surgery Research Group, Department of Animal Medicine and Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, C/ Tirant lo Blanc, 7, Alfara del Patriarca, 46115 Valencia, Spain; marta.torrestorrillas@uchceu.es (M.T.-T.); elena.damia@uchceu.es (E.D.); belen.cuervo@uchceu.es (B.C.); ayla.delromero@uchceu.es (A.d.R.); pau.pelaez@uchceu.es (P.P.); debora.chicharro@uchceu.es (D.C.); laura.miguel@uchceu.es (L.M.); jsopena@uchceu.es (J.J.S.)

² Garcia Cugat Foundation CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, C/ Tirant lo Blanc, 7, Alfara del Patriarca, 46115 Valencia, Spain

* Correspondence: mrubio@uchceu.es; Tel.: +34-96-136-9000 (ext. 66015)

Received: 30 May 2019; Accepted: 21 June 2019; Published: 25 June 2019



Abstract: Chronic musculoskeletal (MSK) pain is one of the most common medical complaints worldwide and musculoskeletal injuries have an enormous social and economical impact. Current pharmacological and surgical treatments aim to relief pain and restore function; however, unsatisfactory outcomes are commonly reported. In order to find an accurate treatment to such pathologies, over the last years, there has been a significantly increasing interest in cellular therapies, such as adipose-derived mesenchymal stem cells (AMSCs). These cells represent a relatively new strategy in regenerative medicine, with many potential applications, especially regarding MSK disorders, and preclinical and clinical studies have demonstrated their efficacy in muscle, tendon, bone and cartilage regeneration. Nevertheless, several worries about their safety and side effects at long-term remain unsolved. This article aims to review the current state of AMSCs therapy in the treatment of several MSK diseases and their clinical applications in veterinary and human medicine.

Keywords: adipose-derived mesenchymal stem cells; musculoskeletal diseases; regenerative medicine

1. Introduction

Given the increase in life expectancy, and the global trend to obesity, degenerative changes, including loss of bone density, ligament and tendon flexibility, and osteoarthritic changes, together with traumatic injuries, are becoming an enormous medical and socio-economical burden. These musculoskeletal (MSK) disorders cause both pain and functional defects [1–3]. The Bone and Joint Decade initiative, led by the United Nations and the World Health Organization, reported that chronic MSK pain is the most common medical complaint in the United States [3].

Due to the tremendous impact of MSK injuries, efforts are being made in order to find appropriate cell-based and tissue engineering therapies for bones, tendons, joints, and skeletal muscle disorders [1]. Of particular interest are mesenchymal stem cells (MSCs).

At this time, two different descriptions of MSCs are found in the literature. Initially, MSCs were described as stem cells only located in the bone marrow with the capacity to regenerate bone and to create the niche for hematopoietic stem cells, now commonly known as bone-marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) [4]. The other view sees MSCs as ubiquitous multipotent adult stem cells, which

can be isolated from many tissues including adipose tissue, muscles, tendons, synovial capsule, dental pulp, skin, lungs, placenta, and umbilical chord [5,6]. MSCs exhibit great differentiation potential into many different types of tissues, including bone, cartilage, muscle, and tendons [7–9]; however, stem cells obtained from different tissues can show diverse differentiation capacities, and thus, the term MSCs could be confusing [10].

Three mechanisms for MSCs-based therapy have been proposed: firstly, MSCs can differentiate into the targeted cell type and contribute to repair the damaged area; secondly, they have a paracrine effect, being capable of secret various cytokines and growth factors (GF) to adjacent cells, which leads to vascularization and cellular proliferation in wounded tissues; and thirdly, MSCs have immunomodulatory properties, so they can reduce inflammation in injured tissues [11–15]. In addition, there is no ethical issue for the use of MSCs [16].

MSCs most commonly used are BM-MSCs and adipose-derived mesenchymal stem cells (AMSCs). They share similar properties, but AMSCs offer some advantages compared to BM-MSCs. AMSCs are more accessible and easier to collect from subcutaneous tissue, they can be collected in large quantities, with less morbidity of the patients, via lipoaspirates or adipose tissue biopsy, they are easily isolated, and can simply be expanded in vitro [17–20]. Moreover, AMSCs have been shown to be immunoprivileged, with low risk of rejection, and more genetically stable in long term culture, with a greater proliferative rate than BM-MSCs [21–24].

Subcutaneous fat tissue is the most accessible source to obtain AMSCs, but in the last years, Tangchitphisut et al., Muñoz-Criado et al., and Spasovski et al. have demonstrated that supra- and infra-patellar fat pads are suitable sources to obtain AMSCs [25–27].

After an enzymatic digestion, adipose tissue yields a heterogeneous population of many cell types, which upon isolation are termed the stromal vascular fraction (SVF) [21]. The SVF contain a mixture of regenerative cell types and various immune cells, including preadipocytes, fibroblasts, vascular smooth muscle cells, endothelial cells, resident monocyte, and lymphocytes, but mature adipocytes are absent [28–30]. The SVF includes AMSCs, which account for 30% of the total SVF cells [21]. Some studies have shown improved results with the application of SVF compared to AMSCs, promoting cartilage and subchondral bone regeneration [31], forming new cartilage matrix [32], and enhancing the proliferation of myoblasts [30]. In contrast, SVF inhibits the differentiation of myoblasts [30].

AMSCs were first identified in the early 2000s [33]. They are adult stem cells that originate in mesodermal embryonic layer, and they are characterized by their adherence to plastic in culture, their immunophenotype in undifferentiated state, and their self-renewal and multipotency properties [34]. Due to these last two characteristics, AMSCs are able to proliferate to maintain stem cells reservoir in the undifferentiated state during life [35–38], and give rise to different types of mesenchymal cell lineages (adipocytes, fibrocytes, osteocytes, and chondrocytes) [36,38–42], as well as non-mesenchymal cell lineages (skeletal, smooth and cardiac myocytes, hepatocytes, and neuronal) [39,43–47].

In addition, AMSCs induce a trophic effect through the secretion of a large number of GF and anti-inflammatory proteins in response to inflammatory molecules, including prostaglandin 2, hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), nitrous oxide, IL (interleukin)-4, IL-6, IL-10, and IL-1 receptor antagonist, that support the angiogenesis, tissue remodeling, and antiapoptotic events [48–50]. Moreover, AMSCs prevent proliferation and function of many inflammatory immune cells, such as natural killer cells, B cells, T cells, monocytes, macrophages, and dendritic cells [51].

Regenerative medicine (RM) is gaining interest among orthopedics clinicians and surgeons due to the showed therapeutic abilities, the increasing prevalence of MSK diseases, and the lack of conventional treatments with good long-term outcomes. During the last years, the clinical potential of AMSCs in the treatment of many MSK diseases has been demonstrated in several studies. Consequently, the aim of the present study is to review the application of AMSCs in the treatment of different MSK pathologies.

With this purpose, MSK diseases will be classified in four groups: (i) muscle, (ii) tendon and ligament, (iii) bone, and (iv) cartilage.

2. AMSCs in the Treatment of Muscular Disorders

Although muscle has some inherent regeneration capacity to repair damage resulting from physical or chemical trauma to muscle tissue, complete functional recovery of skeletal muscle after severe injury remains a challenge [52,53]. The return of muscular function is comprised by the incomplete recovery from muscle atrophy and fibrosis, which affects muscle fiber number, muscle cross-sectional area, and thus, muscle force [53]. Because of the lack of therapeutic options that decrease fibrosis and delay muscle atrophy, significant efforts are being made to improve the current treatment of skeletal muscle injury using a RM approach. Even so, there is a scarcity of literature regarding the use of AMSCs in skeletal muscle's injuries.

Previous works detailing the myogenic potential of AMSCs have been performed with mouse and human AMSCs [54]. Zuk et al. were the first to describe *in vitro* muscle differentiation in AMSCs isolates from humans [55]. While some *in vitro* works have shown direct formation of myotubes from AMSCs cultures [55–57], most investigations have shown that *in vitro* myogenic differentiation of AMSCs requires co-culture with myoblasts or satellite cells [52,54,58–63]. Even though the *in vitro* differentiation potential of AMSCs into myocytes has been demonstrated, there is little evidence about AMSCs transplantation after skeletal muscle injury. Bacou et al. were the first to test the potential of AMSCs in a nonphysiological cardiotoxin induced muscle damage model in rabbits. Fifteen days after the transplantation, the cells expressed skeletal muscle markers, suggesting myogenic differentiation. In addition, two months after the treatment, muscles were heavier, showed a significantly larger fiber section area, and developed a significantly higher maximal force compared with damaged control muscles [43].

More recent studies, suggested that AMSCs promote the proliferation of myoblasts, which could explain the regenerative capacity shown *in vivo* [30,63–66]. Based in these results, during the last years, some animal models have shown the influence of AMSCs in the treatment of some miopathies [67–70] and muscular dystrophy [63,65,66]. Even so, there is a shortage of literature regarding the application of AMSCs in muscular injuries.

Muscular tears or lacerations are common lesions within athletes. Conventional therapies include medical management with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), antioxidant therapy, and steroids; or surgical management such as myotectomy or myectomy [67,69]. These therapies are unsuccessful and generally do not prevent the formation of fibrous tissue as well as do not promote muscle regeneration, leading to a limited function of the limb [67,68]. Therefore, regenerative therapies are gaining interest, particularly AMSCs, and some animal studies have been carried out in order to assess the *in vivo* efficacy of AMSCs in muscular tears. Peçanha et al. investigated how AMSCs contribute to skeletal muscle healing after a surgically performed laceration in the rat model. They conclude that AMSCs may accelerate the process of muscle repair, since the number of regenerating muscle fibers and muscle developed force significantly increased in the treated group [69]. Recently, Gorecka et al. have demonstrated that AMSCs transplantation into acute damaged skeletal muscle in a mice model, significantly improves functional muscle tissue regeneration without direct participation in muscle fiber formation [70].

Based in these results, Brown et al. and Gibson et al. carried out clinical studies in which they applied AMSCs in dogs suffering from semitendinosus tears, a pathology with a high incidence in working dogs. The dogs were clinically and ultrasonographic evaluated before and after the local injection of AMSCs. After the AMSCs treatment, all cases in the studies showed improvement in gait analysis and mobility range in short- and long-term follow up. Furthermore, sonographic examination revealed significant reduction in lesion size, and an increase of organized and orientated fibers [67,68] (Table 1). Despite these favorable results, further *in vivo* studies and controlled clinical trials are

necessary for the complete evaluation of the therapeutic benefits of AMSCs therapy in muscular tears or lacerations.

Table 1. Clinical application of AMSCs in muscular injuries

Authors	Patients	Injury	Treatment	AMSCs Origin	Outcomes
Brown et al., 2012 [68]	Dogs	Semitendinosus tear	Locally injected AMSCs	Autologous adipose fat	Reduction in lesion size with well organized fibers. No gait abnormalities.
Gibson et al., 2017 [67]	Dogs	Semitendinosus tear	Locally injected AMSCs	Autologous adipose fat	Reduction in lesion size and VAS. All dogs returned to normal activity within 3 months.

AMSCs: Adipose-derived Mesenchymal stem cells, VAS: Visual Analogue Scale.

RM is also gaining interest in the field of muscular dystrophies. Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common and most severe form of muscular dystrophy. It is an X-linked genetic disorder caused by mutations in the dystrophin gene, which cause dystrophin deficiency. The loss of dystrophin leads to a breakdown of the structural integrity of myofibers, resulting in progressive myofibers necrosis, fibroblast proliferation, and growth of fibrous tissue and fat [71]. DMD is a progressive and lethal degenerating disease that affects both skeletal and cardiac muscle. Thus far, there is no effective treatment for DMD; however, several studies on cell therapy, including the application of MSCs have become a promising treatment to restore dystrophin in DMD patients. The use of AMSCs has also been proposed, but this therapy is still in preliminary testing and more experiments are required [53,63,65,66]. Animal models have become increasingly important for testing these regenerative therapies. Mdx mouse is the most widely used animal model for DMD, presenting the same molecular and protein defect as seen in humans with the disease [72].

Pinheiro et al. investigated the effects of AMSCs transplantation on degeneration, regeneration, and skeletal muscle function in Mdx mice. It was firstly observed that AMSCs treatment increases the content of VEGF and anti-inflammatory cytokines in dystrophin-deficient skeletal muscle, which promotes angiogenesis and reduces the inflammation, respectively. Moreover, a decrease in the content of TNF- α and Interleukin 6 (IL-6) were also reported in the AMSCs treated group, suggesting a protective action of the AMSCs on inflammation-induced injury. The AMSCs treated group showed improved muscle strength and resistance to acute muscle fatigue, after one injection of AMSCs per week during four weeks. In addition, a histological analysis was performed and an increase in fiber cross-sectional area and an augment of myogenin content was observed in AMSCs treated group [65]. Similar results were obtained by Lee et al., who demonstrated that AMSCs up-regulated myogenin, mTOR and raptor proteins, which contribute to the formation of myofibers. Thus, leads to an increase in muscle size when compared to control group [66]. These results support the proposition that AMSCs transplantation is a promising treatment for muscular dystrophies. Nevertheless, there is no clinical trials supporting these results; hence, further investigation is needed to determine the long-term effects of AMSCs in dystrophin-deficient muscles, and to find an accurate therapy for this pathology.

3. AMSCs in the Treatment of Tendon Injuries

The high incidence of tendon injuries is mainly associated with sport practice and aging, and they range from acute traumatic ruptures to chronic tendinopathy [73,74]. Tendon injuries represent a clinical challenge because their natural repair process is slow, complex, and inefficient, as well as a financial challenge. Tendon has limited inherent healing capacity, as it is a slightly cellular and poorly vascularized tissue, and often responds inadequately to treatments; hence, prolonged recovery times are needed [73–75]. After injuries, the structural composition and organization of tendons, which are responsible of the specific mechanical tendon properties, are not completely restored. Following the repair process, a fibrous scar is formed, causing significant dysfunction and joint movement inability, leading to a biomechanically weakened tendon, making it more vulnerable to re-rupture [74,76]. Tendinopathies and tendon tears have been treated with conservative approaches for managing

symptoms, including rest, anti-inflammatory drugs, corticosteroids, and physiotherapy. On the other hand, the gold standard to treat tendon rupture is surgical suture, combined or not with allo- or auto-grafts [73,77]. Despite the improvements made in surgical techniques, none of the therapeutic options have provided successful long-term solutions [74,75]. New treatments are needed with the objective of improving tendon regeneration, and AMSCs have been adopted to repair tendon and ligament tears. It has been demonstrated that AMSCs can differentiate *in vitro* towards tenocytes. It is widely known that the control of stem cell activity is influenced by several environmental factors, including GF such as insulin like growth factor (IGF), TGF- β and growth differentiation factor 5 (GDF-5), which have been successfully used in a co-culture with primary tenocytes, to promote AMSCs differentiation towards tenocytes *in vitro* [74,78,79].

During the last decade, some experimental studies have shown the efficiency of AMSCs in animal models of tendon injury. A study carried out by Uysal and Mizuno in mice showed that local administration of AMSCs accelerates tendon repair, as exhibited by an increase in tensile strength, direct differentiation of AMSCs into tenocytes, and increases in angiogenic GFs [80]. Similar results were obtained by the same research group in a rabbit calcaneal tendon injury model, which showed that the application of AMSCs associated with platelet rich plasma (PRP) increases the resistance of tendons as well as the amount of collagen type I, VEGF, and FGF [81]. Vieira et al. were the first investigation team that treated ruptured Achilles tendon of rabbits with AMSCs alone, with no surgical suture. The histological analysis showed a significant increase in capillaries and in the structural organization of collagen in the AMSCs treated group, compared with the surgically sutured group [82]. A rat supraspinatus tendon injury model was conducted by Valencia et al. Histological examination showed less acute inflammation in AMSCs treated group, but controversially, there were no differences in the orientation of collagen fibers between groups. In addition, and contrary to previous studies, none biomechanical differences between the AMSCs treated group and the untreated group were reported [83].

More recent animal models showed comparable results. Oshita et al. conducted a collagenase induced tendinopathy in a rat model and the findings demonstrated that the application of AMSCs results in significant improvement in the pathological findings associated with tendinopathy [84]. Results reported from a rat tendon injury model demonstrated that tendons treated with AMSCs showed better gross morphological and biomechanical recovery than those in fibrin and control group [85]. Aparecida de Aro et al. demonstrated that AMSCs combined with GDF-5 increases the organization of collagen fibers in the injury adjacent region, which was reflected in biomechanical properties, in a transected Achilles tendon model in mice. Compared with untreated tendons, tendons treated with AMSCs were more resistant to traction, with lower deformation at higher stress [74]. Similar results were obtained in a rotator cuff tear model in rabbits [86]. The results demonstrated that the maximum load, the maximum strength, and stiffness were significantly increased in the group treated with adipose SVF, compared with those of the control group. Furthermore, the results showed that adipose SVF accelerate the transformation of collagen fibers type III into type I [86].

AMSCs are also gaining interest among veterinarians. Race horses often suffer from superficial flexor digitorum longus tendon (SFDLT) lesions. There is clinical evidence that the injection of AMSCs after SFDLT spontaneous lesion significantly improves healing [87]. AMSCs were administered under ultrasonographic guidance in four horses suffering from SFDLT lesions. Treated horses showed shorter periods of lameness and better organization of collagen fibers assessed by ultrasound examination [87]. These results concur with those obtained by Carvalho et al., in a horse's collagenase-induced SFDLT lesion controlled trial [88]. The histological evaluation demonstrated that AMSCs combined with a platelet concentrate therapy resulted in a better organization of collagen fibers and a decrease of the inflammatory infiltrate. In addition, the ultrasound evaluation showed a lack of lesion progression in the treated group [88] (Table 2).

Table 2. Clinical application of AMSCs in tendon injuries.

Authors	Patients	Injury	Treatment	AMSCs Origin	Outcomes
Lee et al., 2015 [77]	Human	Lateral epicondylitis	Locally injected AMSCs + fibrin glue	Allogenic subcutaneous fat	VAS score improvement. Tendon's defect size decreased. Improvements in gait and lameness assessment.
Skutella, 2016 [87]	Race horses	SFDLT tear	Local injection of AMSCs	Autologous subcutaneous fat	Sonographic improvement of the defect size and organization of collagen bundles
Kim et al., 2017 [89]	Human	Rotator cuff tear	Arthroscopy + local AMSCs + fibrin glue	Autologous buttock fat pad	Lower retear rate with almost complete healing of the defect by 12 months follow-up
Usuelli et al., 2018 [90]	Human	Non-insertional Achilles tendinopathy	Intratendinous adipose-derived SVF	Autologous abdominal subcutaneous fat	Pain relief and function restoration during at least 6 months

AMSCs: Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells, SFDLT: Superficial flexor digitorum longus tendon, SVF: Stromal Vascular Fraction, VAS: Visual Analogue Scale.

Even though experimental animal models and clinical trials have shown benefits of AMSCs therapy in tendon injuries at biomechanical, histological, and molecular levels, the clinical use of AMSCs in the treatment of tendinopathy has not been well-studied.

The first case report using AMSCs to treat chronic tendinopathy was conducted by Lee et al. Twelve patients with lateral epicondylitis, a degenerative condition in the wrist extensor tendons, were administered with AMSCs under ultrasound guidance, and clinical and ultrasound evaluation were performed at 6, 12, 26, and 52 weeks after treatment. Results demonstrated that AMSCs therapy was effective in improving elbow pain (evaluated by visual analogue scale (VAS) score), performance (evaluated by modified Mayo clinic performance index), and structural defects (evaluated with ultrasound images of tendon defect area) [77].

Kim et al. studied the effectiveness of an injection of AMSCs loaded in fibrin glue during arthroscopic rotator cuff repair. 70 patients were divided into two groups; one group was only treated with the arthroscopy, and the other group was treated with the arthroscopy combined with single injection of AMSCs. Clinical (VAS score and range of movement (ROM)) and magnetic resonance imaging (MRI) outcomes were assessed. MRI results at a minimum of 12 months after surgery revealed that the rotator cuff tendon was completely healed in 71% of patients in the conventional group, and in 83% of patients in the AMSCs group. In addition, the retear rate was significantly lower in AMSCs group (14.3%), compared with conventional group (28.6%). On the contrary, no differences between groups were observed in VAS scale and ROM [89].

The efficacy of SVF injection in the treatment of Achilles tendinopathy has also been studied by Usuelli et al. [90]. The clinical controlled trial aimed to compare the effectiveness of the injection of PRP, with the injection of adipose-derived SVF for the treatment of chronic Achilles tendinopathy. Fifty-six patients affected by non-insertional Achilles tendinopathy were randomly divided into PRP or SVF treatment group. Either PRP or SVF was locally injected and a clinical exam was carried out at 15, 30, 60, 120, and 180 days after treatment. Moreover, ultrasound and MRI examination were conducted 4 and 6 months after treatment. Results showed that both, PRP and SVF provide a significant clinical improvement in terms of pain relief and function restoration. Interestingly, a faster recovery was reported in the SVF group. Despite the positive clinical outcome, none treatment group showed ultrasound or MRI improvements [90].

Considering the above-mentioned points, one can conclude that AMSCs transplantation is a good alternative for the treatment of tendinopathies and tendon ruptures, but further clinical trials and case reports are needed.

4. Application of AMSCs in the Treatment of Osseous Diseases

AMSCs can differentiate into different cell types, including osteocytes, and the lineage-specific differentiation is associated with the expression of explicit phenotypic markers and mature tissue genes. In vitro, osteogenic differentiation of AMSCs can be obtained using medium supplemented

with ascorbic acid, b-glyc-erophosphate, dexamethasone, 1.25 vitamin D₃ or bone morphogenic protein 2 [91–95]. Osteogenic induction was thought to be a necessary step for AMSCs to have osteogenic ability, but it has been demonstrated that AMSCs undergoing, or not, osteogenic induction are able to adhere to scaffolds, migrate, proliferate, and differentiate when transplanted in bone tissue *in vivo* [96,97].

Bone fractures, segmental bone defects and critical size defects (CSDs) are important causes of patient morbidity and place an incredible economic burden on the healthcare system. They are usually secondary to trauma, post-resection of tumors, or post-debridement of infection [17]. Around 5 billion dollars are annually spend in treating bone defects in the US, mainly on bone grafts and implants for bone injuries and other pathologies associated with defective fracture healing, such as non-union [98]. Conventional treatments, including autologous bone grafts, and distraction osteogenesis (DO) have some limitations, such as long immobilization periods, donor site morbidity, muscular atrophy and surgical complications such as infection, pain, or hemorrhage [17,99,100]. Tissue engineering and cell-based therapies have been adopted as alternatives therapies to promote bone repair, and AMSCs have been proposed to treat CSDs [100–106] and delayed fracture healing and the resulting segmental bone defects [99,107–110]. Furthermore, the implication of AMSCs in DO in animal models has been investigated [111,112].

Levi et al. introduced PLGA scaffolds alone or PLGA scaffolds with AMSCs in critical size calvarial defects in mice, and near complete healing was observed among AMSCs engrafted calvarial defects in comparison to control group, that showed little healing [102]. Liu et al. [100], who previously demonstrated that autologous AMSCs loaded onto natural coral scaffolds could repair cranial CSDs in a canine model [106], were the first to show that allogenic AMSCs combined with coral scaffolds are suitable to regenerate the same kind of defects without using immunosuppressive therapy [100]. Critical tibial defects treated with hydroxyapatite scaffolds combined with AMSCs showed an improved healing process when compared to that occurred when only the scaffold was used [105]. Moreover, the defects treated with AMSCs showed greater mechanical properties, suggesting an enhanced ability to bear mechanical loading [105]. Du et al. combined the osteogenesis and angiogenesis advantages of AMSCs with modified mesoporous bioactive glass scaffolds to optimize the restoration of CSDs, and the results demonstrated that the combination of different induction of AMSCs into osteogenic cells and endothelial cells is practical and beneficial for CSDs [104]. To our knowledge, there is only a case report regarding the use of AMSCs in the treatment of CSDs. Lendeckel et al. described the use of AMSCs combined with bone graft and fibrin glue to treat cranial CSD in a seven-year-old girl suffering from multiple calvarial fractures. Three-month follow-up computed tomography scan revealed new bone formation and almost complete calvarial continuity [113].

Studies regarding the use of AMSCs during DO are scarce in the literature. DO has been a very successful technique that is being used worldwide to treat multiple orthopedic conditions; however, the fixator needs to be kept in place a long time until consolidation is done [17]. The therapeutic potential of AMSCs in tibial defects managed by DO was investigated in a rabbit model by Sunay et al., and they concluded that osteoblasts-differentiated AMSCs shorten the consolidation period of DO [112]. Radiologic analyses of rabbits treated with osteoblast-differentiated AMSCs revealed increased callus density and ossification rate compared with rabbits treated with undifferentiated AMSCs. In addition, biomechanical tests showed that the highest ossification rate was observed in osteoblast-differentiated AMSCs group, and histopathologic studies showed that the quality of newly formed bone was significantly higher in the same group [112]. Nomura et al. investigated whether uncultured-AMSCs combined with collagen gel could promote bone formation in rats DO model [111]. The results demonstrated that bone density of the distracted callus in the AMSCs group was significantly increased in comparison with control group at 6 weeks after injection, and the fracture strength in AMSCs group was significantly higher. In addition, real-time reverse transcription-polymerase chain reaction of the AMSCs formed callus showed both osteogenic differentiation and secretion of growth factors [111].

Concerning the application of AMSCs in the treatment of bone fractures, in a case report by Saxer et al., autologous adipose SVF was loaded onto ceramic granules within fibrin gel and used to treat humeral fractures in eight patients along with standard open reduction and internal fixation [109]. Biopsies of the repair tissue 12 months after the transplantation of AMSCs, demonstrated formation of bone ossicles, structurally disconnected and morphologically distinct from osteoconducted bone, suggesting the osteogenic and angiogenic nature of implanted SVF cells [109]. Anti-inflammatory effects of AMSCs have also been demonstrated in an equine bone fracture case report [110]. Lee et al. analyzed synovial fluid of racehorses suffering bone fractures before and after the intra-articular (IA) injection of AMSCs, and the level of pro-inflammatory factors was significantly decreased in synovial fluids of AMSCs treated horses [110].

Despite advances in fractures treatments, annually, over 5–10% of bone fractures are not able to union [99]. In a study carried out by Ghasroldasht et al., a combination of AMSCs, cancellous bone graft and chitosan hydrogel was applied to non-union bone fractures in rats [99]. As early as 2 weeks after surgery, radiological assessment revealed that callus formation started at the fracture site and higher healing grade was observed in the AMSCs group. Histological and biomechanical studies 8 weeks after surgery supported these findings. It was observed that the defect was filled with hard callus in AMSCs group, and additionally, higher stiffness and ultimate load were reported in the treated group compared to control [99]. On the contrary, Dozza et al. concluded that AMSCs do not improve the healing process when cultivated on demineralized bone matrix before implantation, in a sheep nonunion fracture model [108].

Age-related skeletal changes, such as osteoporosis, are closely related to imbalanced bone remodeling characterized by elevated osteocyte apoptosis and osteoclast activation [114]. Recently, a study has demonstrated for the first time that AMSCs exosomes inhibits induced osteocyte apoptosis and osteocyte-mediated osteoclastogenesis [115]. The use of AMSCs as a regenerative therapy for osteoporosis is a topic of current interest, as it could potentially reduce the susceptibility of fractures and increase lost mineral density [116]. Mirsaidi et al. evaluated the use of AMSCs as a treatment strategy for age-related osteoporosis, both *in vitro* and *in vivo* [117]. The research group demonstrated that AMSCs isolated from osteoporotic mice have the ability to undergo osteogenic differentiation and induce mineralized tissue formation. In addition, a single intratibial injection of AMSCs significantly improved trabecular bone quality after 6 weeks in comparison to untreated contralateral bones [117]. Similar results were obtained by Uri et al. in a study in which AMSCs-seeded scaffolds were implanted into the proximal femur of osteoporotic rats [114]. Results showed that the mean cortical thickness, bone volume density, and bone load to failure in AMSCs injected femora were higher compared to control group. Furthermore, completed osseointegration of the scaffolds and no inflammatory response were reported [114]. Future clinical studies are still needed to validate that human AMSCs have the ability to regenerate lost bone mass in osteoporotic patients.

Avascular necrosis (AVN), also known as osteonecrosis, of the femoral head, is a debilitating disorder that causes necrosis, bone structure collapses, bone destruction, and consequently, pain and joint dysfunction [118]. Despite that BM-MSCs have been used as a cellular therapeutic option for treatment of AVN of the femoral head, limited success has been achieved. Wyles et al. demonstrated that AMSCs outperformed BM-MSCs in growth rate and bone differentiation potential in the setting of AVN, suggesting they could provide a more-potent regenerative therapeutic strategy [119]. In 2011, a series of clinical case reports demonstrated that AMSCs injection, in conjunction with hyaluronic acid (HA) and PRP, is a promising therapy for AVN of femoral head [120]. The MRI data for all patients showed significant positive changes, and subjective pain and functional status improvements [120]. The long-term effect of AMSCs on bone regeneration in patients with AVN has also been reported by Pak [121]. Two patients were involved and they both showed improved symptoms and positive bone regeneration 16 months after treatment [121]. In another case report, Pak et al. treated a man with early stage AVN of the femoral head with a combination of AMSCs, PRP, and HA [118]. The patient was followed-up with MRI scans, VAS, and ROM assessments at 3, 18, and 21 months after treatment.

Severe hip pain was considerably improved at 3 months follow up, with ROM and MRI showing near complete resolution. At 18 and 21 months after treatment, complete resolution of AVN was reported [118] (Table 3).

Table 3. Clinical application of AMSCs in bone injuries.

Authors	Patients	Injury	Treatment	AMSCs Origin	Outcomes
Lendeckel, 2004 [113]	Human	Cranial CSD	AMSCs + fibrin glue + bone graft	Autologous buttock fat	New bone formation and almost complete calvarial continuity at 3 months
Pak, 2011 [120]	Human	Hip osteonecrosis	AMSCs + PRP + HA	Autologous subcutaneous abdominal fat	MRI improvements reflected in pain and functional recovery
Pak, 2012 [121]	Human	AVN of the femoral head	AMSCs + PRP + HA	Autologous subcutaneous abdominal fat	Complete bone regeneration at 16 months follow-up with improved symptoms
Pak et al., 2014 [118]	Human	AVN of the femoral head	AMSCs + PRP	Autologous subcutaneous abdominal fat	Complete MRI resolution at 18 months follow-up with improved VAS and ROM
Lee et al., 2015 [110]	Race horses	Long bone fracture	IA injection of AMSCs	Autologous subcutaneous fat from the tail	Lower levels of proinflammatory factors in synovial fluid
Saxer et al., 2016 [109]	Human	Long bone fracture	Adipose SVF + fibrin gel + open reduction	Autologous subcutaneous abdominal fat	Formation of bone ossicles at 12 months follow-up

AMSCs: Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells, AVN: Avascular necrosis, CSD: critical size defects, HA: hyaluronic acid, IA: intra-articular, PRP: platelet-rich plasma, ROM: Range of movement, SVF: Stromal Vascular Fraction, VAS: Visual Analogue Scale.

5. Application of AMSCs in the Treatment of Cartilage Disorders

The cartilage has poor self-healing ability due to their avascular nature, and hence lack of systemic regulation. After an injury, the repaired tissue is fibrous in nature and does not have the functional properties of native hyaline cartilage, so joint degeneration is accelerated [122]. Recently, MSCs have received increasing attention as promising options for osteochondral regeneration. In vitro studies have demonstrated that AMSCs are able to differentiate towards chondrocytes when they are cultured alone or in combination of GF, such as IGF-1 or TGF- β , and these chondrocytes have the same expression of type II collagen that mature chondrocytes [123–125]. Rodríguez-Jiménez et al. showed that plasma rich in growth factors (PRGF) positively contributes to viability and proliferation of canine AMSCs into caprolactone 2-(methacryloxy) ethyl esters scaffolds [126].

Bosetti et al. analyzed AMSCs chondroinductive properties in vitro and showed that these cells induce chondrocyte proliferation and extracellular matrix production [127]. Despite the mechanism by which AMSCs cause cartilage regeneration still unclear, it has been postulated that these cells may act on subchondral bone, forming the primary repair cartilage [128]. Moreover, it has been demonstrated that after IA injection of AMSCs, these cells were found in the synovial membrane and they expressed molecules with anti-inflammatory and chondrogenic properties [129]. A recent study has shown that AMSC reduce the secretion of proinflammatory cytokines and protect against apoptosis through autophagy inducing [130]. Some studies have proposed that the use of scaffolds seeded with AMSCs could improve retention, aggregation, viability, proliferation, migration, and chondrogenic differentiation of these cells [131–133], while others reported that a scaffold can potentially influence the microenvironment affecting the regional specification of AMSCs [122,134].

Osteoarthritis (OA) is a chronic disease that usually affects older people and damages articular cartilage and synovial joints, leading to pain and disabilities. Almost 80% of elderly population over age 65, and around 12% of global population suffers from OA, and it is considered an economic burden on society, due to the increasing incidence and the high cost of medical treatments [135]. Current pharmaceutical (analgesics, NSAIDs, glucosamine, chondroitin sulfate, and injection of IA therapies such as corticosteroids and HA) or surgical treatments (subchondral drilling and microfracture) aim to decrease pain and improve articular function, but they have limited efficacy in halting OA progression [6]. Over the last few years, regenerative therapies based in the application of stem cells,

especially MSCs, and PRP, have emerged as a good therapeutic strategy to treat OA [136]. IA injection of AMSCs is the most commonly reported protocol for AMSCs delivery into the damaged cartilage, however, synovial fluid from arthritic joints is reported to be cytotoxic to cultured AMSCs [137]; thus, new protocols have been developed, such as intravenous administration. It has been demonstrated that AMSCs can exert systemic anti-inflammatory effects following intravenous administration [138].

Several animal models have demonstrated the chondrogenic potential of autologous AMSCs when transplanted into osteochondral defects [31,139–141]; however, the use of allogenic AMSCs was first reported by Feng et al. (2019) and results indicated that IA injection of allogenic AMSCs efficiently promoted cartilage regeneration in a sheep model, and these cells survived at least 14 weeks after injection [142]. Similar results were obtained by Oshima et al. (2019) in a rabbit model, in which allogenic AMSCs were able to adhere to the osteochondral defect and promote histological healing [122].

With respect to veterinary medicine, Cuervo et al. demonstrated the safety and effectiveness of a single IA injection AMSCs as a treatment in dogs with hip OA. Functional limitation, ROM, VAS score and patient's quality of life progressively improved during the 6 months follow-up period. Additionally, better results were obtained in dogs treated with AMSCs than in the ones treated with plasma rich in growth factors [136]. Moreover, Vilar et al. demonstrated that AMSCs therapy improved limb function in dogs suffering from hip OA [143]. A force platform was used before and after the treatment with AMSCs and an increase in peak vertical force (PVF) and vertical impulse (VI) was reported within the first three months [143]. Recently, Olsen et al. evaluated the safety and the clinical effects of intravenously administered AMSCs in dogs with elbow OA [144]. While some subjective outcome measures, such as activity and behavior of the dogs reported by owners, showed significant improvements, objective outcome measures (synovial fluid biomarkers and mean peak vertical force) did not confirm similar changes [144]; thus, further research is needed before intravenous AMSCs can be recommended as a treatment for OA.

Regarding human medicine, in 2011, for the first time, Pak reported a case series of patients with knee OA treated with adipose SVE. Three months after treatment, the VAS, functional rating index (FRI), and ROM were all improved along with MRI evidence of cartilage regeneration [120]. Hyunchul et al. demonstrated the safety of IA injection of AMSCs for knee OA [145]. Eighteen patients with OA of the knee were randomly assigned to three different groups depending on the AMSCs injected dose (low-dose (1.0×10^7 cells), mid-dose (5.0×10^7), and high dose (1.0×10^8) and had clinical, radiological, arthroscopic and histological evaluations 6 months after injection. After 6 months, the procedure was found to be safe and no treatment-related serious adverse effects were reported. Furthermore, 6 months after treatment, Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) score improved and VAS score decreased in the high-dose group; MRI assessment showed that the size of the cartilage defect significantly decreased while the volume of cartilage increased in the high-dose group, whereas no significant changes were observed in the other dose groups. The second-look arthroscopy revealed that regenerated cartilage formed in the most severely degenerated area, and the histology demonstrated thick hyaline-like cartilage regeneration [145]. These same patients were evaluated after a two-year period and no adverse events were reported [146]. The outcome demonstrated that an IA injection of AMSCs improved knee function, as measured with the WOMAC scale, and reduced knee pain, as measured with the VAS, regardless of the cell dosage. In the high-dose group, the size of the cartilage defect measured with MRI decreased from baseline over two years. Clinical and MRI outcomes tended to deteriorate after one year in the low- and medium-dose groups, while those in the high dose group plateaued until two years [146]. Closely similar results were obtained by Pers et al., suggesting that the IA injection of AMSCs is a safe therapeutic alternative to treat severe knee OA patients [147]. Recently, Song et al. carried out a pilot study with three repeated IA injections of AMSCs within 48 h. Eighteen patients were divided into three dose groups (1×10^7 , 2×10^7 and 5×10^7). Patients were followed up for 24 months, and results, as seen in previous studies, showed that AMSCs improved pain, function, and cartilage volume of the knee joint, with the high-dose group as the one that exhibited the highest improvement [148]. Spasovski et al. treated nine patients with a single IA

injection of AMSCs and they were followed up for 18 months [26]. Significant improvement of clinical scores was observed within first 6 months and persisted during the rest of the follow-up period. MRI visualization showed significant cartilage restoration; on the contrary, radiographic assessment did not show any cartilage improvements [26]. Lately, IA injection of AMSCs combined with arthroscopic debridement has demonstrated to be an effective protocol to improve pain and function in patients with early knee OA [149]. Panni et al. retrospectively analyzed 52 patients with early knee OA that were treated with arthroscopic debridement followed by IA injection of AMSCs, and clinical and functional scores significantly improved in these patients at mid-term follow up (range between 6 to 24 months), especially those with higher pre-operative VAS scores [149].

Several studies have shown that isolated post-traumatic chondral defects and posterior inadequate healing in areas of weight wearing, predispose a patient to later development of OA mainly due to impairment in load transmission. For the management of isolated chondral injuries, surgical interventions, including arthroscopic debridement, microfracture or autologous chondrocytes implantation, are often considered due to the early progression to OA if they are left untreated, but they have some limitations like patient morbidity and inconsistent long-term outcomes [150]. Freitag et al. (2017) reported the successful management of a post-traumatic chondral defect of the patella using IA AMSCs therapy in a patient. After treatment, validated questionnaires for pain and functional assessment (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS), WOMAC, and Numeric Pain Rating Scale (NPRS)) showed consistent improvement across the course of follow-up. Additionally, structural improvements were observed on MRI with complete fill of the chondral defect and smooth integration with the surrounding native cartilage, and MRI T2-mapping techniques indicated normal hyaline-like cartilage regeneration [151]. Similar results were obtained in a patient with a large osteochondral defect of the knee, who suffered from osteochondritis dissecans and with history of multiple unsuccessful past surgical interventions [152]. Following AMSCs therapy, the patient reported improvement in pain and function as measured by NPRS, WOMAC, and KOOS. Moreover, MRI follow-up showed evidence of improvement in cartilage volume and osteochondral architecture at the site of injury, and T2-mapping indicated hyaline-like cartilage morphology [152].

The menisci of human knee are a pair of fibrocartilaginous structures that provide stability and nutrition to articular cartilage and absorb shock to the knee. With knee injuries, the meniscus may be damaged, and once injured, their natural healing potential is very limited. Meniscus tear of the knee is managed conservatively with NSAIDs and physical therapy, but when these treatments fail, arthroscopic meniscectomy is necessary. Such surgery may predispose the joint toward early development of OA [153–155]. As an alternative treatment to the surgical repair of meniscal tears, AMSCs have been investigated [154,156,157]. In 2013, Pak et al. reported a cohort study involving 32 patients with degenerative and non-degenerative meniscal tears that were treated with AMSCs combined with PRP and HA. Results showed symptomatic improvements as measured on a VAS and FRI, along with MRI evidence of the meniscal cartilage regeneration [154]. A year later, the same research group reported a case study in which an IA injection of SVE, together with PRP and HA, repaired a meniscal tear in a young patient. Three months after the treatment, the patient's symptoms significantly improved and almost complete disappearance of the torn meniscus was observed in MRI [156]. Recently, Sasaki et al. have demonstrated that AMSCs-seeded hydrogels enhanced healing of radial meniscal tears in an *in vitro* model, as histologically evidenced by increased neotissue formation, and healing was further improved by exposure of AMSCs to TGF- β . Additionally, immunohistochemical analysis detected procollagen type II only in the AMSCs-seeded hydrogel groups, and mechanical testing showed higher values of load to failure and stiffness in AMSCs-seeded hydrogels groups [157] (Table 4).

A review of the literature suggests that AMSCs own an intrinsic therapeutic potential that may contribute to cartilage regeneration, thus potentially healing isolated chondral defects, meniscal tears, and OA lesions, offering great potential as an alternative treatment modality.

Table 4. Clinical application of AMSCs in chondral injuries.

Authors	Patients	Injury	Treatment	AMSCs Origin	Outcomes
Pak, 2011 [120]	Human	Knee OA	IA injection of adipose SVF	Autologous subcutaneous abdominal fat	MRI evidence of cartilage regeneration with VAS, FRI and ROM improvements
Pak, 2013 [154]	Human	Meniscal tear	AMSCs + PRP + HA	Autologous subcutaneous abdominal fat	MRI evidence of cartilage regeneration with VAS and FRI improvements WOMAC and VAS scores improvements. MRI evidenced that the size of the defect decreased while the volume of cartilage increased. Second-look arthroscopy showed regenerated cartilage
Hyunchul, 2014 [145]	Human	Knee OA	IA injection of AMSCs	Autologous subcutaneous abdominal fat	ROM, VAS, functional limitation, and quality of life improvements
Cuervo et al., 2014 [136]	Dogs	Hip OA	IA injection of AMSCs	Autologous subcutaneous inguinal fat	PVF and VI improvements after the treatment
Vilar et al., 2014 [143]	Dogs	Hip OA	IA injection of AMSCs	Autologous subcutaneous inguinal fat	Almost complete disappearance of the torn meniscus at 3 months after treatment
Pak, 2014 [156]	Human	Meniscal tear	AMSCS + PRP + HA	Autologous subcutaneous abdominal fat	Improvements in pain levels and function after 6 months follow-up
Pers et al., 2016 [147]	Human	Knee OA	IA injection of AMSCs	Autologous subcutaneous abdominal fat	Clinical, functional, and MRI improvements after a 2-year follow-up
Hyunchul, 2017 [146]	Human	Knee OA	IA injection of AMSCs	Autologous subcutaneous abdominal fat	Complete fill of the chondral defect with normal hyaline-like cartilage. Improvements in pain and functional scales
Freitag et al., 2017 [151]	Human	Post-traumatic isolated chondral defect of the patella	IA injection of AMSCs	Autologous subcutaneous abdominal fat	Improvements in cartilage volume with normal hyaline-like cartilage regeneration
Freitag et al., 2017 [152]	Human	Osteochondritis dissecans	IA injection of AMSCs	Autologous subcutaneous abdominal fat	MRI evidenced cartilage restoration with clinical improvements within 6 months that persisted during at least 18 months
Spasovski et al., 2018 [26]	Human	Knee OA	IA injection of AMSCs	Autologous subcutaneous abdominal fat	Improved pain, function, and cartilage volume at 24 months follow-up
Song et al., 2018 [148]	Human	Knee OA	Three IA injections of AMSCs within 48 h	Autologous subcutaneous abdominal fat	Clinical and functional scores improvements at mid-term follow up, especially patients with higher pre-operative VAS score
Panni et al., 2019 [149]	Human	Knee OA	IA injection of AMSCs + debridement arthroscopy	Autologous subcutaneous abdominal fat	Improved activity and behavior reported by owners. No changes in synovial fluid biomarkers and mean peak vertical force
Olsen et al., 2019 [144]	Dogs	Elbow OA	3 intravenous injection of AMSCs	Autologous subcutaneous inguinal fat	

AMSCs: Adipose-derived Mesenchymal stem cells, FRI: Functional Rating Index, HA: Hyaluronic acid, IA: Intra-articular, MRI: magnetic resonance imagin, OA: Osteoarthritis, PRP: Platelet-rich plasma, PVF: Peak vertical force, ROM: Range of movement, SVF: Stromal vascular fraction, VAS: Visual Analogue Scale, VI: Vertical impulse, WOMAC: Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index.

6. Materials and Methods

The authors searched PubMed, Web of Science and Scopus English languages articles using a combination of “adipose derived mesenchymal stem cells”, “tendon”, “ligament”, “cartilage”, “bone”, “muscle”, and “musculoskeletal diseases” as keywords. We chose about 120 articles dedicated to the treatment of different musculoskeletal pathologies with ASCs, and that were published in the last 10 years. Special attention has been drawn to original analysis and studies. Other searches were executed using bibliographies of articles found in the primary and secondary search. One limitation in this review is the fact that our methods, while rigorous, did not follow any formal guidelines for a systematic review (e.g., the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines).

7. Conclusions

The treatment of MSK disorders is gaining interest as the population ages and cell-based tissue engineering has the potential to improve the current treatment of such disorders. During the last years, adipose tissue has emerged as an attractive source of stem cells because their abundance in the body and because AMSCs can be easily isolated using minimally invasive procedures. In addition, they produce larger cell yields than BM-MSCs.

The osteogenic, chondrogenic, and myogenic potential of AMSCs have been widely reported during the last decade. A comprehensive review of the literature suggests that AMSCs possess an inherent therapeutic potential that can directly and indirectly contribute to cartilage, bone, tendon, and muscle regeneration, offering a huge potential as an alternative treatment modality. While there is a substantial number of case-reports regarding the clinical use of AMSCs therapies in chondral and bone injuries, the literature with respect to muscle and tendon disorders is scarce.

Although the successful applications of autologous AMSCs may represent a promising therapeutic alternative, many issues, such as their long-term safety, the duration of their effect, the needed AMSCs' volume to achieve proper outcomes, and the absence of a universal isolation procedure should be resolved and clarified before clinicians can use these treatments on a wider scale. Moreover, the self-renewal and the generation of differentiated progeny of AMSCs *in vivo* have not been well-documented yet. To this end, animals and humans clinical trials, with longer follow up periods and consistent methodology, are needed.

Author Contributions: All authors contributed equally. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This work was funded by García Cugat foundation CEU-UCH chair and CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities.

Acknowledgments: The authors are grateful to the Fundación García Cugat, CEU Cardenal Herrera University and CEU Universities for their technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AMSCs	Adipose-derived mesenchymal stem cells
AVN	Avascular necrosis
BM-MSCs	Bone marrow mesenchymal stem cells
CSD	Critical size defect
DMD	Duchenne muscular dystrophy
DO	Distraction osteogenesis
FGF	Fibroblast growth factor
FRI	Functional rating index
GDF 5	Growth differentiation factor 5
GF	Growth factors
HA	Hyaluronic acid
HGF	Hepatocyte growth factor
IA	Intra-articular
IGF	Insulin growth factor
IL	Interleukin
ISCT	International Society for Cell Therapy
KOOS	Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score
MRI	Magnetic resonance imaging
MSCs	Mesenchymal stem cells
MSK	Musculoskeletal
NPRS	Numeric Pain Rating Scale
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OA	Osteoarthritis
PRGF	Plasma Rich in Growth Factors

PRP	Platelet rich plasma
PVF	Peak vertical force
RM	Regenerative medicine
ROM	Range of movement
SDF-1	Stromal cell derived factor-1
SFDLT	Superficial flexor digitorum longus tendon
SVF	Stromal vascular fraction
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF- α	Tumor necrosis factor α
VAS	Visual analogue scale
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VI	Vertical impulse
WOMAC	Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index

References

1. Bashir, J.; Sherman, A.; Lee, H.; Kaplan, L.; Hare, J.M. Mesenchymal Stem Cell Therapies in the Treatment of Musculoskeletal Diseases. *PM&R* **2014**, *6*, 61–69. [[CrossRef](#)]
2. Coupee, C.; Hansen, P.; Kongsgaard, M.; Kovarnen, V.; Suetta, C.; Aagaard, P.; Kjaer, M.; Magnusson, S.P. Mechanical properties and collagen cross-linking of the patellar tendon in old and young men. *J. Appl. Physiol.* **2009**, *107*, 880–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Yelin, E.; Weinstein, S.; King, T. The burden of musculoskeletal diseases in the United States. *Semin. Arthritis Rheum.* **2016**, *46*, 259–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bianco, P. “Mesenchymal” Stem Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 677–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Langrzyk, A.; Nowak, W.N.; Stepniewski, J.; Jazwa, A.; Florczyk-Soluch, U.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. Critical View on Mesenchymal Stromal Cells in Regenerative Medicine. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *29*, 169–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Damia, E.; Chicharro, D.; Lopez, S.; Cuervo, B.; Rubio, M.; Sopena, J.J.; Manuel Vilar, J.; Maria Carrillo, J. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Are They a Good Therapeutic Strategy for Osteoarthritis? *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Meirelles, L.d.S.; Caplan, A.I.; Nardi, N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2008**, *26*, 2287–2299. [[CrossRef](#)]
8. Caplan, A.I.; Correa, D. The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 11–15. [[CrossRef](#)]
9. Ullah, I.; Subbarao, R.B.; Rho, G.J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* **2015**, *35*, e00191. [[CrossRef](#)]
10. Sacchetti, B.; Funari, A.; Remoli, C.; Giannicola, G.; Kogler, G.; Liedtke, S.; Cossu, G.; Serafini, M.; Sampaolesi, M.; Tagliafico, E.; et al. No Identical “Mesenchymal Stem Cells” at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels. *Stem Cell Rep.* **2016**, *6*, 897–913. [[CrossRef](#)]
11. Wang, J.; Liao, L.; Tan, J. Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: Current status and open questions. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2011**, *11*, 893–909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sasaki, M.; Abe, R.; Fujita, Y.; Ando, S.; Inokuma, D.; Shimizu, H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 2581–2587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Chen, L.; Tredget, E.E.; Wu, P.Y.G.; Wu, Y. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rasmusson, I.; Ringden, O.; Sundberg, B.; Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp. Cell Res.* **2005**, *305*, 33–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Meirelles, L.d.S.; Fontes, A.M.; Covas, D.T.; Caplan, A.I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2009**, *20*, 419–427. [[CrossRef](#)]
16. Tan, X.; Gong, Y.; Wu, P.; Liao, D.; Zheng, X. Mesenchymal Stem Cell-Derived Microparticles: A Promising Therapeutic Strategy. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 14348–14363. [[CrossRef](#)]

17. Morcos, M.W.; Al-Jallad, H.; Hamdy, R. Comprehensive Review of Adipose Stem Cells and Their Implication in Distraction Osteogenesis and Bone Regeneration. *Biomed Res. Int.* **2015**, *8*, 842975. [[CrossRef](#)]
18. Aust, L.; Devlin, B.; Foster, S.J.; Halvorsen, Y.D.C.; Hicok, K.; du Laney, T.; Sen, A.; Willingmyre, G.D.; Gimble, J.M. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* **2004**, *6*, 7–14. [[CrossRef](#)]
19. Rodriguez, A.M.; Elabd, C.; Amri, E.Z.; Ailhaud, G.; Dani, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* **2005**, *87*, 125–128. [[CrossRef](#)]
20. Zhu, Y.; Liu, T.; Song, K.; Fan, X.; Ma, X.; Cu, Z. Adipose-derived stem cell: A better stem cell than BMSC. *Cell Biochem. Funct.* **2008**, *26*, 664–675. [[CrossRef](#)]
21. Bertozzi, N.; Simonacci, E.; Grieco, M.P.; Grignaffini, E.; Raposio, E. The biological and clinical basis for the use of adipose-derived stem cells in the field of wound healing. *Ann. Med. Surg.* **2017**, *20*, 41–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Daher, S.R.; Johnstone, B.H.; Phinney, D.G.; March, K.L. Adipose Stromal/Stem Cells: Basic and Translational Advances: The IFATS Collection Introduction. *Stem Cells* **2008**, *26*, 2664–2665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gonzalez-Rey, E.; Gonzalez, M.A.; Varela, N.; O'Valle, F.; Hernandez-Cortes, P.; Rico, L.; Buescher, D.; Delgado, M. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, *69*, 241–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dahl, J.; Duggal, S.; Coulston, N.; Millar, D.; Melki, J.; Shahdadfar, A.; Brinchmann, J.E.; Collas, P. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. *Int. J. Dev. Biol.* **2008**, *52*, 1033–1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tangchitphisut, P.; Srikaew, N.; Numhom, S.; Tangprasittipap, A.; Woratanarat, P.; Wongsak, S.; Kijkunasathian, C.; Hongeng, S.; Murray, I.R.; Tawonsawatruk, T. Infrapatellar Fat Pad: An Alternative Source of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Arthritis* **2016**, *2016*, 4019873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Spasovski, D.; Spasovski, V.; Bascarevic, Z.; Stojiljkovic, M.; Vreca, M.; Anđelković, M.; Pavlović, S. Intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of knee osteoarthritis. *J. Gene Med.* **2018**, *20*, e3002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Muñoz-Criado, I.; Meseguer-Ripolles, J.; Mellado-Lopez, M.; Alastrue-Agudo, A.; Griffith, R.J.; Forteza-Vila, J.; Cugat, R.; Garcia, M.; Moreno-Manzano, V. Human Suprapatellar Fat Pad-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Chondrogenesis and Cartilage Repair in a Model of Severe Osteoarthritis. *Stem Cells Int.* **2017**, *4758930*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Astori, G.; Vignati, F.; Bardelli, S.; Tubio, M.; Gola, M.; Albertini, V.; Bambi, E.; Scali, G.; Castelli, D.; Rasini, V.; et al. "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J. Transl. Med.* **2007**, *5*, 55. [[CrossRef](#)]
29. Bowles, A.C.; Strong, A.L.; Wise, R.M.; Thomas, R.C.; Gerstein, B.Y.; Dutreil, M.F.; Hunter, R.S.; Gimble, J.M.; Bunnell, B.A. Adipose Stromal Vascular Fraction-Mediated Improvements at Late-Stage Disease in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *Stem Cells* **2017**, *35*, 532–544. [[CrossRef](#)]
30. El-Habta, R.; Sloniecka, M.; Kingham, P.J.; Backman, L.J. The adipose tissue stromal vascular fraction secretome enhances the proliferation but inhibits the differentiation of myoblasts. *Stem Cell Res. Ther.* **2018**, *9*, 352. [[CrossRef](#)]
31. Jurgens, W.J.; Kroeze, R.J.; Zandieh-Doulabi, B.; van Dijk, A.; Renders, G.A.; Smit, T.H.; van Milligen, F.J.; Ritt, M.J.; Helder, M.N. One-step surgical procedure for the treatment of osteochondral defects with adipose-derived stem cells in a caprine knee defect: A pilot study. *Biores. Open Access* **2013**, *2*, 315–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wu, L.; Prins, H.; Leijten, J.; Helder, M.N.; Evseenko, D.; Moroni, L.; van Blitterswijk, C.A.; Lin, Y.; Karperien, M. Chondrocytes Cocultured with Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue Present More Intense Chondrogenic Characteristics Than with Adipose Stem Cells. *Tissue Eng. Part A* **2016**, *22*, 336–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Murphy, J.; Fink, D.; Hurziker, E.; Barry, F. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **2003**, *48*, 3464–3474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Argentati, C.; Morena, F.; Bazzucchi, M.; Armentano, I.; Emiliani, C.; Martino, S. Adipose Stem Cell Translational Applications: From Bench-to-Bedside. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bateman, M.E.; Strong, A.L.; Gimble, J.M.; Bunnell, B.A. Concise Review: Using Fat to Fight Disease: A Systematic Review of Nonhomologous Adipose-Derived Stromal/Stem Cell Therapies. *Stem Cells* **2018**, *36*, 1311–1328. [[CrossRef](#)]

36. Meyer, J.; Salamon, A.; Mispagel, S.; Kamp, G.; Peters, K. Energy metabolic capacities of human adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro and their adaptations in osteogenic and adipogenic differentiation. *Exp. Cell Res.* **2018**, *370*, 632–642. [CrossRef]
37. Nordberg, R.C.; Lobo, E.G. Our Fat Future: Translating Adipose Stem Cell Therapy. *Stem Cells Transl. Med.* **2015**, *4*, 974–979. [CrossRef]
38. Yang, H.J.; Kim, K.; Kim, M.K.; Lee, S.J.; Ryu, Y.H.; Seo, B.E.; Oh, D.; Ahn, S.; Lee, H.Y.; Rhie, J.W. The Stem Cell Potential and Multipotency of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Vary by Cell Donor and Are Different from Those of Other Types of Stem Cells. *Cells Tissues Organs* **2014**, *199*, 373–383. [CrossRef]
39. Feisst, V.; Meidinger, S.; Locke, M.B. From bench to bedside: Use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning Adv. Appl.* **2015**, *8*, 149–162. [CrossRef]
40. Zhao, X.; Liang, M.; Li, X.; Qiu, X.; Cui, L. Identification of key genes and pathways associated with osteogenic differentiation of adipose stem cells. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 9777–9785. [CrossRef]
41. Huang, J.L.; Zuk, P.A.; Jones, N.E.; Zhu, M.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H.; Benhaim, P. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* **2004**, *113*, 585–594. [CrossRef] [PubMed]
42. Kuznetsova, D.; Prodanets, N.; Rodimova, S.; Antonov, E.; Meleshina, A.; Timashev, P.; Zagaynova, E. Study of the involvement of allogeneic MSCs in bone formation using the model of transgenic mice. *Cell Adhes. Migr.* **2017**, *11*, 233–244. [CrossRef] [PubMed]
43. Bacou, E.; el Andaloussi, R.B.; Daussin, P.A.; Micallef, J.P.; Levin, J.M.; Chammas, M.; Casteilla, L.; Reyne, Y.; Nougues, J. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transpl.* **2004**, *13*, 103–111. [CrossRef] [PubMed]
44. Lee, J.; Abdeen, A.A.; Tang, X.; Saif, T.A.; Kilian, K.A. Matrix directed adipogenesis and neurogenesis of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Acta Biomater.* **2016**, *42*, 46–55. [CrossRef] [PubMed]
45. Zhang, M.; Jiang, M.H.; Kim, D.; Ahn, W.; Chung, E.; Son, Y.; Chi, G. Comparative Analysis of the Cell Fates of Induced Schwann Cells from Subcutaneous Fat Tissue and Naive Schwann Cells in the Sciatic Nerve Injury Model. *Biomed Res. Int.* **2017**. [CrossRef] [PubMed]
46. Baer, P.C. Adipose-Derived Stem Cells and Their Potential to Differentiate into the Epithelial Lineage. *Stem Cells Dev.* **2011**, *20*, 1805–1816. [CrossRef] [PubMed]
47. Lee, M.S.; Wang, J.; Yuan, H.; Jiao, H.; Tsai, T.L.; Squire, M.W.; Li, W.J. Endothelin-1 differentially directs lineage specification of adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *FASEB J* **2019**, *33*, 996–1007. [CrossRef] [PubMed]
48. Djouad, F.; Bouffi, C.; Ghannam, S.; Noel, D.; Jorgensen, C. Mesenchymal stem cells: Innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2009**, *5*, 392–399. [CrossRef]
49. Kilroy, G.E.; Foster, S.J.; Wu, X.; Ruiz, J.; Sherwood, S.; Heifetz, A.; Ludlow, J.W.; Stricker, D.M.; Potiny, S.; Green, P.; et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J. Cell Physiol.* **2007**, *212*, 702–709. [CrossRef]
50. Conese, M.; Carbone, A.; Castellani, S.; Di Gioia, S. Paracrine Effects and Heterogeneity of Marrow-Derived Stem/Progenitor Cells: Relevance for the Treatment of Respiratory Diseases. *Cells Tissues Organs* **2013**, *197*, 445–473. [CrossRef]
51. Murphy, M.B.; Moncivais, K.; Caplan, A.L. Mesenchymal stem cells: Environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp. Mol. Med.* **2013**, *45*, e54. [CrossRef]
52. Milner, D.J.; Bionaz, M.; Monaco, E.; Cameron, J.A.; Wheeler, M.B. Myogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from porcine adipose tissue. *Cell Tissue Res.* **2018**, *372*, 507–522. [CrossRef] [PubMed]
53. El-Habta, R.; Kingham, P.J.; Backman, L.J. Adipose Stem Cells Enhance Myoblast Proliferation Via Acetylcholine and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling. *Muscle Nerve* **2018**, *57*, 305–311. [CrossRef] [PubMed]
54. Forcales, S. Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies. *Front. Aging Neurosci.* **2015**, *7*, 123. [CrossRef] [PubMed]
55. Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **2001**, *7*, 211–228. [CrossRef] [PubMed]

56. Mizuno, H.; Zuk, P.A.; Zhu, M.; Lorenz, H.P.; Benhaim, P.; Hedrick, M.H. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* **2002**, *109*, 199–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Zheng, B.; Cao, B.; Li, G.; Huard, J. Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 1891–1901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Di Rocco, G.; Iachininoto, M.G.; Tritarelli, A.; Straino, S.; Zacheo, A.; Germani, A.; Crea, F.; Capogrossi, M.C. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2945–2952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Eom, Y.W.; Lee, J.E.; Yang, M.S.; Jang, I.K.; Kim, H.E.; Lee, D.H.; Kim, Y.J.; Park, W.J.; Kong, J.H.; Shim, K.Y.; et al. Effective myotube formation in human adipose tissue-derived stem cells expressing dystrophin and myosin heavy chain by cellular fusion with mouse C2C12 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *408*, 167–173. [[CrossRef](#)]
60. Lee, J.; Kemp, D. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341*, 882–888. [[CrossRef](#)]
61. Meligy, F.Y.; Shigemura, K.; Behnsawy, H.M.; Fujisawa, M.; Kawabata, M.; Shirakawa, T. The efficiency of in vitro isolation and myogenic differentiation of MSCs derived from adipose connective tissue, bone marrow, and skeletal muscle tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2012**, *48*, 203–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Stern-Straeter, J.; Bonaterra, G.A.; Juritz, S.; Birk, R.; Goessler, U.R.; Bieback, K.; Bugert, P.; Schultz, J.; Hoermann, K.; Kinscherf, R.; et al. Evaluation of the effects of different culture media on the myogenic differentiation potential of adipose tissue- or bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Med.* **2014**, *33*, 160–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Vieira, N.M.; Bueno, C.R., Jr.; Brandalise, V.; Moraes, L.V.; Zucconi, E.; Secco, M.; Suzuki, M.F.; Camargo, M.M.; Bartolini, P.; Brum, P.C.; et al. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells* **2008**, *26*, 2391–2398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Schaakos, D.; Kalbermatten, D.F.; Raffoul, W.; Wiberg, M.; Kingham, P.J. Regenerative cell injection in denervated muscle reduces atrophy and enhances recovery following nerve repair. *Muscle Nerve* **2013**, *47*, 691–701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. da Justa Pinheiro, C.H.; Farias de Queiroz, J.C.; Guimaraes-Ferreira, L.; Vitzel, K.F.; Nachbar, R.T.; Oliveira de Sousa, L.G.; de Souza, A.L., Jr.; Nunes, M.T.; Curi, R. Local Injections of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Inflammation and Increase Angiogenesis Ameliorating the Dystrophic Phenotype in Dystrophin-Deficient Skeletal Muscle. *Stem Cell Rev. Rep.* **2012**, *8*, 363–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Lee, E.; Kim, A.; Lee, E.; Park, J.; Lee, M.; Hwang, M.; Kim, C.; Kim, S.; Jeong, K. Therapeutic Effects of Mouse Adipose-Derived Stem Cells and Losartan in the Skeletal Muscle of Injured Mdx Mice. *Cell Transpl.* **2015**, *24*, 939–953. [[CrossRef](#)]
67. Gibson, M.A.; Brown, S.G.; Brown, N.O. Semitendinosus myopathy and treatment with adipose-derived stem cells in working German shepherd police dogs. *Can. Vet. J. Rev. Vet. Can.* **2017**, *58*, 241–246.
68. Brown, S.G.; Harman, R.; Black, L.L. Adipose-derived stem cell therapy for severe muscle tears in working German shepherds: Two case reports. *Stem Cell Discov.* **2012**, *2*, 41–44. [[CrossRef](#)]
69. Peçanha, R.; Ribeiro, M.B.; Ferreira, A.B.R.; Moraes, M.O.; Zapata-Sudo, G.; Kasai-Brunswick, T.H.; Campos-de-Carvalho, A.C.; dos Santos Goldenberg, R.C.; Werneck-de-Castro, J.P.S. Adipose-Derived Stem-Cell Treatment of Skeletal Muscle Injury. *J. Bone Jt. Surg. Am. Vol.* **2012**, *94*, 609–617. [[CrossRef](#)]
70. Gorecka, A.; Salemi, S.; Haralampieva, D.; Moalli, E.; Stroka, D.; Candinas, D.; Eberli, D.; Brugger, L. Autologous transplantation of adipose-derived stem cells improves functional recovery of skeletal muscle without direct participation in new myofiber formation. *Stem Cell Res. Ther.* **2018**, *9*, 195. [[CrossRef](#)]
71. Nakamura, A.; Takeda, S. Mammalian Models of Duchenne Muscular Dystrophy: Pathological Characteristics and Therapeutic Applications. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 184393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Martins, P.C.M.; Ayub-Guerrieri, D.; Martins-Bach, A.B.; Onofre-Oliveira, P.; Malheiros, J.M.; Tannus, A.; de Sousa, P.L.; Carlier, P.G.; Vainzof, M. Dmdm(dx)/Large(myd): A new mouse model of neuromuscular diseases useful for studying physiopathological mechanisms and testing therapies. *Dis. Models Mech.* **2013**, *6*, 1167–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Ahmad, Z.; Wardale, J.; Brooks, R.; Henson, F.; Noorani, A.; Rushton, N. Exploring the Application of Stem Cells in Tendon Repair and Regeneration. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **2012**, *28*, 1018–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. de Aro, A.A.; Carneiro, G.D.; Teodoro, L.F.R.; da Veiga, F.C.; Ferrucci, D.L.; Simões, G.F.; Simões, P.W.; Alvares, L.E.; de Oliveira, A.L.R.; Vicente, C.P.; et al. Injured Achilles Tendons Treated with Adipose-Derived Stem Cells Transplantation and GDF-5. *Cells* **2018**, *7*, 127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Schneider, M.; Angele, P.; Jarvinen, T.A.H.; Docheva, D. Rescue plan for Achilles: Therapeutics steering the fate and functions of stem cells in tendon wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *129*, 352–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Ni, M.; Lui, P.P.Y.; Rui, Y.F.; Lee, Y.W.; Lee, Y.W.; Tan, Q.; Wong, Y.M.; Kong, S.K.; Lau, P.M.; Li, G.; et al. Tendon-derived stem cells (TDSCs) promote tendon repair in a rat patellar tendon window defect model. *J. Orthop. Res.* **2012**, *30*, 613–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Lee, S.Y.; Kim, W.; Lim, C.; Chung, S.G. Treatment of Lateral Epicondylitis by Using Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study. *Stem Cells* **2015**, *33*, 2995–3005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Schneider, P.R.A.; Buhrmann, C.; Mobasheri, A.; Matis, U.; Shakibaei, M. Three-Dimensional High-Density Co-Culture with Primary Tenocytes Induces Tenogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *J. Orthop. Res.* **2011**, *29*, 1351–1360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Park, A.; Hogan, M.V.; Kesturu, G.S.; James, R.; Balian, G.; Chhabra, A.B. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Treated with Growth Differentiation Factor-5 Express Tendon-Specific Markers. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 2941–2951. [[CrossRef](#)]
80. Uysal, A.C.; Mizuno, H. Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells for Tendon Repair. *Adipose Deriv. Stem Cells Methods Protoc.* **2011**, *702*, 443–451. [[CrossRef](#)]
81. Uysal, C.A.; Tobita, M.; Hyakusoku, H.; Mizuno, H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: Biomechanical and immunohistochemical evaluation. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* **2012**, *65*, 1712–1719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Vieira, M.H.C.; Oliveira, R.J.; Eca, L.P.M.; Pereira, L.S.O.; Hermeto, L.C.; Matuo, R.; Fernandes, W.S.; Silva, R.A.; Antonioli, A.C.M.B. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells to treat Achilles tendon injuries. *Genet. Mol. Res.* **2014**, *13*, 10434–10449. [[CrossRef](#)]
83. Valencia Mora, M.; Antuna Antuna, S.; Garcia Arranz, M.; Teresa Carrascal, M.; Barco, R. Application of adipose tissue-derived stem cells in a rat rotator cuff repair model. *Inj. Int. J. Care Inj.* **2014**, *45*, S22–S27. [[CrossRef](#)]
84. Oshita, T.; Tobita, M.; Tajima, S.; Mizuno, H. Adipose-Derived Stem Cells Improve Collagenase-Induced Tendinopathy in a Rat Model. *Am. J. Sports Med.* **2016**, *44*, 1983–1989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Lee, S.Y.; Kwon, B.; Lee, K.; Son, Y.H.; Chung, S.G. Therapeutic Mechanisms of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rat Tendon Injury Model. *Am. J. Sports Med.* **2017**, *45*, 1429–1439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Lu, L.; Ma, M.; Cai, J.; Yuan, F.; Zhou, W.; Luo, S.; Pan, Z.; Zeng, W.; Zhong, N.; Yin, F. Effects of Local Application of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction on Tendon-Bone Healing after Rotator Cuff Tear in Rabbits. *Chin. Med. J.* **2018**, *131*, 2620–2622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Skutella, T. Autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells affect the regeneration of equine tendon lesions. *Tissue Eng.* **2016**, *1*, 1–8.
88. Carvalho, A.d.M.; Badial, P.R.; Cisneros Alvarez, L.E.; Miluzzi Yamada, A.L.; Borges, A.S.; Deffune, E.; Hussni, C.A.; Garcia Alves, A.L. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: A randomized controlled trial. *Stem Cell Res. Ther.* **2013**, *4*, 85. [[CrossRef](#)]
89. Kim, Y.S.; Sung, C.H.; Chung, S.H.; Kwak, S.J.; Koh, Y.G. Does an Injection of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Loaded in Fibrin Glue Influence Rotator Cuff Repair Outcomes? A Clinical and Magnetic Resonance Imaging Study. *Am. J. Sports Med.* **2017**, *45*, 2010–2018. [[CrossRef](#)]
90. Uselli, F.G.; Grassi, M.; Maccario, C.; Vigano, M.; Lanfranchi, L.; Montrasio, U.A.; de Girolamo, L. Intratendinous adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) injection provides a safe, efficacious treatment for Achilles tendinopathy: Results of a randomized controlled clinical trial at a 6-month follow-up. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **2018**, *26*, 2000–2010. [[CrossRef](#)]
91. Gimble, J.M.; Guilak, F. Adipose-derived adult stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* **2003**, *5*, 362–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Rada, T.; Reis, R.L.; Gomes, M.E. Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Their Application in Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2009**, *15*, 113–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

93. Halvorsen, Y.C.; Wilkison, W.O.; Gimble, J.M. Adipose-derived stromal cells - their utility and potential in bone formation. *Int. J. Obes.* **2000**, *24*, S41–S44. [[CrossRef](#)]
94. Halvorsen, Y.D.C.; Franklin, D.; Bond, A.L.; Hitt, D.C.; Aughter, C.; Boskey, A.L.; Paschalis, E.P.; Wilkison, W.O.; Gimble, J.M. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* **2001**, *7*, 729–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Lee, S.; Kang, S.; Do, H.; Han, I.; Shin, D.A.; Kim, J.; Lee, S. Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Rurx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* **2010**, *31*, 5652–5659. [[CrossRef](#)]
96. Jeon, O.; Rhie, J.W.; Kwon, I.; Kim, J.; Kim, B.; Lee, S. In vivo bone formation following transplantation of human adipose-derived stromal cells that are not differentiated osteogenically. *Tissue Eng. Part A* **2008**, *14*, 1285–1294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Li, X.; Yao, J.; Wu, L.; Jing, W.; Tang, W.; Lin, Y.; Tian, W.; Liu, L. Osteogenic induction of adipose-derived stromal cells: Not a requirement for bone formation in vivo. *Artif. Organs* **2010**, *34*, 46–54. [[CrossRef](#)]
98. Perez, J.R.; Kouroupis, D.; Li, D.J.; Best, T.M.; Kaplan, L.; Correa, D. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, 105. [[CrossRef](#)]
99. Ghasroldasht, M.M.; Matin, M.M.; Mehrjerdi, H.K.; Naderi-Meshkin, H.; Moradi, A.; Rajabioun, M.; Alipour, E.; Ghasemi, S.; Zare, M.; Mirahmadi, M.; et al. Application of mesenchymal stem cells to enhance non-union bone fracture healing. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2019**, *107*, 301–311. [[CrossRef](#)]
100. Liu, G.; Zhang, Y.; Liu, B.; Sun, J.; Li, W.; Cui, L. Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2655–2664. [[CrossRef](#)]
101. Cowan, C.M.; Shi, Y.Y.; Aalami, O.O.; Chou, Y.F.; Mari, C.; Thomas, R.; Quarto, N.; Contag, C.H.; Wu, B.; Longaker, M.T. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 560–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Levi, B.; James, A.W.; Nelson, E.R.; Vistnes, D.; Wu, B.; Lee, M.; Gupta, A.; Longaker, M.T. Human Adipose Derived Stromal Cells Heal Critical Size Mouse Calvarial Defects. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11177. [[CrossRef](#)]
103. Di Bella, C.; Farlie, P.; Penington, A.J. Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells. *Tissue Eng. Part A* **2008**, *14*, 483–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Du, J.; Xie, P.; Lin, S.; Wu, Y.; Zeng, D.; Li, Y.; Jiang, X. Time-Phase Sequential Utilization of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Mesoporous Bioactive Glass for Restoration of Critical Size Bone Defects. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 28340–28350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Arrigoni, E.; de Girolamo, L.; Di Giancamillo, A.; Stanco, D.; Dellavia, C.; Carnelli, D.; Campagnol, M.; Domeneghini, C.; Brini, A.T. Adipose-derived stem cells and rabbit bone regeneration: Histomorphometric, immunohistochemical and mechanical characterization. *J. Orthop. Sci.* **2013**, *18*, 331–339. [[CrossRef](#)]
106. Cui, L.; Liu, B.; Liu, G.; Zhang, W.; Cen, L.; Sun, J.; Yin, S.; Liu, W.; Cao, Y. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5477–5486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Yoon, D.; Kang, B.; Kim, Y.; Lee, S.H.; Rhew, D.; Kim, W.H.; Kweon, O. Effect of serum-derived albumin scaffold and canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on osteogenesis in canine segmental bone defect model. *J. Vet. Sci.* **2015**, *16*, 397–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Dozza, B.; Salamanna, F.; Baleani, M.; Giavatesi, G.; Parrilli, A.; Zani, L.; Lucarelli, E.; Martini, I.; Fini, M.; Donati, D.M. Nonunion fracture healing: Evaluation of effectiveness of demineralized bone matrix and mesenchymal stem cells in a novel sheep bone nonunion model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12*, 1972–1985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Saxer, F.; Scherberich, A.; Todorov, A.; Studer, P.; Miot, S.; Schreiner, S.; Guven, S.; Tchang, L.A.H.; Haug, M.; Heberer, M.; et al. Implantation of Stromal Vascular Fraction Progenitors at Bone Fracture Sites: From a Rat Model to a First-in-Man Study. *Stem Cells* **2016**, *34*, 2956–2966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Lee, G.B. Anti-inflammatory effects of equine adipose-derived mesenchymal stem cells for bone fracture in thoroughbred racehorses. *J. Prev. Vet. Med.* **2015**, *39*, 93–100. [[CrossRef](#)]
111. Nomura, I.; Watanabe, K.; Matsubara, H.; Hayashi, K.; Sugimoto, N.; Tsuchiya, H. Uncultured autogenous adipose-derived regenerative cells promote bone formation during distraction osteogenesis in rats. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2014**, *472*, 3798–3806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Sunay, O.; Can, G.; Cakir, Z.; Denek, Z.; Kozanoglu, I.; Erbil, G.; Yilmaz, M.; Baran, Y. Autologous rabbit adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of bone injuries with distraction osteogenesis. *Cytotherapy* **2013**, *15*, 690–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

113. Lendeckel, S.; Jodicke, A.; Christophis, P.; Heidinger, K.; Wolff, J.; Fraser, J.K.; Hedrick, M.H.; Berthold, L.; Howaldt, H.P. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: Case report. *J. Cranio Maxillofac. Surg.* **2004**, *32*, 370–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Uri, O.; Behrbalk, E.; Folman, Y. Local implantation of autologous adipose-derived stem cells increases femoral strength and bone density in osteoporotic rats: A randomized controlled animal study. *J. Orthop. Surg.* **2018**, *26*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Ren, L.; Song, Z.; Cai, Q.; Chen, R.; Zou, Y.; Fu, Q.; Ma, Y. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate hypoxia/serum deprivation-induced osteocyte apoptosis and osteocyte-mediated osteoclastogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *508*, 138–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Antebi, B.; Pelled, G.; Gazit, D. Stem Cell Therapy for Osteoporosis. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2014**, *12*, 41–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Mirsaidi, A.; Genelin, K.; Vetsch, J.R.; Stanger, S.; Theiss, F.; Lindtner, R.A.; von Rechenberg, B.; Blauth, M.; Mueller, R.; Kuhn, G.A.; et al. Therapeutic potential of adipose-derived stromal cells in age-related osteoporosis. *Biomaterials* **2014**, *35*, 7326–7335. [[CrossRef](#)]
118. Pak, J.; Lee, J.H.; Jeon, J.H.; Lee, S.H. Complete resolution of avascular necrosis of the human femoral head treated with adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma. *J. Int. Med. Res.* **2014**, *42*, 1353–1362. [[CrossRef](#)]
119. Wyles, C.C.; Houdek, M.T.; Crespo-Diaz, R.J.; Norambuena, G.A.; Stalboerger, P.G.; Terzic, A.; Behfar, A.; Sierra, R.J. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Are Phenotypically Superior for Regeneration in the Setting of Osteonecrosis of the Femoral Head. *Clin. Orthop.* **2015**, *473*, 3080–3090. [[CrossRef](#)]
120. Pak, J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: A case series. *J. Med. Case Rep.* **2011**, *5*, 296. [[CrossRef](#)]
121. Pak, J. Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells Induce Persistent Bone-Like Tissue in Osteonecrotic Femoral Heads. *Pain Physician* **2012**, *15*, 75–85. [[PubMed](#)]
122. Oshima, T.; Nakase, J.; Toratani, T.; Numata, H.; Takata, Y.; Nakayama, K.; Tsuchiya, H. A Scaffold-Free Allogeneic Construct from Adipose-Derived Stem Cells Regenerates an Osteochondral Defect in a Rabbit Model. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **2019**, *35*, 583–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Longobardi, L.; O'Rear, L.; Aakula, S.; Johnstone, B.; Shimer, K.; Chytil, A.; Horton, W.A.; Moses, H.L.; Spagnoli, A. Effect of IGF-1 in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J. Bone Miner. Res.* **2006**, *21*, 626–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Estes, B.T.; Diekman, B.O.; Gimble, J.M.; Guilak, F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1294–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Sun, Q.; Zhang, L.; Xu, T.; Ying, J.; Xia, B.; Jing, H.; Tong, P. Combined use of adipose derived stem cells and TGF-beta3 microspheres promotes articular cartilage regeneration in vivo. *Biotech. Histochem.* **2018**, *93*, 168–176. [[CrossRef](#)]
126. Rodriguez-Jimenez, E.J.; Valdes-Sanchez, T.; Carrillo, J.M.; Rubio, M.; Monleon-Prades, M.; Garcia-Cruz, D.M.; Garcia, M.; Cugat, R.; Moreno-Manzano, V. Platelet-rich plasma favors proliferation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells in methacrylate-encapped caprolactone porous scaffold niches. *J. Funct. Biomater.* **2012**, *3*, 556–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Bosetti, M.; Borrone, A.; Follerzi, A.; Messaggio, E.; Tremolada, C.; Cannas, M. Human Lipoaspirate as Autologous Injectable Active Scaffold for One-Step Repair of Cartilage Defects. *Cell Transpl.* **2016**, *25*, 1043–1056. [[CrossRef](#)]
128. Pelttari, K.; Steck, E.; Richter, W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Inj. Int. J. Care Inj.* **2008**, *39*, S58–S65. [[CrossRef](#)]
129. Ozeki, N.; Muneta, T.; Koga, H.; Nakagawa, Y.; Mizuno, M.; Tsuji, K.; Mabuchi, Y.; Akazawa, C.; Kobayashi, E.; Matsumoto, K.; et al. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 1061–1070. [[CrossRef](#)]
130. Zhou, J.; Wang, Y.; Liu, Y.; Zeng, H.; Xu, H.; Lian, F. Adipose derived mesenchymal stem cells alleviated osteoarthritis and chondrocyte apoptosis through autophagy inducing. *J. Cell Biochem.* **2019**, *120*, 2198–2212. [[CrossRef](#)]
131. Zhang, K.; Yan, S.; Li, G.; Cui, L.; Yin, J. In-situ birth of MSCs multicellular spheroids in poly(L-glutamic acid)/chitosan scaffold for hyaline-like cartilage regeneration. *Biomaterials* **2015**, *71*, 24–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

132. Kang, H.; Peng, J.; Lu, S.; Liu, S.; Zhang, L.; Huang, J.; Sui, X.; Zhao, B.; Wang, A.; Xu, W.; et al. In vivo cartilage repair using adipose-derived stem cell-loaded decellularized cartilage ECM scaffolds. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2014**, *8*, 442–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Choi, B.; Kim, S.; Fan, J.; Kowalski, T.; Petrigliano, F.; Evseenko, D.; Lee, M. Covalently conjugated transforming growth factor-beta1 in modular chitosan hydrogels for the effective treatment of articular cartilage defects. *Biomater. Sci.* **2015**, *3*, 742–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Koga, H.; Muneta, T.; Ju, Y.; Nagase, T.; Nimura, A.; Mochizuki, T.; Ichinose, S.; Von der Mark, K.; Sekiya, I. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells* **2007**, *25*, 689–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Rahimzadeh, P.; Imani, F.; Faiz, S.H.R.; Entezary, S.R.; Zamanabadi, M.N.; Alebouyeh, M.R. The effects of injecting intra-articular platelet-rich plasma or prolotherapy on pain score and function in knee osteoarthritis. *Clin. Interv. Aging* **2018**, *13*, 73–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Cuervo, B.; Rubio, M.; Sopena, J.; Manuel Dominguez, J.; Vilar, J.; Morales, M.; Cugat, R.; Maria Carrillo, J. Hip Osteoarthritis in Dogs: A Randomized Study Using Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Plasma Rich in Growth Factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 13437–13460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Kiefer, K.M.; O'Brien, T.D.; Pluhar, E.G.; Conzemius, M. Canine adipose-derived stromal cell viability following exposure to synovial fluid from osteoarthritic joints. *Vet. Rec. Open* **2015**, *2*, e000063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Zhang, J.; Huang, X.; Wang, H.; Liu, X.; Zhang, T.; Wang, Y.; Hu, D. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **2015**, *6*, 234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. de Girolamo, L.; Niada, S.; Arrigoni, E.; Di Giancamillo, A.; Domeneghini, C.; Dadsetan, M.; Yaszemski, M.J.; Gastaldi, D.; Vena, P.; Taffetani, M.; et al. Repair of osteochondral defects in the minipig model by OPF hydrogel loaded with adipose-derived mesenchymal stem cells. *Regen. Med.* **2015**, *10*, 135–151. [[CrossRef](#)]
140. Hsu, Y.; Sheu, S.; Wang, C.; Chuang, M.; Chung, P.; Luo, Y.; Huang, J.; Ohashi, E.; Akiyoshi, H.; Kuo, T. The effect of adipose-derived mesenchymal stem cells and chondrocytes with platelet-rich fibrin releasates augmentation by intra-articular injection on acute osteochondral defects in a rabbit model. *Knee* **2018**, *25*, 1181–1191. [[CrossRef](#)]
141. Latief, N.; Raza, F.A.; Bhatti, F.; Tarar, M.N.; Khan, S.N.; Riazuddin, S. Adipose stem cells differentiated chondrocytes regenerate damaged cartilage in rat model of osteoarthritis. *Cell Biol. Int.* **2016**, *40*, 579–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Feng, C.; Luo, X.; He, N.; Xia, H.; Lv, X.; Zhang, X.; Li, D.; Wang, F.; He, J.; Zhang, L.; et al. Efficacy and Persistence of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Hyaluronic Acid in Osteoarthritis After Intra-articular Injection in a Sheep Model. *Tissue Eng. Part A* **2018**, *24*, 219–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Vilar, J.M.; Batista, M.; Morales, M.; Santana, A.; Cuervo, B.; Rubio, M.; Cugat, R.; Sopena, J.; Carrillo, J.M. 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 Vet. Res.* **2014**, *10*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Olsen, A.; Johnson, V.; Webb, T.; Santangelo, K.S.; Dow, S.; Duerr, F.M. Evaluation of Intravenously Delivered Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Elbow Osteoarthritis in Dogs: A Pilot Study. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* **2019**, *32*, 173–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Jo, C.H.; Lee, Y.G.; Shin, W.H.; Kim, H.; Chai, J.W.; Jeong, E.C.; Kim, J.E.; Shim, H.; Shin, J.S.; Shin, I.S.; et al. Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial. *Stem Cells* **2014**, *32*, 1254–1266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Hyunchul, C.; Chai, J.W.; Jeong, E.C.; Oh, S.; Shin, J.S.; Shim, H.; Yoon, K.S. Intra-articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee A 2-Year Follow-up Study. *Am. J. Sports Med.* **2017**, *45*, 2774–2783. [[CrossRef](#)]
147. Pers, Y.; Rackwitz, L.; Ferreira, R.; Pullig, O.; Delfour, C.; Barry, E.; Sensebe, L.; Casteilla, L.; Fleury, S.; Bourin, P.; et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl. Med.* **2016**, *5*, 847–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Song, Y.; Du, H.; Dai, C.; Zhang, L.; Li, S.; Hunter, D.J.; Lu, L.; Bao, C. Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: A pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regen. Med.* **2018**, *13*, 295–307. [[CrossRef](#)]

149. Panni, A.S.; Vasso, M.; Braile, A.; Toro, G.; De Cicco, A.; Viggiano, D.; Lepore, F. Preliminary results of autologous adipose-derived stem cells in early knee osteoarthritis: Identification of a subpopulation with greater response. *Int. Orthop.* **2019**, *43*, 7–13. [CrossRef]
150. Freitag, J.; Ford, J.; Bates, D.; Boyd, R.; Hahne, A.; Wang, Y.; Cicuttini, F.M.; Huguenin, L.; Norsworthy, C.; Shah, K. Adipose derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of isolated knee chondral lesions: Design of a randomised controlled pilot study comparing arthroscopic microfracture versus arthroscopic microfracture combined with postoperative mesenchymal stem cell injections. *BMJ Open* **2015**, *5*, e009332. [CrossRef]
151. Freitag, J.; Li, D.; Wickham, J.; Shah, K.; Tenen, A. Effect of autologous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of a post-traumatic chondral defect of the knee. *BMJ Case Rep.* **2017**, *2017*. [CrossRef] [PubMed]
152. Freitag, J.; Shah, K.; Wickham, J.; Boyd, R.; Tenen, A. The effect of autologous adipose derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of a large osteochondral defect of the knee following unsuccessful surgical intervention of osteochondritis dissecans—A case study. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2017**, *18*, 298. [CrossRef] [PubMed]
153. Pak, J.; Lee, J.H.; Park, K.S.; Jeon, J.H.; Lee, S.H. Potential use of mesenchymal stem cells in human meniscal repair: Current insights. *Open Access J. Sports Med.* **2017**, *8*, 33–38. [CrossRef] [PubMed]
154. Pak, J.; Chang, J.; Lee, J.H.; Lee, S.H. Safety reporting on implantation of autologous adipose tissue-derived stem cells with platelet-rich plasma into human articular joints. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2013**, *14*, 337. [CrossRef] [PubMed]
155. Pak, J.; Lee, J.H.; Park, K.S.; Park, M.; Kang, L.; Lee, S.H. Current use of autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells for orthopedic applications. *J. Biomed. Sci.* **2017**, *24*, 9. [CrossRef]
156. Pak, J.; Lee, J.H.; Lee, S.H. Regenerative Repair of Damaged Meniscus with Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Biomed Res. Int.* **2014**, 436029. [CrossRef] [PubMed]
157. Sasaki, H.; Rothrauff, B.B.; Alexander, P.G.; Lin, H.; Gottardi, R.; Fu, E.H.; Tuan, R.S. In Vitro Repair of Meniscal Radial Tear with Hydrogels Seeded with Adipose Stem Cells and TGF-beta3. *Am. J. Sports Med.* **2018**, *46*, 2402–2413. [CrossRef] [PubMed]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).