

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento Medicina y Cirugía Animal



**Estudio Clínico Multicéntrico del Efecto de la Aplicación
de Células Mesenquimales de Grasa (CMG), Plasma Rico
en Factores de Crecimiento (PRGF) y la Combinación de
Ambos en el Tratamiento de la Enfermedad Degenerativa
Articular en Perro**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Belén Cuervo Serrato

VALENCIA
2015

Agradecimientos

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.

Agradecimientos

Quiero agradecer esta tesis doctoral a todas las personas que han contribuido y me han ayudado de un modo u otro, a iniciar, desarrollar y finalizar este apasionante proyecto.

A mis directores de tesis, Mónica Rubio “Moni” porque te has convertido en alguien imprescindible en mi vida, esa persona que siempre ve una salida cuando más me hace falta, mi apoyo, mi amiga, porque aún nos queda mucho por vivir juntas, y espero estar a tu lado en esta nueva etapa tan especial que está por llegar, porque te quiero, por “garbancito”. A José M^a Carrillo “Chema” porque gracias a ti he conseguido muchas de las metas de mi vida, “mi mentor”, mi amigo, porque solo tú puedes sacarme siempre una sonrisa y hacerme ver que todo sueño puede hacerse realidad. A Joaquín Sopena, por tu forma de ser, por hacernos ver a todos lo bonita que es nuestra profesión, por saber transmitir esa pasión que sientes por la veterinaria, y por estar siempre para ayudar a los demás.

A la Fundación García-Cugat porque me habéis demostrado que además de profesionales, sois unas bellísimas personas. Muchas gracias por confiar en mí, especialmente Ramón Cugat y Montse García, os voy a estar eternamente agradecida.

A todo el equipo de las Facultades de Córdoba, Murcia, y las Palmas de Gran Canaria, así como a los compañeros de la Clínica Veterinaria Gramenet y de la Clínica Veterinaria Sagrada Familia, porque sin vosotros esta tesis no se podría haber llevado a cabo. Por toda la hospitalidad y compañerismo con los que siempre me habéis recibido. Muchas gracias de corazón.

A los internos, residentes y Veterinarios del Hospital Clínico de la Universidad CEU Cardenal Herrera, porque siempre me habéis ayudado cuando lo necesitaba. Muchas gracias.

A mis padres, porque gracias a vosotros soy quien soy, porque siempre habéis estado orgullosos de mí y me habéis apoyado en todos los proyectos de mi vida. Sin vosotros, sin vuestra insistencia, sin vuestra ayuda, sin vuestro amor no podría haber llegado hasta aquí. Porque os quiero más que nada en este mundo.

A mi hermano Álvaro, ese Peter Pan eterno, esa parte de mí. Por esta vida compartida juntos, por todas las risas y peleas que hemos tenido, porque sé que me quieres tanto como te quiero yo a ti, porque quiero que todo te vaya bien en esta vida. Te quiero.

A mi familia Serrato, o como nosotros decimos “Zerrato”, porque no puede haber mejor familia en el mundo, porque sabéis que os quiero a todos y cada uno de vosotros, sois el regalo más grande que me ha podido dar esta vida.

A mi abuela Olga, porque sé que aun con la distancia que nos separa, siempre me has apoyado y has estado orgullosa de mi. Te quiero abuela.

A las princesas de cuatro patas de la familia, Kora, Naya, Kara y Ciara, y a los que ya nos dejaron Dino y Jerry, por ese amor incondicional que día a día sabéis transmitir, porque siempre estáis ahí, por ser mis compañeros en esta vida.

A Pau, Xaro y Laura, mis tres ángeles de la guarda, esas personas que quiero tener el resto de la vida a mi lado, porque siempre habéis estado para ayudarme, apoyarme y animarme. Me habéis hecho ver que la familia no tiene por que tener tu misma sangre. Solo puedo deciros que os quiero, que gracias por estar a mi lado, y que nunca os separéis de mí.

A mis titis, Lorena, Ángela y M^aCarmen, mis amigas de toda la vida, esas locas y grandes personas. Quiero daros las gracias por todos estos años juntas, por todo lo que hemos compartido y nos queda aún por compartir, por todo lo que hemos aprendido en esta vida, siempre juntas, siempre unidas. Os quiero con todo mi corazón titis.

A Borja, “mi borxi”, mi amigo de la infancia, aquel que toda la vida ha estado a mi lado, porque sabes que te quiero, y que pase el tiempo que pase siempre vamos a estar juntos.

A Pablo, ese amigo que solo ve mi lado bueno, ese que me hace ver lo afortunada que soy, el que sabe siempre qué decirme y cómo decírmelo. Porque sé que siempre vas a estar conmigo, porque eres una gran persona.

A todos esos locos del Attilio, en especial a mis amigos de clase, mis amigos de la infancia, mi “cuadrilla”. Porque por mucho que pase el tiempo, cuando nos juntamos todo vuelve a ser como antes, solo vosotros sabéis hacer que el tiempo se pare.

A mis amig@s de la carrera, porque junt@s hemos descubierto nuestra vocación, hemos compartido nuestros primeros exámenes, nuestras primeras notas, nuestras primeras recuperaciones, incluso nuestro primer trabajo. Siempre junt@s, siempre con esa alegría y buen humor que nos caracteriza. Tan lejos y tan cerca a la vez.

A todos aquellos que habéis pasado por mi vida y me habéis ayudado a ser feliz

Muchas gracias

Índices

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.

Índice de Contenido

INTRODUCCIÓN	1
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	1
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	3
OBJETIVOS	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
ARTICULACIONES.....	9
<i>Definición</i>	9
<i>Tipos de articulaciones</i>	9
Sinartrosis	10
Diartrrosis.....	11
CARTÍLAGO ARTICULAR	17
<i>Composición y estructura</i>	17

Matriz extracelular (MEC)	18
Componente celular	19
Estructura histológica.....	20
<i>Propiedades biomecánicas y metabolismo del cartílago articular</i>	21
ARTROSIS	23
<i>Definición</i>	23
<i>Clasificación</i>	25
Idiopática.....	25
Secundaria.....	26
<i>Etiopatogenia</i>	26
<i>Mediadores inflamatorios</i>	28
Citocinas.....	29
Eicosanoides: Prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LT)	30
Óxido nítrico (NO)	31
Metaloproteasas (MMP)	31
Adipocinas	32
<i>Diagnóstico</i>	33
Signos clínicos.....	33
Escala subjetiva de control de la OA	35
Métodos de Diagnóstico	36
Estudios cinéticos	43
<i>Tratamiento</i>	43
Tratamientos farmacológicos.....	44
Tratamientos no farmacológicos.....	48
Tratamiento quirúrgico	50
Nuevas terapias regenerativas: implante tisular y celular.....	52
PLASMA RICO EN PLAQUETAS.....	63
<i>Papel de las plaquetas en la reparación tisular</i>	64
Composición de las plaquetas	65
Activación plaquetaria.....	67
<i>Factores de crecimiento</i>	68
Principales factores de crecimiento	69
<i>Plasma rico en plaquetas (PRP) vs. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)</i>	79
Metodología de obtención de los preparados ricos en plaquetas	80
<i>Empleo del PRP en lesiones osteoartrosicas</i>	87
<i>Empleo del PRP en otras disciplinas</i>	92
Cirugía oral y maxilofacial.....	92
Cirugía ortopédica	92
Cirugía plástica	97
Cicatrización de heridas	98

Gastroenterología	99
Sistema nervioso periférico.....	99
Oftalmología	100
<i>Controversia en el uso de PRP</i>	100
CÉLULAS MADRE	103
<i>Clasificación</i>	104
Según su capacidad de diferenciación	104
<i>Mecanismo de acción de las ASC</i>	111
<i>Efecto inmunomodulador de las MSC</i>	113
<i>Fuentes de obtención de MSC</i>	115
Médula ósea.....	115
Cordón umbilical	116
Placenta.....	116
Músculo esquelético	117
Membrana sinovial	118
Tejido adiposo.....	119
<i>Potencial terapéutico de las MSC</i>	120
Trastornos neurológicos.....	120
Enfermedades autoinmunes	122
Cicatrización de heridas	125
Patologías cardíacas.....	125
<i>Uso intravenoso de las MSC</i>	133
<i>Controversia en el uso de las MSC</i>	134
BIOMARCADORES HÚMEDOS	137
<i>Proteína C reactiva</i>	138
CRP en OA	140
<i>Productos de degradación del colágeno</i>	141
PDC en OA	142
<i>Ácido hialurónico</i>	143
HA en OA.....	144
<i>Haptoglobina</i>	146
Hp en OA	147
MATERIAL Y MÉTODOS	149
MATERIAL	151
<i>Modelo animal</i>	152
Criterios de Inclusión.....	152
Criterios de exclusión	154
<i>Equipo</i>	154
<i>Material fungible</i>	155

<i>Soluciones y fármacos</i>	157
<i>Instalaciones</i>	158
MÉTODOS	161
<i>Diseño experimental</i>	161
Grupos de estudio	161
Randomización	162
Controles y evaluaciones	166
<i>Tratamientos aplicados</i>	167
Células madre	167
PRGF	173
<i>Aplicación del tratamiento</i>	175
Preparación del paciente para obtención del PRGF, y para la infiltración intraarticular de cada tratamiento.	175
Infiltración articular	176
<i>Variables a evaluar</i>	176
Escala Bioarth®	176
Cuestionario de satisfacción del propietario ante el tratamiento	184
Escala Analógica Visual (VAS)	184
Valoración de la seguridad de los tratamientos	185
Necesidad de Analgesia de Rescate	185
Plataforma de fuerza	186
Obtención de suero para el estudio de biomarcadores	187
Análisis de biomarcadores	187
<i>Estudio estadístico</i>	187
Factor tiempo	188
Factor Tratamiento	188
Análisis estadístico del estudio in vitro de las células madre	189
Análisis estadístico de la plataforma de fuerza	189
RESULTADOS	191
RESULTADOS	193
<i>Descripción de los pacientes</i>	193
Exclusión de los pacientes	193
Edad de los animales	194
ESTUDIO DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE	197
<i>Resultados de la caracterización de las CMG</i>	197
<i>Influencia del PRGF en el crecimiento de las CMG</i>	199
ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DEL FACTOR TIEMPO GRUPO CMG	203
<i>Peso</i>	203
<i>Estudio del grado de artrosis mediante la escala de Bioarth</i>	205

Evaluación Radiológica.....	205
Limitación funcional.....	207
Movilidad articular.....	208
Atrofia muscular.....	210
Rango de movilidad.....	211
<i>Evaluación del dolor.....</i>	<i>213</i>
Propietario.....	213
Veterinario.....	213
VAS propietario.....	213
VAS veterinario.....	214
<i>Valoración de la satisfacción del propietario.....</i>	<i>215</i>
Primera pregunta.....	216
Segunda pregunta.....	217
Tercera pregunta.....	218
Cuarta pregunta.....	220
Quinta pregunta.....	221
Sexta pregunta.....	222
<i>Analgesia de rescate.....</i>	<i>223</i>
ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DEL FACTOR TIEMPO GRUPO CMG+PRGF.....	225
<i>Peso.....</i>	<i>225</i>
<i>Estudio del grado de artrosis mediante la escala de Bioarth.....</i>	<i>227</i>
Evaluación Radiológica.....	227
Limitación funcional.....	228
Movilidad articular.....	230
Atrofia Muscular.....	231
Rango de movilidad.....	233
<i>Evaluación del dolor.....</i>	<i>234</i>
Propietario.....	234
Veterinario.....	235
VAS propietario.....	235
VAS veterinario.....	236
<i>Valoración de la satisfacción del propietario.....</i>	<i>237</i>
Primera pregunta.....	237
Segunda pregunta.....	238
Tercera pregunta.....	240
Cuarta pregunta.....	241
Quinta pregunta.....	242
Sexta pregunta.....	243
<i>Analgesia de rescate.....</i>	<i>245</i>
ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DEL FACTOR TIEMPO GRUPO PRGF.....	247

<i>Peso</i>	247
<i>Estudio del grado de artrosis mediante la escala de Bioarth</i>	249
Evaluación Radiológica	249
Limitación funcional	250
Movilidad articular	252
Atrofia muscular	253
Rango de movilidad	255
<i>Evaluación del dolor</i>	256
Propietario	256
Veterinario	256
VAS propietario	256
VAS veterinario.....	257
<i>Valoración de la satisfacción del propietario</i>	258
Primera pregunta	259
Segunda pregunta	260
Tercera pregunta.....	261
Cuarta pregunta	262
Quinta pregunta	264
Sexta pregunta	265
<i>Analgesia de rescate</i>	266
ESTUDIO COMPARATIVO DEL FACTOR TRATAMIENTO	269
<i>Peso</i>	269
<i>Estudio del grado de artrosis mediante la escala Bioarth</i>	271
Evaluación Radiológica	271
Limitación funcional	272
Movilidad articular	274
Atrofia muscular	278
Rango de movilidad.....	280
<i>Evaluación del dolor</i>	281
VAS propietario	282
VAS veterinario.....	283
<i>Valoración de la satisfacción del propietario</i>	285
Primera pregunta	285
Segunda pregunta	286
Tercera pregunta.....	287
Cuarta pregunta	287
Quinta pregunta	288
Sexta pregunta	289
<i>Analgesia de rescate</i>	290
ESTUDIO DE LOS BIOMARCADORES	293

<i>Estudio del Factor Tiempo</i>	293
Grupo CMG	294
Grupo CMG+PRGF	296
Grupo PRGF.....	299
<i>Estudio del Factor Tratamiento</i>	302
C2C.....	302
Ácido Hialurónico (HA).....	304
ESTUDIO DE LA PLATAFORMA DE FUERZA	307
<i>Población</i>	308
Análisis de PVF	308
Análisis de IV	309
DISCUSIÓN	311
ENFERMEDAD DEGENERATIVA ARTICULAR	313
EVALUACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	315
USO DE CMG.....	319
USO DE PRGF	323
COMBINACIÓN MSC Y PRP	329
VARIABLES DEL ESTUDIO	333
<i>Escala Bioarth</i>	334
<i>VAS y cuestionario de la satisfacción del propietario</i>	336
PLATAFORMA DE FUERZA	341
BIOMARCADORES	345
VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS DIVERSOS TRATAMIENTOS	349
LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	351
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	353
CONCLUSIONES	355
CONCLUSIONES.....	357
RESUMEN	359
RESUMEN	361
SUMMARY.....	365
SUMMARY	367
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	371
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	373
BIBLIOGRAFÍA.....	375

Índice de Tablas

TABLA 1: MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE PRP. (*) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS A LO LARGO DEL TEXTO	87
TABLA 2: PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS, SEROLÓGICOS, Y ENDOCRINOS MEDIDOS EN EL PACIENTE PARA VALORAR SU ESTADO DE SALUD	153
TABLA 3: DATOS INICIALES DE LOS ANIMALES INCLUIDOS EN EL GRUPO CMG DEL ESTUDIO	163
TABLA 4: DATOS INICIALES DE LOS ANIMALES INCLUIDOS EN EL GRUPO CMG+PRGF DEL ESTUDIO	164
TABLA 5: DATOS INICIALES DE LOS ANIMALES INCLUIDOS EN EL GRUPO PRGF DEL ESTUDIO	165
TABLA 6: DISTRIBUCIÓN POR GRUPOS DE LAS VARIABLES SEXO, EDAD, PESO Y ESTADO REPRODUCTIVO	165
TABLA 7: CUESTIONARIO SOBRE SATISFACCIÓN ANTE EL TRATAMIENTO	184
TABLA 8: EDAD AL INICIO DEL ESTUDIO DE LOS PACIENTES MEDIDA EN MESES PARA LOS 3 GRUPOS DE ESTUDIO.	195
TABLA 9: EVALUACIÓN DEL PESO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	204
TABLA 10: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR PESO EN EL GRUPO CMG	204

TABLA 11: EVALUACIÓN RADIOLÓGICA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	206
TABLA 12: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL GRADO DE ARTROSIS EN EL GRUPO CMG	206
TABLA 13: EVALUACIÓN DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	207
TABLA 14: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL EN EL GRUPO CMG	207
TABLA 15: EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD ARTICULAR EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	209
TABLA 16: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA MOVILIDAD ARTICULAR EN EL GRUPO CMG.....	209
TABLA 17: EVALUACIÓN DEL PERÍMETRO DE LA MASA MUSCULAR EN CENTÍMETROS EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	210
TABLA 18: VALORACIÓN DE LA ATROFIA MUSCULAR DE FORMA CATEGÓRICA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG EN TODOS LOS TIEMPOS DE EVALUACIÓN	210
TABLA 19: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA EVOLUCIÓN DEL PERÍMETRO DE MASA MUSCULAR EN CENTÍMETROS EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG.	211
TABLA 20: EVALUACIÓN DEL RANGO DE MOVILIDAD ARTICULAR EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	212
TABLA 21: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL RANGO DE MOVILIDAD EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	212
TABLA 22: EVALUACIÓN DE LA VAS POR PARTE DEL PROPIETARIO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG.....	213
TABLA 23: EVALUACIÓN DE LA VAS POR PARTE DEL VETERINARIO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG.....	213
TABLA 24: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA VAS EVALUADA POR PARTE DEL PROPIETARIO EN EL GRUPO CMG	214
TABLA 25: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA VAS EVALUADA POR PARTE DEL VETERINARIO EN EL GRUPO CMG	215
TABLA 26: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA COJERA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	216
TABLA 27: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA COJERA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	216
TABLA 28: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA EFICACIA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG.....	217
TABLA 29: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA EFICACIA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	218
TABLA 30: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG.....	219
TABLA 31: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	219
TABLA 32: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE GRADO DE COJERA ACTUAL DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG.....	220

TABLA 33: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE GRADO DE COJERA ACUTAL DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG ...	220
TABLA 34: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS QUE HASTA ESE MOMENTO HAN LLEVADO LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	221
TABLA 35: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS QUE HASTA ESE MOMENTO HAN LLEVADO LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	221
TABLA 36: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA CALIDAD DE VIDA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	222
TABLA 37: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE CALIDAD DE VIDA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	223
TABLA 38: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA ANALGESIA DE RESCATE EN EL GRUPO CMG	224
TABLA 39: EVALUACIÓN DEL PESO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	226
TABLA 40: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR PESO EN EL GRUPO CMG+PRGF	226
TABLA 41: EVALUACIÓN RADIOLÓGICA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	227
TABLA 42: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL GRADO DE ARTROSIS EN EL GRUPO CMG+PRGF	228
TABLA 43: EVALUACIÓN DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	229
TABLA 44: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL EN EL GRUPO CMG+PRGF	229
TABLA 45: EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD ARTICULAR EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	230
TABLA 46: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA MOVILIDAD ARTICULAR EN EL GRUPO CMG+PRGF	230
TABLA 47: EVALUACIÓN DEL PERÍMETRO DE LA MASA MUSCULAR EN CENTÍMETROS EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	231
TABLA 48: VALORACIÓN DE LA ATROFIA MUSCULAR DE FORMA CATEGÓRICA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF EN TODOS LOS TIEMPOS DE EVALUACIÓN	232
TABLA 49: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA EVOLUCIÓN DEL PERÍMETRO DE MASA MUSCULAR EN CENTÍMETROS EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	232
TABLA 50: EVALUACIÓN DEL RANGO DE MOVILIDAD ARTICULAR EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	233
TABLA 51: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL RANGO DE MOVILIDAD EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	233
TABLA 52: EVALUACIÓN DE LA VAS POR PARTE DEL PROPIETARIO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF ..	234
TABLA 53: EVALUACIÓN DE LA VAS POR PARTE DEL VETERINARIO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF ..	235
TABLA 54: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA VAS EVALUADA POR PARTE DEL PROPIETARIO EN EL GRUPO CMG+PRGF	235
TABLA 55: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA VAS EVALUADA POR PARTE DEL VETERINARIO EN EL GRUPO CMG+PRGF	236

TABLA 56: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA COJERA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	237
TABLA 57: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA COJERA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF.....	237
TABLA 58: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA EFICACIA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	239
TABLA 59: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA EFICACIA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF.....	239
TABLA 60: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	240
TABLA 61: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF.....	240
TABLA 62: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE GRADO DE COJERA ACTUAL DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	241
TABLA 63: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE GRADO DE COJERA ACTUAL DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF.....	241
TABLA 64: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS QUE HASTA ESE MOMENTO HAN LLEVADO LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	242
TABLA 65: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS QUE HASTA ESE MOMENTO HAN LLEVADO LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF.....	243
TABLA 66: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA CALIDAD DE VIDA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	244
TABLA 67: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE CALIDAD DE VIDA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF.....	244
TABLA 68: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA ANALGESIA DE RESCATE EN EL GRUPO CMG+PRGF.....	245
TABLA 69: EVALUACIÓN DEL PESO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	248
TABLA 70: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR PESO EN EL GRUPO PRGF	248
TABLA 71: EVALUACIÓN RADIOLÓGICA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	249
TABLA 72: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL GRADO DE ARTROSIS EN EL GRUPO PRGF.....	250
TABLA 73: EVALUACIÓN DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	251
TABLA 74: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL EN EL GRUPO PRGF.....	251
TABLA 75: EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD ARTICULAR EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	252
TABLA 76: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA MOVILIDAD ARTICULAR EN EL GRUPO PRGF	252
TABLA 77: EVALUACIÓN DEL PERÍMETRO DE LA MASA MUSCULAR EN CENTÍMETROS EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	253

TABLA 78: VALORACIÓN DE LA ATROFIA MUSCULAR DE FORMA CATEGÓRICA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF EN TODOS LOS TIEMPOS DE EVALUACIÓN.....	254
TABLA 79: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA EVOLUCIÓN DEL PERÍMETRO DE MASA MUSCULAR EN CENTÍMETROS EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	254
TABLA 80: EVALUACIÓN DEL RANGO DE MOVILIDAD ARTICULAR EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	255
TABLA 81: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL RANGO DE MOVILIDAD EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	255
TABLA 82: EVALUACIÓN DE LA VAS POR PARTE DEL PROPIETARIO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	256
TABLA 83: EVALUACIÓN DE LA VAS POR PARTE DEL VETERINARIO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	256
TABLA 84: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA VAS EVALUADA POR PARTE DEL PROPIETARIO EN EL GRUPO PRGF.....	257
TABLA 85: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA VAS EVALUADA POR PARTE DEL VETERINARIO EN EL GRUPO PRGF.....	258
TABLA 86: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA COJERA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	259
TABLA 87: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA COJERA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	259
TABLA 88: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA EFICACIA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	260
TABLA 89: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA EFICACIA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	260
TABLA 90: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	261
TABLA 91: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	262
TABLA 92: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE GRADO DE COJERA ACTUAL DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	263
TABLA 93: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE GRADO DE COJERA ACTUAL DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	263
TABLA 94: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS QUE HASTA ESE MOMENTO HAN LLEVADO LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	264
TABLA 95: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS QUE HASTA ESE MOMENTO HAN LLEVADO LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	264
TABLA 96: RESPUESTA DE LOS PROPIETARIOS A LA PREGUNTA SOBRE LA CALIDAD DE VIDA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	265
TABLA 97: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE CALIDAD DE VIDA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	265

TABLA 98: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LA ANALGESIA DE RESCATE EN EL GRUPO PRGF.....	266
TABLA 99: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL PESO DE LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	270
TABLA 100: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL GRADO DE ARTROSIS DE LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO	271
TABLA 101: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL DE LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	273
TABLA 102: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA MOVILIDAD ARTICULAR DE LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	274
TABLA 103: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL GRADO DE FLEXIÓN DE LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO	276
TABLA 104: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL GRADO DE EXTENSIÓN DE LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO	277
TABLA 105: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA ATROFIA MUSCULAR DE LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO	279
TABLA 106: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL RANGO DE MOVILIDAD DE LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	280
TABLA 107: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA VAS DEL PROPIETARIO EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	282
TABLA 108: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA VAS DEL VETERINARIO EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	284
TABLA 109: EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	294
TABLA 110: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) EN EL GRUPO CMG	294
TABLA 111: EVALUACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	295
TABLA 112: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN EL GRUPO CMG.....	296
TABLA 113: EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	297
TABLA 114: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) EN EL GRUPO CMG+PRGF	297
TABLA 115: EVALUACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF.....	298
TABLA 116: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN EL GRUPO CMG+PRGF	298
TABLA 117: EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	299

TABLA 118: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) EN EL GRUPO PRGF	300
TABLA 119: EVALUACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	301
TABLA 120: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN EL GRUPO PRGF	301
TABLA 121: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO	302
TABLA 122: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	304
TABLA 123: MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE PVF Y VI EN RELACIÓN AL PESO CORPORAL (N/N Y N.S/N, RESPECTIVAMENTE) APLICADO SOBRE LA EXTREMIDAD AFECTADA. LOS VALORES REFLEJADOS PERTENECEN A CADA UNA DE LAS REVISIONES REALIZADAS A LOS ANIMALES	308

Índice de Figuras

FIGURA 1: DISCRIMINACIÓN DEL NÚMERO INICIAL DE ANIMALES.	163
FIGURA 2: KIT DE RECOGIDA DE MUESTRAS DOG STEM®	168
FIGURA 3: EXTRACCIÓN DE SANGRE INTRAQUIRÚRGICA PARA EL CULTIVO CELULAR.....	168
FIGURA 4: BIOPSIA TEJIDO ADIPOSO INGUINAL (A); COLOCACIÓN DE MUESTRA EN TUBO CONTENEDOR (B)	169
FIGURA 5: MUESTRAS IDENTIFICADAS PARA CULTIVO CELULAR.....	169
FIGURA 6: CERTIFICADO CALIDAD DE LAS CMG	170
FIGURA 7: EXTRACCIÓN SANGUÍNEA PARA LA PREPARACIÓN DE PRGF (A); COLOCACIÓN EN TUBOS DE CITRATO SÓDICO (B).....	174
FIGURA 8: CENTRIFUGACIÓN MUESTRAS SANGUÍNEAS (A); ASPECTO DEL PLASMA POSTCENTRIFUGADO (B).....	174
FIGURA 9: EXTRACCIÓN DE PRGF EN CABINA DE FLUJO LAMINAR	175
FIGURA 10: MATERIAL NECESARIO PARA LA ACTIVACIÓN DEL PRGF	175
FIGURA 11: INFILTRACIÓN INTRAARTICULAR A NIVEL DE LA RODILLA EN UNO DE LOS PACIENTES	176
FIGURA 12: ESCALA BIOARTH. ESCALA FUNCIONAL DEL CODO.....	181

FIGURA 13: ESCALA BIOARTH. ESCALA FUNCIONAL DE LA RODILLA.....182

FIGURA 14: ESCALA BIOARTH. ESCALA FUNCIONAL DE LA CADERA183

FIGURA 15: PANELES SUPERIORES: MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE CMG CULTIVADAS EN CONDICIONES ADHERENTES EN P1-3.....198

FIGURA 16: PRGF UTILIZADO INDUCIR LA PROLIFERACIÓN DE LAS CMG. (A) MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES DE LAS CMG CON EVIDENCIA DE UN AUMENTO DE LA DENSIDAD DE LAS CÉLULAS EN PRESENCIA DEL PRGF (1%, 5% O 10%) A DOSIS DEPENDIENTE DE PRGF (A-E: CÉLULAS NO FIJADAS Y NO TEÑIDAS; E -F: CÉLULAS FIJADAS Y TEÑIDAS CON GIEMSA)200

Índice de Gráficas

GRÁFICA 1. CÉLULAS CANINAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (CMG). CITOMETRÍA DE FLUJO CON ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DE CMG POSITIVA A CD90 EN LOS PASAJES 0 (ANTES DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES), Y LOS PASAJES 3 Y 5 (EN LAS CONDICIONES ADHERENTES). * P <0,05;	198
GRÁFICA 2: CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CMG CUANTIFICADA A PARTIR DE CINCO MUESTRAS INDEPENDIENTES EN P1-3 Y LOS VALORES SE EXPRESARON COMO MEDIA \pm DE * P <0,05.....	199
GRÁFICA 3: CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LAS CMG EN PRESENCIA O AUSENCIA DEL PRGF (0, 1, 5 O 10%) DURANTE 24 HORAS, * P <0,05 VS 0% PRGF. SE REPRESENTA LA MEDIA \pm S.D. DE TRES EXPERIMENTOS DIFERENTES.	200
GRÁFICA 4: PCR SEMICUANTITATIVA DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA AUTORRENOVACIÓN DE CMG TRATADAS O NO CON PRGF (5%).	201
GRÁFICA 5: CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LAS CMG EN PRESENCIA O AUSENCIA DEL 1% PRGF DURANTE 24 HORAS, CON O SIN FBS (10%) EN EL MEDIO DE CRECIMIENTO. * P <0.05 VS 0% SCLP. SE REPRESENTA LA MEDIA \pm S.D. DE TRES EXPERIMENTOS DIFERENTES.	201
GRÁFICA 6: EVOLUCIÓN DEL PESO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG EN EL TIEMPO.....	205

GRÁFICA 7: EVOLUCIÓN DEL GRADO DE ARTROSIS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG EN EL TIEMPO	206
GRÁFICA 8: EVOLUCIÓN DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG EN EL TIEMPO	208
GRÁFICA 9: EVOLUCIÓN DE LA MOVILIDAD ARTICULAR DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG EN EL TIEMPO	209
GRÁFICA 10: EVOLUCIÓN DEL PERÍMETRO DE LA MASA MUSCULAR EN CENTÍMETROS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG EN EL TIEMPO.....	211
GRÁFICA 11: EVOLUCIÓN DEL RANGO DE MOVILIDAD DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG EN EL TIEMPO	212
GRÁFICA 12: EVOLUCIÓN DE LA EVALUACIÓN DEL DOLOR (VAS) POR PARTE DEL PROPIETARIO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG EN EL TIEMPO.....	214
GRÁFICA 13: EVOLUCIÓN DE LA EVALUACIÓN DEL DOLOR (VAS) POR PARTE DEL VETERINARIO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG EN EL TIEMPO.....	215
GRÁFICA 14: EVOLUCIÓN DE LA COJERA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	217
GRÁFICA 15: EFICACIA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG.....	218
GRÁFICA 16: RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG.....	219
GRÁFICA 17: GRADO DE COJERA ACTUAL EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG.....	220
GRÁFICA 18: EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS RECIBIDOS HASTA EL MOMENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	222
GRÁFICA 19: CALIDAD DE VIDA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	223
GRÁFICA 20: EVOLUCIÓN DE LA ANALGESIA DE RESCATE DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG EN EL TIEMPO ...	224
GRÁFICA 21: EVOLUCIÓN DEL PESO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF EN EL TIEMPO	227
GRÁFICA 22: EVOLUCIÓN DEL GRADO DE ARTROSIS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF EN EL TIEMPO ..	228
GRÁFICA 23: EVOLUCIÓN DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF EN EL TIEMPO	229
GRÁFICA 24: EVOLUCIÓN DE LA MOVILIDAD ARTICULAR DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF EN EL TIEMPO	231
GRÁFICA 25: EVOLUCIÓN DEL PERÍMETRO DE LA MASA MUSCULAR EN CENTÍMETROS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF EN EL TIEMPO	232
GRÁFICA 26: EVOLUCIÓN DEL RANGO DE MOVILIDAD DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF EN EL TIEMPO	234
GRÁFICA 27: EVOLUCIÓN DE LA EVALUACIÓN DEL DOLOR (VAS) POR PARTE DEL PROPIETARIO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF EN EL TIEMPO	235
GRÁFICA 28: EVOLUCIÓN DE LA EVALUACIÓN DEL DOLOR (VAS) POR PARTE DEL VETERINARIO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF EN EL TIEMPO	236
GRÁFICA 29: EVOLUCIÓN DE LA COJERA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF.....	238

GRÁFICA 30: EFICACIA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	239
GRÁFICA 31: RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	240
GRÁFICA 32: GRADO DE COJERA ACTUAL EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	242
GRÁFICA 33: EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS RECIBIDOS HASTA EL MOMENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	243
GRÁFICA 34: CALIDAD DE VIDA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	244
GRÁFICA 35: EVOLUCIÓN DE LA ANALGESIA DE RESCATE DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF EN EL TIEMPO	245
GRÁFICA 36: EVOLUCIÓN DEL PESO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO	249
GRÁFICA 37: EVOLUCIÓN DEL GRADO DE ARTROSIS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO.....	250
GRÁFICA 38: EVOLUCIÓN DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO..	251
GRÁFICA 39: EVOLUCIÓN DE LA MOVILIDAD ARTICULAR DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO ...	253
GRÁFICA 40: EVOLUCIÓN DEL PERÍMETRO DE LA MASA MUSCULAR EN CENTÍMETROS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO	254
GRÁFICA 41: EVOLUCIÓN DEL RANGO DE MOVILIDAD DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO	255
GRÁFICA 42: EVOLUCIÓN DE LA EVALUACIÓN DEL DOLOR (VAS) POR PARTE DEL PROPIETARIO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO	257
GRÁFICA 43: EVOLUCIÓN DE LA EVALUACIÓN DEL DOLOR (VAS) POR PARTE DEL VETERINARIO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO	258
GRÁFICA 44: EVOLUCIÓN DE LA COJERA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	259
GRÁFICA 45: EFICACIA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	261
GRÁFICA 46: RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	262
GRÁFICA 47: GRADO DE COJERA ACTUAL EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	263
GRÁFICA 48: EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS RECIBIDOS HASTA EL MOMENTO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	264
GRÁFICA 49: CALIDAD DE VIDA EN LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF	266
GRÁFICA 50: EVOLUCIÓN DE LA ANALGESIA DE RESCATE DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO...	267
GRÁFICA 51: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL PESO EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	270
GRÁFICA 52: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL GRADO DE ARTROSIS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES).....	272
GRÁFICA 53: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA LIMITACIÓN FUNCIONAL EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES).....	273

GRÁFICA 54: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA MOVILIDAD ARTICULAR EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	275
GRÁFICA 55: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL GRADO DE FLEXIÓN EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	276
GRÁFICA 56: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL GRADO DE EXTENSIÓN EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	278
GRÁFICA 57: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA ATROFIA MUSCULAR EN CENTÍMETROS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	279
GRÁFICA 58: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL RANGO DE MOVILIDAD EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	281
GRÁFICA 59: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA VAS DEL PROPIETARIO EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	283
GRÁFICA 60: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA VAS DEL VETERINARIO EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	284
GRÁFICA 61: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA PREGUNTA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA COJERA EN LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES).....	285
GRÁFICA 62: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA PREGUNTA SOBRE LA EFICACIA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES).....	286
GRÁFICA 63: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA PREGUNTA SOBRE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES).....	287
GRÁFICA 64: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA PREGUNTA SOBRE GRADO DE COJERA ACTUAL DE LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES).....	288
GRÁFICA 65: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA PREGUNTA SOBRE LA EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS QUE HASTA ESE MOMENTO HAN LLEVADO LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES).....	289
GRÁFICA 66: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA PREGUNTA SOBRE LA CALIDAD DE VIDA EN LOS PACIENTES EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	290
GRÁFICA 67: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA ANALGESIA DE RESCATE EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	291
GRÁFICA 68: EVOLUCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG	295
GRÁFICA 69: EVOLUCIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG.....	296
GRÁFICA 70: EVOLUCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	297
GRÁFICA 71: EVOLUCIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CMG+PRGF	299

GRÁFICA 72: EVOLUCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	300
GRÁFICA 73: EVOLUCIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO PRGF.....	301
GRÁFICA 74: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO (C2C) EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES)	303
GRÁFICA 75: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO (A: BASAL. B: 1MES. C: 3MESES. D: 6MESES).....	305
GRÁFICA 76: EVOLUCIÓN DEL PICO DE FUERZA VERTICAL (PVF) EN EL TIEMPO	309
GRÁFICA 77: EVOLUCIÓN DEL IMPULSO VERTICAL (IV) EN EL TIEMPO	310

Listado abreviaturas

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.

Listado de abreviaturas

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

- ACP: Plasma autólogo acondicionado
- AINES: Antiinflamatorios no Esteroideos
- ALP: fosfatasa alcalina
- ALT: Alanino Aminotransferasa
- AST: Aspartato Aminotransferasa
- C2C: Collagen type II cleavage
- CaCl₂: Cloruro Cálculo
- CBX: Celecoxib
- CK: Creatinina-Cinasa
- CM: Células Mesenquimales
- CMA: Células Mesenquimales Adultas
- CMG: Células Mesenquimales de Grasa
- Coll-II: Colágeno tipo II

- COMP: Proteína Oligomérica de la Matriz
- COX: Ciclooxygenasa
- CTGF: Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium
- EDA: Enfermedad Degenerativa Articular
- ESC: Células Madre Embrionarias
- FARME: Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad
- FBS: Suero bovino fetal
- FDA: Food and Drug Administration
- FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico
- GGT: Gama Glutamil Transpeptidasa
- H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno
- HA: Ácido Hialurónico
- HGF: Factor de Crecimiento Hepatocítico
- HP: Haptoglobina
- HPPP: Plasma Pobre en Plaquetas Humano
- HS: Hueso Subcondral
- Ig: Inmunoglobulinas
- IGF: Factor de Crecimiento Insulínico
- IL: Interleucinas
- iNOS: Enzima Inducible Óxido Nítrico sintetasa
- IV: Impulso Vertical
- KOOS: Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score
- KS: Keratan Sulfato
- KW: Kruskal Wallis
- LIF: Factor Inhibidor de Leucocitos
- LT: Leucotrienos
- MCH: Hemoglobina Corpuscular Media
- MCHC: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
- MCV: Volumen Corpuscular Medio
- MEC: Matriz Extracelular
- MMP: Metaloproteasas
- MPO: Mieloperoxidasa
- NGF: Factor de Crecimiento Neurotrófico

- NO: Óxido Nítrico
- NO₂⁻: Nitritos
- NO₃⁻: Nitratos
- O₂: Oxígeno Molecular
- OA: Osteoartritis
- OF: Osteofitos
- OT: Osteotomía tibial
- PCR: Proteína C Reactiva
- PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
- PF: Factor Plaquetario
- PG: Prostaglandinas
- PGE₂: Prostaglandina E₂
- PHBP: Proteína de Unión al Ácido Hialurónico de Plasma
- PMN: Neutrófilos polimorfonucleares
- PPGF: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento
- PPP: Plasma Pobre en Plaquetas
- PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento
- PRP: Plasma Rico en Plaquetas
- PVF: Pico de Fuerza Vertical
- PZP: Proteína de la Zona de Embarazo
- RM: Resonancia Magnética
- RPM: Revoluciones por minuto
- SF: Short Form
- TACE: Enzima Conversora de TNF- α
- TC: Tomografía Computerizada
- TIMP: Inhibidores de tejido de MMP
- TNF: Factor de Necrosis Tumoral
- TRAP: Fosfatasa Ácida Resistente al Tartrato
- VAS: Escala Analógica Visual
- VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
- WADA: World antidoping agency
- WOMAC: The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index
- YLK-40: Proteína de Quitinasa 3 like 1

Introducción

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.

Introducción

La osteoartrosis (OA) es una patología degenerativa del cartílago articular muy frecuente tanto en medicina humana (Hunter, 2011) como en medicina veterinaria (Rychel, 2010, Malek et al., 2012). Se trata de una enfermedad incapacitante que se caracteriza por un daño progresivo en el cartílago articular con afectación del hueso subcondral, formación de osteofitos, engrosamiento de la cápsula articular y sinovitis (Juni et al., 2006), causando molestia y dolor en la articulación afectada, dando lugar en muchas ocasiones, como resultado del fracaso de los enfoques farmacológicos, a la implantación de una prótesis como método final de devolver la funcionalidad y disminuir el dolor (van der Kraan, 2012).

Esta patología afecta al 15% de la población mundial, y además de tener unos costes colosales (Egloff et al., 2012), provoca un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes (Vaquerizo et al., 2013). Sólo en los EEUU, en el año 2010, la carga financiera se estimó en 81 billones de dólares en costes médicos y 128 billones de dólares en costes totales (Murray et al., 2012).

Dentro de la población afectada por esta patología, los factores de riesgo que predominan son la edad, pertenecer al sexo femenino, la obesidad y haber sufrido un traumatismo previo (Juni et al., 2006), además de otras causas que pueden desencadenar la patología, como carga inadecuada, cambios bioquímicos y antecedentes genéticos (Brew et al., 2000, Goldring, 2012, Goldring et al., 2011, Goldring y Marcu, 2009, Leong et al., 2011a, Leong et al., 2011b).

En la especie canina, esta enfermedad es un desorden común que afecta a perros de distintas edades con una incidencia tan alta que afecta al 20% de la población de los perros adultos y al 80% de los animales geriátricos, siendo la causa más común de cojera en perros mayores de un año (Rialland et al., 2012).

En medicina humana, estimaciones recientes sugieren que la OA de rodilla afecta a aproximadamente 250 millones de personas en el mundo. Solo en EEUU 21 millones de personas padecen limitaciones asociadas con la OA, existiendo 36 millones de consultas ambulatorias, y 750.000 hospitalizaciones por año (Murray et al., 2012).

Aunque el envejecimiento es un factor de riesgo importante, la mayoría de los afectados con artrosis (64 %) están en edad laboral (15-64 años), por lo que el trabajo representa un 11 % de los factores de riesgo (Losina et al., 2013).

En medicina veterinaria, las articulaciones más afectadas por esta enfermedad son el codo, la cadera y la rodilla (Malek et al., 2012). En cambio en humana, las articulaciones que más se afectan son las que sostienen el peso del cuerpo, como las caderas, las rodillas y la columna vertebral, además de otras que se ven afectadas por su uso, como las articulaciones de las manos (Camafeita, 2011).

El cartílago articular es un tejido conjuntivo denso, altamente especializado, hipocelular, avascular, alinfático y no innervado. Contiene un bajo porcentaje de células en su composición (5%), y está embebido en una matriz extracelular rica en colágeno, proteoglicanos, otras proteínas distintas al colágeno y agua (Zanasi et al., 2006). Conforme incrementa la edad del individuo, disminuye la densidad y capacidad de división de las células o condrocitos presentes en el cartílago articular, limitando su capacidad de autorenovación (Diekman y Guilak, 2013). Llega un momento en que esta división es escasa, de manera que el envejecimiento contribuye a la pérdida progresiva de la superficie articular dando lugar al proceso degenerativo del cartílago con disminución de matriz, fibrilación y formación de fisuras, que pueden resultar en un desgaste completo del espesor de la superficie articular (Buckwalter et al., 2005, Mortellaro, 2003).

Un factor importante a tener en cuenta en la valoración y diagnóstico de esta patología, es la falta de correlación existente entre los signos clínicos de la enfermedad, y los signos radiológicos,

ya que en ocasiones podemos encontrar pacientes con un grado de cojera y dolor muy elevados en los cuales prácticamente están ausentes los signos radiológicos. Y a la inversa, pacientes con signos radiológicos muy severos, que no presentan sintomatología (Juni et al., 2006).

Uno de los puntos clave de la investigación sobre la OA es la búsqueda de biomarcadores que cumplan el objetivo de ayudar en la detección temprana de la enfermedad así como en su actividad, evolución y control de los diferentes tratamientos aplicados. Los biomarcadores que se emplean en el diagnóstico de la OA se pueden clasificar en secos o solubles. Los secos incluyen la radiología, ecografía y resonancia magnética. Estos biomarcadores son buenos para evaluar la enfermedad y monitorizar su severidad, aunque no se detectan en las fases tempranas de la patología. Por este motivo se está profundizando en la búsqueda de biomarcadores moleculares que puedan cubrir estas necesidades. La destrucción del cartílago produce productos de la degradación que se acumulan en el líquido sinovial y pasan a sangre, siendo finalmente expulsados del organismo. Los biomarcadores húmedos pueden ser indicadores específicos de la inflamación y degradación y se pueden obtener en diversos fluidos del organismo como orina, suero y líquido sinovial, siendo técnicas más rápidas, sencillas y menos agresivas y que aportan información sobre el progreso de la patología o sobre los cambios metabólicos producidos por los diferentes tratamientos (Ramonda et al., 2013). Actualmente no existe ningún marcador específico validado y útil en el diagnóstico de la OA, aunque se han empleado algunos como los productos de degradación del colágeno, entre ellos unos de los empleados son el neo-epítipo *Collagen type II Cleavage* (C2C) (Poole et al., 2004) y el ácido hialurónico (HA) (Pavelka et al., 2004).

Los productos de degradación del colágeno son biomarcadores que han demostrado ser útiles en la detección de la OA en diversas especies como ratón (Ameye et al., 2007), perro (Matyas et al., 2004, Goranov, 2007), ovejas (Lu et al., 2006) y conejillos de indias (Huebner y Kraus, 2006), además de la especie humana (Poole et al., 2004). El C2C es un biomarcador sensible para evaluar el aumento del catabolismo de colágeno tipo II, además las concentraciones de este biomarcador pueden verse alteradas en las primeras etapas de la degradación del colágeno de tipo II, por lo que es un método útil en el diagnóstico precoz de la patología (Ameye et al., 2007).

El HA es un glicosaminoglicano sintetizado por los condrocitos y fibroblastos sinoviales, que se distribuye ampliamente en todo el organismo, como por ejemplo en cordón umbilical, cartílago nasal, vítreo, cutis o la linfa del tórax entre otros (Archer y Francis-West, 2003). En la articulación, es un componente principal del líquido sinovial y la matriz extracelular del cartílago (Fraser et al., 1997), sirviendo como lubricante y colaborando en la absorción y distribución de las fuerzas

mecánicas, además de inhibir la migración de células inflamatorias entre otras características (Partsch et al., 1989).

Los pacientes que tienen OA en humana presentan niveles elevados de HA en suero, por lo que se considera un buen marcador biológico que refleja el daño del cartílago y la sinovitis en estos pacientes (Garnero et al., 2001, Sasaki et al., 2013). Estudios previos han demostrado su asociación con la presencia, severidad radiográfica, grado de dolor y progresión de la patología, aunque la asociación entre la gravedad de la enfermedad y la elevación de los niveles séricos de HA no está clara del todo hoy en día (Sasaki et al., 2013, Garnero et al., 2001, Hosogane et al., 2012, Inoue et al., 2011, Golightly et al., 2011, Nganvongpanit et al., 2008).

Con todo esto, el diagnóstico precoz es importante, pero una vez desencadenada la enfermedad, la aplicación de las distintas terapias debe ir encaminada a paliar el dolor y la inflamación presentes en la zona afectada a la vez que se intenta frenar el avance de la patología, para incrementar así la calidad de vida de los pacientes (Hunter, 2011).

Entre las modalidades terapéuticas empleadas para el tratamiento de la OA existen diversas terapias quirúrgicas y no quirúrgicas, todas ellas tienen el objetivo de prevenir o al menos retrasar los cambios estructurales y funcionales de esta enfermedad. Entre los tratamientos no quirúrgicos se encuentran las medidas no farmacológicas como reducción de peso, programas de ejercicio de bajo impacto, fisioterapia, laser de baja intensidad, acupuntura y ultrasonidos entre otros (Al Rashoud et al., 2013, Cakir et al., 2013, Fang et al., 2013, Gudbergsen et al., 2012). Respecto a las medidas farmacológicas, destacan los fármacos antiinflamatorios, analgésicos, corticoides, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) y el uso de nutracéuticos como glucosaminoglicanos (Reid et al., 2012, Godley, 2013, Merashly y Uthman, 2012, Allen, 2012).

Los tratamientos quirúrgicos se emplean sobre todo en la corrección de las causas primarias de la artrosis, y entre ellos encontramos artroscopias, reemplazos protésicos, y nuevas terapias avanzadas o regenerativas (Todhunter y Johnston, 2006, Mayr et al., 2013, Murphy y Helmick, 2012).

Dentro de estas terapias avanzadas o regenerativas, encontramos el denominado plasma rico en plaquetas (PRP) y las células mesenquimales (CM). El uso de estas nuevas terapias va encaminado hacia una medicina regenerativa que pretende fomentar los fenómenos regenerativos o reparativos del propio organismo sobre los degenerativos, siendo una nueva alternativa a tratamientos más agresivos (Singh, 2012, Wu et al., 2013, Black et al., 2008, Wu et al., 2007, Wang-Saegusa et al., 2011).

En los últimos años, las CM han generado enormes expectativas y se han convertido en una gran esperanza para el desarrollo de nuevas terapias celulares en el contexto de la medicina regenerativa (Diekman y Guilak, 2013, Fortier y Travis, 2011). Su origen puede ser embriogénico, con gran capacidad de multiplicación y diferenciación en varios linajes celulares, o derivadas de tejidos adultos. Estas últimas, aunque tienen menor capacidad de multiplicación y diferenciación, son inmunocompatibles, y su uso no está restringido por los problemas éticos asociados a las células embrionarias. Además, las células embrionarias han demostrado en algunos estudios un crecimiento incontrolado (Wang-Saegusa et al., 2011, Oldershaw, 2012). En contraposición, las células mesenquimales adultas (CMA), son una buena opción ya que están presentes en multitud de órganos y tejidos como médula ósea, placenta (Timmins et al., 2012), cordón umbilical (Yang et al., 2012), músculo esquelético (Jackson et al., 2011), sinovia (Jones y Pei, 2012), líquido sinovial (Jones et al., 2008), y tejido adiposo entre otros (Black et al., 2008, Yarak y Okamoto, 2010), además, no presentan las complicaciones de las embrionarias (Mizuno et al., 2012).

Hoy en día, existe una cantidad creciente de estudios que utilizan células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMG) en el tratamiento de la artrosis. Estas células además de haber demostrado su capacidad de diferenciarse en condrocitos, osteocitos y adipocitos (Rodríguez-Jiménez F.J et al., 2012), tienen la ventaja de que se pueden obtener en grandes cantidades con escasa morbilidad de la zona donante y con pocas molestias para el paciente. Se ha confirmado que las células madre autólogas presentan afinidad por el tejido lesionado de la articulación, teniendo la capacidad de localizar y participar en la reparación de las estructuras de articulación dañada (Agung et al., 2006).

El tratamiento de la OA con CM, tiene diferentes efectos, entre los que se encuentran una reducción del dolor y la dependencia a los medicamentos, secreción de proteínas con potencial antiinflamatorio, secreción de proteínas minimizadoras de varios marcadores de estrés en las células que las rodean, e instalación de las células en los tejidos de alrededor con generación de nuevo cartílago, lo cual ralentiza la degeneración y favorece la cicatrización intraarticular, mejorando de esta manera el estado general de los pacientes (Black et al., 2007). Recientemente se ha publicado que la terapia de CMG resultó ser un tratamiento adecuado para las articulaciones de la cadera en los perros, ya que producen una mejora de la marcha y la capacidad de vivir una vida con menos limitaciones (Vilar et al., 2013, Vilar et al., 2014, Cuervo et al., 2014).

Uno de los métodos más populares utilizados en los últimos años para mejorar la cicatrización de forma biológica en los campos de la cirugía ortopédica y medicina deportiva incluye el uso de productos sanguíneos autólogos, en particular, PRP (Bubnov et al., 2013). El PRP se define como un producto biológico autólogo, derivado de la sangre del paciente, en el cual tras un proceso de

centrifugación se obtiene una fracción plasmática con una concentración de plaquetas mayor que la existente en sangre circulante (Ahmad et al., 2012, Grageda et al., 2005, Marx, 2004). Puede recibir otros nombres como el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), PRP-gel, gel de plaquetas o plaquetas coágulo (Anitua et al., 2004, Velnar et al., 2009, Anitua et al., 2007a). En circunstancias normales, las plaquetas son el primer tipo celular en llegar al lugar de la lesión del tejido y son particularmente activas en las primeras fases inflamatorias (Park et al., 2012). Las plaquetas contenidas en esa fracción de plasma pueden ser activadas artificialmente para que liberen el contenido del interior de sus gránulos, donde se encuentran diversos factores de crecimiento los cuales poseen múltiples propiedades regenerativas, con actividad específica de neoproliferación y regeneración del cartílago, además de poseer un efecto antiapoptótico en los condroblastos (Anitua, 1999, Marx et al., 1998, Civinini et al., 2013).

Al igual que las células madre, el uso de PRP se ha descrito como un método eficaz y seguro en el tratamiento del dolor y la disfunción articular en la OA. El uso de PRGF, un PRP autólogo caracterizado por la ausencia de leucocitos y citoquinas proinflamatorias y la presencia de una dosis específica de las plaquetas y factores de crecimiento (Anitua et al., 2004), ha demostrado una mejora significativa de la sintomatología de la OA tanto en humanos como en perros (Fahie et al., 2013, Anitua et al., 2014).

Como ya hemos descrito, la eficacia de estas dos terapias para el tratamiento de la OA ya se ha demostrado, sin embargo, en la literatura, no hay estudios que comparen los resultados de estos dos tratamientos, ni los beneficios que se puedan obtener de la combinación de los mismos en esta patología. El objetivo de este estudio fue comparar la eficacia y seguridad en un ensayo clínico aleatorizado de una única inyección intraarticular de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (CMG), una única inyección intraarticular de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), y de la combinación de ambas terapias (PRGF+CMG) como tratamiento de la OA en la especie canina. Así como valorar la eficacia de estas terapias a través de los biomarcadores C2C y HA y determinar las ventajas y desventajas de cada una de ellas.

Hipótesis y Objetivos

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.

Hipótesis de Trabajo

La enfermedad degenerativa articular (EDA) u OA es una patología crónica, progresiva e incapacitante que afecta a un gran número de pacientes, y debido al aumento de la vida media poblacional, cada vez la padecen mayor cantidad de individuos.

En esta patología tiene lugar una degeneración progresiva del cartílago articular. Estos cambios se producen principalmente debido a un desequilibrio entre los procesos de degeneración y reparación de las estructuras del cartílago, causando molestia y dolor en la articulación afectada, disminuyendo así la calidad de vida de los pacientes.

Las terapias empleadas de manera más frecuente para el tratamiento de esta patología, van encaminadas a paliar el dolor e inflamación de la zona afectada, pero la mayoría no frenan el avance de la misma. Por este motivo han surgido en los últimos años las nuevas terapias avanzadas, que fomentan los propios procesos regenerativos y proliferativos del organismo sobre los degenerativos, acelerando así la reparación del tejido afectado.

Por todo esto, nuestra hipótesis de trabajo es que la aplicación de PRGF, CMG, y la asociación de ambos tratamientos en infiltración intraarticular en pacientes con OA, producirá una mejora

de la patología, frenando el avance de la misma, y disminuyendo el dolor e inflamación de la articulación afectada aumentando así la funcionalidad articular, valorando la efectividad de estos tratamiento a través del análisis de biomarcadores en el suero de los pacientes. Por otra parte, creemos que la asociación del PRGF con las CMG incrementará la capacidad de diferenciación de éstas aportándoles una mayor viabilidad y por lo tanto un mayor beneficio clínico a largo plazo en los pacientes.

Objetivos

Con esta hipótesis de trabajo nos planteamos los siguientes objetivos, que han de guiar el desarrollo de la Tesis Doctoral:

- Valorar el efecto que tiene la aplicación de infiltraciones intraarticulares de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF-Endoret®), Células Mesenquimales de Grasa obtenidas por el método estandarizado de Dog-Stem® (CMG), y una combinación de ambos tratamientos en la enfermedad degenerativa articular (EDA). Para ello se empleará un modelo clínico de animales de la especie canina, previamente diagnosticados de osteoartrosis (OA), y en ausencia de otras patologías concomitantes. La valoración del efecto de estas nuevas terapias regenerativas se llevará a cabo mediante:

- Valoración de la progresión radiológica de cada una de las articulaciones afectadas por la patología a través de la escala Bioarth®.
- Evaluación de la limitación funcional que presenta cada uno de los pacientes a lo largo del estudio mediante la escala Bioarth®.
- Determinación de la movilidad articular que presentan los animales en cada una de las revisiones mediante la escala Bioarth®.
- Cuestionario sobre satisfacción de los propietarios ante el tratamiento aplicado a su mascota a lo largo del estudio.
- Análisis de biomarcadores presentes en el suero de los pacientes (C2C y HA) para una determinación objetiva del efecto de cada uno de los tratamientos aplicados en los diversos grupos.
- En los pacientes de las Palmas de Gran Canaria incluidos en el grupo tratado mediante una combinación de CMG+PRGF, se desarrollará un análisis cinético mediante plataforma de fuerza para la determinación objetiva de la efectividad del tratamiento aplicado.
- Para llevar a cabo una determinación de la viabilidad y proliferación celular de las CMG expandidas empleadas en el estudio, se realizará un análisis laboratorial de las mismas en el Centro de Investigación Príncipe Felipe.

Revisión Bibliográfica

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.

Articulaciones

Definición

Anatómicamente, una articulación se define como la unión o medio de contacto de dos o más huesos entre sí además de sus elementos de fijación. La función más importante de las articulaciones es la de constituir los puntos de unión del esqueleto y producir movimientos mecánicos, proporcionando elasticidad y plasticidad al cuerpo, además de ser lugares de crecimiento (Piermattei et al., 2007).

Tipos de articulaciones

Las articulaciones varían en su estructura, disposición y función. La estructura del espacio intraarticular determina de manera significativa la amplitud de movimiento entre las diferentes estructuras óseas o cartilagosas. En base a esto, antiguamente clasificaban las articulaciones en fibrosas o sinartrosis, cartilagosas o anfiartrosis, y sinoviales o diartrosis (Sisson et al., 1982). Estos conceptos se han ido modificando con el tiempo. En la actualidad se

toma como referencia la clasificación de König y Liebich donde podemos diferenciar los siguientes tipos de articulaciones (König y Liebich, 2008):

Sinartrosis

Existe una carencia permanente de espacio. Dependiendo del tejido que rellene la articulación, recibirán el nombre de:

Articulaciones fibrosas

La articulación se encuentra rellena de tejido conjuntivo y presenta poca movilidad. A su vez se subdividen en (König y Liebich, 2008):

- Sindesmosis, presentan una gran cantidad de tejido conectivo, por ejemplo la unión articular entre articulaciones como las metacarpianas o metatarsianas rudimentarias (II y IV) con el III metacarpiano o metatarsiano del caballo.
- Suturas óseas (Suturæ), son las que se encuentran en el cráneo, como la sutura dentada, sutura falsa o plana entre otras.
- Gonfosis (Gomphosis), articulación que se da de la implantación de la raíz del diente en el alveólo mediante tejido conjuntivo denso.

Articulaciones cartilagosas

La articulación se encuentra rellena de tejido cartilaginoso. Tienen una movilidad limitada, que les permite compresión y estiramiento. Según König y Liebich se subdividen en (König y Liebich, 2008):

- Uniones mediante cartílago hialino o sincondrosis (Synchondroses), como la que se da entre la base del cráneo y del hueso hioides.
- Uniones mediante cartílago fibroso o sínfisis (Symphyses), la dada en articulaciones como la sínfisis de la pelvis, o entre los cuerpos vertebrales además de otras.
- Uniones óseas o sínóstosis (Synostoses), por ejemplo entre la articulación que se da entre el radio y el cúbito.

Diartrosis

Articulaciones en las que existe espacio articular, el cual da lugar a un elevado rango de movilidad entre dos piezas esqueléticas contiguas. Este tipo de articulaciones reciben en nombre de (Todhunter y Johnston, 2006):

Articulaciones sinoviales

En estas articulaciones existe un espacio articular ocupado por una sustancia líquida denominada sinovia. Se caracterizan por ser articulaciones de gran movilidad, en las cuales está presente el cartílago articular. La principal función de una articulación sinovial es facilitar los movimientos que tienen lugar de forma fisiológica en este tipo de articulaciones, como movimientos de flexión y extensión, abducción y aducción e incluso de rotación. Estos movimientos son controlados por todos los componentes presentes en las articulaciones (huesos, ligamentos, tendones, cartílago, etc). Otra de las principales funciones es dar soporte al sistema musculoesquelético a la vez que transmite y distribuye las cargas mientras mantiene la fuerza de contacto entre las superficies articulares en niveles adecuados (Todhunter y Johnston, 2006).

La superficie articular del hueso en estas articulaciones está recubierta por cartílago hialino, a su vez, los huesos están unidos por la cápsula articular y los ligamentos. La amplitud de movimiento presente en las articulaciones sinoviales se ve limitada por los músculos, ligamentos, cápsula articular y por la forma que tienen los propios huesos (Piermattei et al., 2007).

Las articulaciones sinoviales se subdividen en (König y Liebich, 2008):

- Según la cantidad de huesos que participen en la articulación:
 - Articulación simple: participan dos huesos (articulación del hombro).
 - Articulación compuesta: participan más de dos huesos (articulación del carpo).
- Según las posibilidades de movimiento:
 - Articulaciones de un solo eje:
 - Gínglimo: parecen una bisagra o polea en la que el eje articular es perpendicular al eje longitudinal del hueso (articulación del menudillo).
 - Articulación trocoidea: articulaciones en las cuales el eje articular es paralelo al eje longitudinal del hueso (articulación atlantoaxial).

- Articulaciones de dos ejes:
 - En forma de silla de montar (articulación interfalángica del carpo).
 - Articulación elipsoidea (articulación atlantooccipital).
- Articulaciones multiaxiales (articulación de la cadera).
 - Anfiartrosis (articulación sacroilíaca).
- Según la forma de las superficies articulares:
 - Forma esferoidea (articulación cadera).
 - Forma elipsoidal (articulación entre el occipital y la primera vértebra cervical).
 - Forma de silla de montar (articulación interfalángica del carpo).
 - Forma condilar (articulación de la rodilla).

Componentes articulación sinovial

Cápsula articular y Membrana sinovial

La cápsula articular está formada por una gruesa porción fibrosa por debajo de la cual encontramos una delgada capa subsinovial o lámina propia que se continua con la membrana sinovial o sinovia. Esta membrana sinovial es la que está en contacto directo con el líquido sinovial, el cual en condiciones normales ocupa el espacio articular (Todhunter y Johnston, 2006).

La lámina propia que encontramos en este estrato fibroso presenta fibrillas las cuales están compuestas principalmente de colágeno tipo IV, aunque también encontramos cantidades más pequeñas de colágeno tipo I, III y V. Otros componentes que forman parte de esta capa subsinovial son los glucosaminoglicanos sulfatados (sulfato de condroitina) y glucoproteínas estructurales (fibronectina, laminina, entactina y tenascina). Su principal función es contribuir a la estabilidad articular y varía en grosor dependiendo de las exigencias mecánicas de cada lugar (Todhunter y Johnston, 2006, König y Liebich, 2008)

En la sinovia o membrana sinovial encontramos, además de un gran número de vasos, vellosidades sinoviales o pliegues sinoviales (Piermattei et al., 2007). La íntima sinovial presenta sinoviocitos, tipo celular cuyas funciones principales son la secreción (sinoviocitos tipo B) y la fagocitosis (sinoviocitos tipo A). Los sinoviocitos tipo B sintetizan y secretan sinovia. Este líquido reduce la resistencia a la fricción de las superficies articulares además de nutrir al cartílago articular (König y Liebich, 2008, Todhunter y Johnston, 2006)

Ligamentos

El ligamento es una estructura formada por tejido conjuntivo fibroso cuya función es unir y estabilizar los segmentos óseos que forman una articulación. Se pueden encontrar por dentro o por fuera de la membrana fibrosa, por lo que serán intracapsulares o extracapsulares respectivamente. Los ligamentos intracapsulares no se encuentran en el interior de la cavidad articular, sino que están separados de ella por membrana sinovial y por lo tanto lejos del contacto con el líquido sinovial (Bruyn et al., 2012).

Líquido sinovial

Es un ultrafiltrado de plasma de consistencia viscosa debido a los complejos proteicos formados por los glucosaminoglicanos, principalmente por las interacciones entre las cadenas de HA. Presenta un color amarillento pálido y claro, y tiene un PH débilmente alcalino. Su secreción se produce a través de los sinoviocitos que se encuentran en la cápsula articular (Piermattei et al., 2007).

En la composición del líquido sinovial encontramos compuestos de HA, azúcares, electrolitos y enzimas, gracias a los cuales cumple su principal función de reducir la resistencia a la fricción de las superficies articulares a la vez que nutre el cartílago y los ligamentos intraarticulares (Todhunter y Johnston, 2006).

Las grandes proteínas son separadas del líquido sinovial gracias al efecto del endotelio de los capilares. Entre sus principales componentes se encuentra el HA o hialuronato, el cual también actúa modulando el intercambio de pequeñas moléculas (Köning y Liebich, 2004), células mononucleares (células de tapizamiento sinovial, monocitos y linfocitos) que equivalen al 90% del recuento celular total, y el resto de las células son leucocitos polimorfonucleares. Por otra parte, tanto las moléculas lipófilas como el oxígeno y el dióxido de carbono, difunden libremente hacia y desde el líquido sinovial a través de los sinoviocitos (Todhunter y Johnston, 2006).

En cuanto al hialuronato, es una cadena polisacárida de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. Este compuesto en solución adopta una configuración de espiral rígida con una alta afinidad por el agua, lo que le da la elevada viscosidad al líquido sinovial. Debido a esto, el líquido sinovial puede soportar fuerzas de estrés por deslizamiento, y absorbe parte de la energía generada por el movimiento. Otra de las características importantes del hialuronato es su tixotropía o capacidad de disminuir la viscosidad del líquido sinovial en situaciones donde se da una alta velocidad de deslizamiento debido a un movimiento rápido (Todhunter y Johnston, 2006).

Entre el líquido sinovial y el plasma, existe un intercambio de fluidos que se debe a las fuerzas de Starling, resultado de las diferencias de presión hidrostática y coloidal osmótica entre los distintos fluidos. El volumen de líquido sinovial presente en una articulación depende del flujo de linfa provocado por el movimiento y el efecto del ángulo articular sobre la presión del líquido sinovial. La presión intrasinovial normal es subatmosférica, ayudando así a estabilizar la articulación. El tamaño de la articulación, así como el volumen del líquido sinovial presente, la posición articular, la anatomía articular, la permeabilidad de la membrana y la capacidad de expansión capsular son factores que influyen en esta presión intrasinovial (Todhunter y Johnston, 2006).

Cavidad articular y formaciones anejas

La cavidad articular es el espacio comprendido entre las superficies articulares de los huesos. Está limitada por la membrana sinovial y llena de líquido sinovial. A veces puede estar dividida total o parcialmente por las formaciones anejas (Todhunter y Johnston, 2006).

Entre las formaciones anejas encontramos los meniscos, estructuras fibrocartilaginosas con un elevado contenido en agua y colágeno tipo II. Participan en la estabilidad a nivel rotacional y varo-valgo, y ayudan a distribuir el peso liberando algo de carga al cartílago. Debido a su estructura y composición, el tercio interno de los meniscos soporta fuerzas de compresión, mientras que el tercio externo está sujeto a fuerzas de tensión (Todhunter y Johnston, 2006).

Otras formaciones anejas son por ejemplo los discos articulares que encontramos en la articulación temporomandibular, o también los rodetes articulares. Todas estas estructuras anejas sirven para amoldar superficies articulares no congruentes, estabilizando así las articulaciones. Existen algunos casos en que esta función de amortiguación se lleva a cabo por acumulaciones de grasa (König y Liebich, 2008).

Cartílago articular

Estructura de cartílago hialino que permite el deslizamiento de las articulaciones y se une a la superficie de la epífisis calcificada del hueso subyacente. Dependiendo de su localización y exigencias mecánicas de presión y tracción que debe soportar, varía en la estructura de los haces de fibras conjuntivas y en el grosor. La extensión del revestimiento cartilaginoso es directamente proporcional a los movimientos de la articulación, siendo más extenso en las articulaciones muy móviles (König y Liebich, 2008).

Gracias a su matriz cartilaginosa hialina deformable y viscoelástica, su principal función es la de amortiguar los golpes que se dan entre las articulaciones. Se caracteriza por la ausencia

de vasos sanguíneos, linfáticos y de terminaciones nerviosas. Macroscópicamente tiene un aspecto blanco, liso y brillante (König y Liebich, 2008).

Hueso subcondral

El hueso subcondral (HS) comprende el tejido subarticular mineralizado que se extiende desde el *tidemark* (frente de mineralización o unión entre el cartílago calcificado y no calcificado) hasta el inicio de la médula ósea. Sus funciones principales consisten en dar soporte al cartílago articular que se encuentra por encima de él, distribuir la carga mecánica a la diáfisis cortical subyacente, así como absorber la tensión de los impactos mecánicos continuos y nutrir las capas profundas del cartílago hialino, especialmente en el período de crecimiento (Burr, 2004).

El HS incluye al menos 3 estructuras mineralizadas bien diferenciadas: el cartílago calcificado, un hueso laminar subcondral corticalizado y el hueso subcondral trabecular. El cartílago calcificado junto con el hueso cortical subcondral son conocidos como placa subcondral (Burr, 2004).

Algunos autores incluyen también un hueso trabecular subarticular cuyos límites no están bien definidos. El espesor del HS varía en función de la especie animal, edad, masa corporal, localización y tipo de articulación. Así, el grosor del HS en el platillo tibial humano puede llegar hasta 2-3 mm en la zona de más carga (Burr, 2004).

El HS está muy vascularizado, aunque la mayoría de los vasos no alcanzan el cartílago calcificado, a excepción de cuando se producen daños a nivel del cartílago. El cartílago calcificado puede aumentar de espesor mediante la osificación endocondral, contribuyendo a la esclerosis subcondral observada en las radiografías. Asimismo, el HS puede incrementar el grosor por aposición directa de hueso (modelado) y aumentar su densidad a través del remodelado óseo, ambos factores incrementan la densidad aparente de dicha esclerosis subcondral. En condiciones normales, el crecimiento, modelado y remodelado óseos ocurren constantemente a lo largo de la vida, pero su actividad varía en diferentes grados en los 3 tejidos mineralizados, con diferente resultado sobre la masa y geometría del hueso y diferentes consecuencias en la mecánica articular (Piermattei et al., 2007).

Cartílago articular

Composición y estructura

El cartílago articular recubre el final de los huesos en articulaciones sinoviales permitiendo la movilidad de estas ya que proporciona una superficie de deslizamiento de baja fricción, además de soportar las cargas que se ejercen sobre las mismas (Bhosale y Richardson, 2008). Tiene un origen mesodérmico y surge de la condensación de células mesenquimales. Existen variaciones en la morfología del cartílago hialino, al igual que en la densidad, esto es debido a la diferencia de carga que debe soportar cada región en concreto, a la edad del individuo y a la especie estudiada (Zanasi et al., 2006).

Como ya hemos mencionado anteriormente, el cartílago articular es un tejido conjuntivo denso altamente especializado, hipocelular, avascular, alinfático y no innervado. Contiene un bajo porcentaje de células en su composición (5%), y está embebido en una rica matriz extracelular en la cual encontramos colágeno, proteoglicanos, otras proteínas distintas al colágeno y agua (Zanasi et al., 2006).

Las funciones principales del cartílago articular consisten en transmitir y distribuir las cargas ejercidas sobre la articulación, proporcionar una superficie lisa y ayudar en la lubricación articular para que exista la mínima fricción posible (Zanasi et al., 2006). Estas funciones se atribuyen a su notable resistencia, que le permite recuperar la forma cuando cesa la aplicación de las fuerzas deformantes ejercidas sobre él (Espanha, 2010).

Debido a su estructura, el cartílago articular es un material multifásico dividido en dos fases:

- Fase acuosa: fase predominante en la cual encontramos el agua y los electrolitos.
- Fase sólida: la cual consta de colágeno, proteoglicanos, glucoproteínas, minerales, lípidos y condrocitos (Todhunter y Johnston, 2006).

Matriz extracelular (MEC)

Agua

La MEC está compuesta principalmente por agua, del 60 al 80% de su composición (Huey et al., 2012). Esta fase acuosa permite la deformación del cartílago en respuesta al estrés, fluyendo hacia dentro y hacia fuera del cartílago. La cantidad de agua es mayor en superficie (80%) que en profundidad (60%), y es muy importante para la nutrición del cartílago y para la lubricación articular (Bhosale y Richardson, 2008).

El PH de la matriz es de 7, 4, y su fase seca restante está formada por colágeno, proteoglicanos y otras proteínas de matriz (Espanha, 2010).

Colágeno

Comprende aproximadamente el 10-20% de la ME (Huey et al., 2012). El 90% de su composición es colágeno tipo II (col-II), y el resto corresponde a distintas fracciones de los tipos de colágeno III, VI, IX, X, XI, XIII y XIV (Eyre et al., 2006).

El Col-II es el principal componente microfibrilar encargado de conferir al cartílago una gran resistencia a la tensión o tracción; El colágeno tipo VI se encuentra en la matriz pericelular y ayuda a que los condrocitos se unan a esta matriz; El colágeno tipo IX está ligado a la superficie de las microfibrillas y confiere las propiedades de tensión y las conexiones interfibrilares; El colágeno tipo X se encuentra en estrecha relación con las células hipertrofiadas en el estrato de cartílago calcificado y su función principal es de apoyo estructural y ayuda en la mineralización del cartílago. Por último el colágeno tipo XI se encuentra dentro o en estrecha relación con las microfibrillas y se encarga de la formación fibrilar del núcleo (Bhosale y Richardson, 2008).

El contenido en colágeno en la MEC no es uniforme a lo largo de toda la estructura del cartílago articular, en las capas más superficiales ocupa el 80% de la composición del cartílago, en cambio, en las zonas más profundas este porcentaje desciende al 65% (Espanha, 2010). La disposición de la red de colágeno fibrilar, también varía con la localización, en la zona superficial son bandas paralelas, que pasan a una disposición más al azar en la zona media, para finalizar con una disposición radial en la zona profunda (Goldring, 2012).

Proteoglicanos

Constituyen del 15 al 30% del total de la MEC (Huey et al., 2012). Son macromoléculas complejas que confieren resistencia a la compresión del cartílago articular, y se producen en el interior de los condrocitos, secretándose en la matriz (James y Uhl, 2001).

Estas moléculas se componen de subunidades denominadas glucosaminoglicanos los cuales son moléculas de disacáridos. Los dos principales tipos son el condroitín-sulfato y el queratán sulfato (Bhosale y Richardson, 2008).

Los glucosaminoglicanos se unen a un núcleo proteico formando agregados o proteoglicanos, estos, se unen también mediante enlaces proteicos al HA para formar agregados de proteoglicanos. Estos proteoglicanos tienen una vida media de tres meses y presentan gran capacidad para retener agua, manteniendo el equilibrio de líquidos y electrolitos en la articulación, y siendo además, los responsables de la estructura porosa del cartílago (Burstein et al., 2009).

Otras proteínas

Son glicoproteínas como proteasas y sus inhibidores, factores de crecimiento, lisozimas, fibronectinas, condronectinas, trombospondina y proteína oligomérica de la matriz del cartílago. Ocupan en su totalidad el 10% de la fase sólida del cartílago. Tienen funciones de unión entre la MEC y los condrocitos. La más importante, la integrina, interacciona con receptores celulares y regula la migración, proliferación y diferenciación de los condrocitos (Goldring y Marcu, 2009).

Componente celular

Los condrocitos constituyen el único elemento celular del cartílago y son los responsables de la síntesis y mantenimiento de la MEC, representando el 1-2% del total del volumen de un cartílago articular humano y aproximadamente el 10% de su peso (Buckwalter et al., 2005), proporcionando rigidez y resistencia al cartílago articular (James y Uhl, 2001).

Como ya hemos mencionado, el cartílago articular es una estructura avascular, por este motivo, los condrocitos reciben su nutrición mediante difusión del líquido sinovial a través de la MEC. Por otro lado, estas células, poseen pocas mitocondrias, realizando un escaso consumo de oxígeno (Bhosale y Richardson, 2008).

Conforme incrementa la edad del individuo, la densidad y capacidad de división de los condrocitos va disminuyendo, llegando una edad en que esta división es escasa, de manera que el envejecimiento contribuye al desarrollo y evolución del proceso degenerativo del cartílago articular. Aunque no es frecuente la división celular, ésta se puede observar en determinados cartílagos adultos como respuesta a las agresiones (Buckwalter et al., 2005).

Los condrocitos varían en tamaño, forma y número desde la superficie hasta las zonas de mayor profundidad quedando reflejado en la composición de la matriz, lo que se atribuye en gran parte a las diferencias del entorno mecánico. Estas células tienen un tamaño medio de 30 a 40 μm y pueden presentarse solas, de forma aislada o formando cadenas lineales de dos células en adelante agrupadas por una banda de matriz. Los condrocitos más superficiales son más pequeños y aplanados, los de la zona media son redondeados y los de zonas profundas son los de mayor tamaño, y se encuentran agrupados (Goldring y Marcu, 2009).

Estructura histológica

El cartílago articular se divide en varias zonas, que muestran diferencias en cuanto a su celularidad, composición, organización de la MEC y propiedades mecánicas (König y Liebig, 2008):

- **Zona tangencial:** Es la capa superficial o de deslizamiento y mide en torno a unos 40 μm . Esta capa posee una escasa actividad metabólica, está compuesta principalmente por condrocitos de pequeño tamaño, aplanados, y situados de forma paralela a la superficie articular. Presenta pocos proteoglicanos en su composición y una alta concentración de colágeno (Bhosale y Richardson, 2008). Las fibras de colágeno ocupan una disposición paralela a la superficie para proporcionar una mayor resistencia a la tracción y a la cizalladura (Bhosale y Richardson, 2008), aunque estudios recientes han demostrado que estas fibras de colágeno, tienen una disposición mayoritariamente oblicua (Wu et al., 2008). Por otra parte, esta zona actúa también como filtro para grandes macromoléculas protegiendo así al cartílago del sistema inmune del tejido sinovial.

- **Zona de transición:** También denominada capa intermedia. Mide en torno a 500 μm y es la encargada de soportar fuerzas de compresión. En esta capa encontramos una menor densidad celular, los condrocitos presentes tienen una morfología esferoide y se encuentran solos o en grupos distribuidos de forma aleatoria. Están embebidos en una abundante MEC y existe una mayor presencia de proteoglicanos y menor cantidad de colágeno, que se encuentra dispuesto oblicuamente y al azar (James y Uhl, 2001, Bhosale y Richardson, 2008).
- **Zona radial:** Conocida también como zona profunda, tiene un tamaño aproximado de 1000 μm y posee una celularidad muy baja. Los condrocitos presentes se disponen perpendicularmente a la superficie y tienen una morfología esferoidal. Esta capa presenta el mayor diámetro de las fibrillas de colágeno y una concentración más elevada de proteoglicanos (Bhosale y Richardson, 2008).
- **Zona de calcificación:** Se trata de una zona mineralizada que mide en torno a 300 μm , no presenta proteoglicanos y el colágeno está dispuesto radialmente. Tiene un pequeño volumen de células que están hipertrofiadas y dispuestas aleatoriamente embebidas en una matriz calcificada. Estas células son las únicas que sintetizan colágeno tipo X, responsable de proporcionar la integridad estructural. La zona actúa como un importante amortiguador mecánico entre el cartílago articular no calcificado y el hueso subcondral, presenta cristales de hidroxiapatita y es la capa de anclaje del cartílago al hueso. Está separada de la zona anterior por la “línea de flujo” (tidemark), de 5 μm de grosor, que es una barrera ondulada con disposición tangencial de sus fibras y le permite soportar fuerzas de cizallamiento (Bhosale y Richardson, 2008, Hermida 2010).

Propiedades biomecánicas y metabolismo del cartílago articular

El cartílago articular es un tejido mayoritariamente hipóxico en el cual los condrocitos consumen mucho menos oxígeno molecular (O_2) que otros tipos celulares. Además, el cartílago articular adulto carece de vascularización, por lo que su nutrición y eliminación de productos de desecho del metabolismo depende del flujo hídrico bidireccional entre la cavidad articular y la MEC (Hermida 2010).

El cartílago articular es un elemento de soporte cuya composición y estructura determina sus principales funciones: permitir el deslizamiento de las superficies articulares con un

mínimo de fricción y absorber las cargas producidas en el movimiento de la articulación. En estas funciones de resistencia y deformidad también desempeña un papel importante el HS (Pescador, 2011).

Los proteoglicanos presentes en la MEC son los encargados de conferir resistencia al cartílago articular debido a su naturaleza hidrófila. Estos proteoglicanos captan agua continuamente formando una enorme esfera hidratada que otorga resistencia a la compresión del cartílago, deformándose ligeramente cuando se ejercen fuerzas sobre ella y volviendo a su estado normal mediante la reabsorción de agua cuando estas fuerzas cesan (Buckwalter et al., 2005). Esta resistencia a la deformación se debe al efecto muelle de las arcadas de fibras de colágeno y a las fuerzas de repulsión que se dan entre las cargas negativas de las cadenas de proteoglicanos. Cuando se ejerce una presión sobre el cartílago éste se deforma de manera gradual a medida que las moléculas de agua abandonan el interior de los proteoglicanos en dirección a la superficie articular y, al cesar la presión, las moléculas de agua regresan a su ubicación inicial atraídas por la carga negativa de los proteoglicanos, recuperando así su estructura (Hermida 2010).

El deslizamiento en las articulaciones sinoviales se ve favorecido por la superficie lisa que presenta la matriz lo que hace que exista un bajo coeficiente de fricción, a la vez que, el líquido sinovial actúa como lubricante natural (Hermida 2010).

Como conclusión podemos decir que las propiedades biomecánicas del cartílago articular proceden en gran medida de la interacción de estas tres moléculas fundamentales: col-II, proteoglicanos y agua, junto con estímulos biomecánicos (Hermida 2010).

En condiciones normales, pequeñas presiones o fuerzas cíclicas sobre el cartílago articular favorecen la formación de condrocitos, existiendo un bucle de regulación positiva en el que intervienen las interleucinas (IL), concretamente la IL-4, y la expresión de las integrinas normalmente presentes ($\alpha 1$, $\alpha 10$, $\beta 1$), entre otros componentes. Así mismo, la aplicación de una fuerza a baja frecuencia, con producción de un estrés mecánico limitado, tiene propiedades antiinflamatorias sobre las articulaciones (Millward-Sadler y Salter, 2004).

Artrosis

Definición

La artrosis es una patología crónica y degenerativa del cartílago articular que presenta una etiología multifactorial y constituye uno de los trastornos reumáticos más frecuentes, así como la causa más habitual de dolor y discapacidad en adultos (Haq et al., 2003). Es la primera causa de cirugías de reemplazo articular en medicina humana (Learmonth et al., 2007).

En la especie canina, esta enfermedad es un desorden común que se da en perros de distintas edades con una incidencia tan alta que afecta al 20% de la población de perros adultos y al 80% de los animales geriátricos, siendo la causa más común de cojera en perros mayores de un año (Rialland et al., 2012). Sin embargo, en el caso de la especie felina se trata de una patología infradiagnosticada ya que en la mayoría de los casos, los gatos no muestran cojera, sino cambios graduales en su comportamiento y estilo de vida, siendo la edad el principal factor de riesgo en esta especie (Bennett et al., 2012).

Tanto en la especie canina como en la especie felina, las articulaciones más afectadas por esta enfermedad son el codo, la cadera y la rodilla (Malek et al., 2012), pero puede verse afectada cualquier articulación, como articulaciones vertebrales y articulaciones del carpo y tarso, como es el caso de perros de razas grandes y gigantes, donde se pueden afectar las articulaciones metacarpofalángicas y metatarsofalángicas (Rychel, 2010).

En medicina humana en cambio, las articulaciones más afectadas son las que sostienen el peso del cuerpo, como caderas, rodillas y columna vertebral. Además, otras de las articulaciones que se ven afectadas con frecuencia debido a su uso, son las diversas articulaciones de las manos (Camafeita, 2011).

No se conoce con exactitud la etiología de la OA, pero hoy en día, se sabe que los cambios estructurales que se dan en esta patología son debidos a la combinación de diversos factores sistémicos como densidad mineral ósea, factores genéticos y edad entre otros, combinados con factores locales como obesidad y ejercicio físico. Esta enfermedad se origina cuando por causas mecánicas o biológicas se altera el equilibrio existente en la articulación sana, lo que desequilibra los procesos de síntesis y degradación de los condrocitos, MEC y HS, predominando finalmente los procesos catabólicos sobre los anabólicos (Oliviero et al., 2010). Estos cambios morfológicos, bioquímicos y biomecánicos que afectan al conjunto de tejidos de la articulación dan lugar a una fibrosis, ulceración, pérdida de cartílago articular, esclerosis y aumento de la densidad del HS, desarrollo de osteofitos y formación de quistes subcondrales (Lane y Nevitt, 2002).

En las etapas iniciales de la patología, macroscópicamente la superficie del cartílago afectado pierde su aspecto liso y brillante, se vuelve irregular y aparecen pequeñas hendiduras en las capas superficiales. Según progresa la enfermedad, estas irregularidades profundizan y aparecen fisuras verticales que se extienden a las capas más profundas, el cartílago articular se erosiona, apareciendo ulceraciones que, en los estadios avanzados, dejan expuesto el HS. Generalmente, las lesiones en la OA suelen ser focales, y son más pronunciadas en las zonas de mayor carga, donde las fuerzas de compresión y cizalladura son mayores (Chen et al., 2013).

Entre las manifestaciones clínicas más comunes encontramos dolor, molestias, pérdida de movilidad, rigidez en las articulaciones, limitación de movimientos e inflamación intraarticular moderada lo que da lugar a una disminución de la funcionalidad articular. La membrana sinovial en articulaciones artrósicas experimenta una reacción inflamatoria y aparece engrosada e hiperémica, al igual que la cápsula y los ligamentos, los cuales desarrollan una

reacción inflamatoria que puede evolucionar hacia una excesiva laxitud o hacia una fibrosis de los mismos. El conjunto de estos fenómenos contribuyen a distorsionar la biomecánica articular normal y potenciar los signos clínicos de la patología (Saito et al., 2002).

En la OA, no existe siempre una buena correlación entre la clínica y los hallazgos detectados radiológicamente, por este motivo, la estimación de la prevalencia de la patología es complicada, ya que los cambios estructurales que acompañan a la enfermedad, que en la mayoría de los pacientes ocurren a medida que envejecen, pueden tener lugar de forma asintomática (Dougados, 2005, Martel-Pelletier et al., 2012).

Clasificación

Según el Colegio Americano de Reumatología la artrosis se clasifica como primaria o idiopática, o secundaria en función de la presencia o no de una causa o factor predisponente subyacente, (Camafeita, 2011, Peat et al., 2006):

Idiopática

Localizada

- Manos: nódulos de Heberden y de Bouchard, artrosis erosiva, interfalángica, rizartrrosis del pulgar
- Pies: Hallux valgus, hallux rigidus, artrosis talonavicular
- Rodilla: compartimentos femorotibial y femoropatelar
- Cadera: excéntrica (superior), concéntrica (medial), difusa
- Raquis: interapofisaria, discovertebral, espondilosis (osteofitosis), ligamentaria (hiperostosis anquilosante vertebral)
- Otras localizaciones: hombro, acromioclavicular

Generalizada

Tres o más de las siguientes:

- Pequeñas articulaciones periféricas y del raquis
- Grandes articulaciones centrales y raquis
- Mixta

Secundaria

Se divide en *postraumática* y *congénita*. Ésta, a su vez, se divide en:

Localizada

- Cadera: luxación, displasias, enfermedad de Perthes, epifisiólisis.
- Factores mecánicos y locales: desviación en valgo y varo, dismetrías, obesidad.

Generalizada

- Displasias óseas: poliepifisaria, espondiloepifisaria.
- Enfermedades metabólicas: hemocromatosis, ocronosis.
- Artropatías por depósito de cristales cálcicos.
- Otras enfermedades articulares: necrosis avascular, artritis reumatoide, artritis seronegativa, artritis séptica, gota, enfermedad de Paget.
- Otras enfermedades: endocrinas (diabetes, acromegalia, hipotiroidismo, hiperparatiroidismo), neurológicas (tabes, siringomielina), lepra, enfermedad de Mseleni.

Etiopatogenia

Aunque hoy en día la etiología de la OA se conoce de forma incompleta, en las últimas décadas se han conseguido importantes avances en el conocimiento de su patogenia. Actualmente, se conocen mejor algunos de los factores que intervienen en esta patología, como factores mecánicos, metabólicos, bioquímicos, biomecánicos y genéticos entre otros (Haseeb y Haqqi, 2013). También encontramos moléculas proinflamatorias involucradas en su patogénesis como citocinas, prostaglandinas, prostanoïdes, radicales libres y metaloproteasas (Di Cesare y Abramson, 2005).

Cuando existe una alteración en la homeostasis de una articulación ya sea como consecuencia de un traumatismo, herida, sobrecarga, desgaste, o bien asociado a un proceso de envejecimiento, se producen cambios en la composición, estructura y propiedades de los tejidos que forman dicha articulación, comprometiendo el correcto funcionamiento del cartílago articular. Entre los principales factores de riesgo sistémicos que se han descrito en medicina humana para la artrosis, los más significativos son la edad, el sexo, la raza, la densidad mineral ósea, factores genéticos y factores metabólicos y endocrinos. En cuanto a los

factores de riesgo locales, se han señalado fundamentalmente el peso corporal, la actividad laboral, la actividad deportiva, los tratamientos de sustitución hormonal, traumatismos, debilidad muscular y alteraciones óseas congénitas (Cooper et al., 2000, Felson et al., 2000). En medicina veterinaria, los factores predisponentes más comunes de la especie canina son la displasia de codo y cadera, consecuencia de una cirugía ortopédica, rotura del ligamento cruzado anterior, fracturas articulares e incongruencia articular resultado de un trauma o deformidad angular de las extremidades (Rychel, 2010).

La OA es una enfermedad multifactorial que como ya hemos visto, en algunos casos resulta de la interacción de factores adquiridos, sumados a una predisposición hereditaria a la que contribuyen múltiples genes. El conocimiento de todos estos factores genéticos implicados en la aparición de la patología nos permitiría identificar y controlar a los individuos de mayor riesgo para diagnosticar la enfermedad de manera más precoz, llevando a cabo la instauración de nuevas medidas terapéuticas que permitan frenar eficazmente la evolución del proceso. Antiguamente la artrosis se consideraba únicamente una enfermedad adquirida, sin embargo, hoy en día se ha demostrado que esta patología tiene una fuerte predisposición hereditaria, al igual que patologías como la diabetes, la obesidad y la osteoporosis entre otras. Por este motivo, este tipo de patologías se ha englobado en un nuevo término que recibe el nombre de enfermedades complejas, que son la consecuencia de la interacción de factores genéticos y ambientales. Este componente hereditario explica que ante estímulos externos similares, ciertos individuos desarrollen la patología y otros no (Prieto-Montaña y J., 2009).

En cuanto a los condrocitos presentes en el cartílago articular, poseen una baja capacidad de regeneración, y en el individuo adulto constituyen células completamente diferenciadas que juegan un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad ya que en respuesta a estímulos nocivos que se dan en la articulación promueven la degradación de la MEC e inhiben procesos esenciales para la reparación del cartílago (Camafeita, 2011). En condiciones fisiológicas, los componentes de la MEC se van renovando en un estado de equilibrio homeostático entre los procesos anabólicos y catabólicos. La regulación de estos procesos de síntesis y degradación se produce gracias al estrés mecánico ejercido sobre la actividad condrocitaria, donde las presiones cíclicas e intermitentes estimulan el metabolismo condrocitario y la compresión estática inhibe la biosíntesis de la MEC (Chen et al., 2001, Smith et al., 2004).

El desequilibrio mecánico que se origina debido a la pérdida de elasticidad que conlleva la degradación y desaparición de colágeno y proteoglicanos asociados al proceso artrósico produce un incremento de la tensión repercutida sobre el tejido, especialmente a nivel celular

(Alexopoulos et al., 2005). En un primer momento, cuando se altera el equilibrio fisiológico existente en la articulación se producen una serie de cambios en el cartílago que dan lugar a una reacción hipertrófica originada por un aumento de la síntesis de la MEC y un incremento sistémico de la actividad condrocitaria como intento de regenerar la matriz, ocasionando un incremento del contenido en colágeno y agreganos. Esto da lugar a la aparición de fibrilaciones, cambios en la MEC como deplecciones, variaciones en la distribución y composición de proteínas y formación de agregados celulares (Pritzker et al., 2006). A continuación tiene lugar una fase de aceleración del recambio de la matriz en la que aumentan la síntesis y secreción de metaloproteasas (MMP) de matriz y otras enzimas degradantes, dando lugar a una pérdida de los principales componentes de la matriz ocasionando daños y pérdidas en la red de colágeno y disminuyendo progresivamente la capacidad amortiguadora de la misma. En estas zonas lesionadas de cartílago, proliferan fibrocitos que inducen una metaplasia del cartílago hialino hacia fibrocartílago, con un comportamiento biomecánico de inferior calidad (Nelson et al., 2006, Guilak et al., 1994).

Mediadores inflamatorios

Antiguamente, la artrosis no se consideraba una artropatía inflamatoria debido a la escasez de neutrófilos que contiene el líquido sinovial y la ausencia de manifestaciones sistémicas de inflamación. Además, las características del cartílago articular (avascular, alinfático y aneural) lo hacían candidato para no presentar los signos clásicos de inflamación, como enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor (Lopez-Armada et al., 2007).

Hoy en día, debido a los avances en medicina, se ha comprobado que diversos mediadores proinflamatorios, como las citocinas IL-1 β y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), pueden ser importantes en el desarrollo de esta enfermedad (Goldring et al., 2011). La evolución de esta patología no sólo afecta al cartílago, sino a toda la estructura articular, incluidos el HS, el tejido sinovial, la cápsula articular y los tejidos blandos periarticulares. Los efectos de esta inflamación sinovial contribuyen a la desregulación en la función del condrocito, lo que favorece el desequilibrio entre las actividades anabólicas y catabólicas del mismo. La estimulación de condrocitos con citocinas proinflamatorias incrementan la producción de enzimas que degradan el cartílago, denominadas MMP, inhiben la síntesis de proteoglicanos y coll-II, estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno como el óxido nítrico (NO) e incrementan la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) (Lianxu et al., 2006, Li et al., 2005, Kobayashi et al., 2005, Goldring et al., 2011). Estudios recientes han visto que la inhibición de

estas moléculas mediante antagonistas biológicos detiene la resorción de la MEC en cultivos de cartílago articular (Poole, 2005, Melchiorri et al., 1998).

Entre los mediadores inflamatorios implicados en la degradación del cartílago articular producidos por los condrocitos destaca:

Citocinas

Son péptidos de pequeño tamaño que median la activación, proliferación y migración celular a través de sus receptores de membrana. Son sintetizadas por macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, y son responsables de la activación de un gran número de células (Duff, 1994).

La IL-1 β y el TNF- α son las citocinas proinflamatorias más importantes implicadas en la degradación de la MEC del cartílago y se encuentran en el tejido y el líquido sinovial de pacientes con OA (Lopez-Armada et al., 2006, Lopez-Armada et al., 2007). La IL-1 es una citoquina producida por una gran variedad de células. Su gen codifica 2 isoformas, IL-1 α e IL-1 β . La IL-1 β representa el 90% de la IL-1 liberada al medio extracelular, mientras que la IL-1 α es una molécula inicialmente unida a membrana (Saha et al., 1999). La IL-1 β , en el cartílago afectado, se localiza junto con MMP 1, 3, 8 y 13 y TNF- α y su infiltración intraarticular induce la pérdida de cartílago mediante la unión a sus receptores específicos IL-1R tipo I y IL-1R tipo II. Esto desempeña un papel destacado tanto en la degradación de la matriz como en la estimulación de las vías nociceptivas en la artrosis (Benito et al., 2005).

La familia del TNF consta de un mínimo de 18 miembros. El TNF- α se sintetiza en forma de precursor inactivo unido a la membrana. Es necesario la actuación de la enzima convertora de TNF- α (TACE) para su activación (Black et al., 1997, Lopez-Armada et al., 2006).

Estas dos citocinas, IL-1 β y TNF- α , inducen su propia producción, a la vez que estimulan la síntesis de mediadores como la IL-8, la IL-6 y el factor inhibidor de leucocitos (LIF) en los sinoviocitos y condrocitos (Lopez-Armada et al., 2006). Por otra parte, son capaces de incrementar la expresión de ciclooxigenasa (COX), concretamente la COX-2 y la enzima inducible óxido nítrico sintetasa (iNOS), y por tanto de los mediadores proinflamatorios que sintetizan estas dos enzimas, la PGE₂ y el NO. Estas enzimas también aumentan la producción de otras moléculas implicadas en el desarrollo de la enfermedad como proteasas, quimioquinas y moléculas de adhesión. Finalmente, provocan una disminución de la síntesis de proteoglicanos y de coll-II en los condrocitos, aumentando en cambio la expresión de los colágenos tipo I y III (Lopez-Armada et al., 2007, Mor et al., 2005).

La IL-6 es otra citocina proinflamatoria que aumenta sus niveles en suero y sinovia de pacientes con OA. Esta citocina está implicada en la degradación del cartílago a la vez que se asocia con la hiperalgesia e hipersensibilidad de los tejidos afectados por la patología (Brenn et al., 2007).

Eicosanoides: Prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LT)

Los condrocitos presentes en el cartílago articular tienen la capacidad de producir diferentes tipos de eicosanoides, como PGE₂, PGD₂, prostaciclina, tromboxano y LTB₄ (Lopez-Armada et al., 2007). Se ha demostrado que, a diferencia de lo que sucede en el cartílago sano, el cartílago afectado por EDA tiene la capacidad de producir cantidades elevadas de PGE₂ en respuesta a la acción de IL-1 y TNF- α (Abramson, 2004).

En la producción de PG juega un papel fundamental la enzima COX, esta enzima es una hemoproteína de membrana que cataliza la conversión del ácido araquidónico a PG. Existen dos isoformas, la COX-1 constitutiva que se encarga de las funciones fisiológicas, y la COX-2 inducible que interviene en los procesos inflamatorios. Esta COX-2 no se expresa generalmente en condiciones normales, su expresión es inducible como respuesta a citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento o endotoxinas. La elevada producción de esta enzima se considera el mecanismo por el que aumentan los niveles de las PG durante la inflamación (Alvarez, 2006). Además, existen estudios en los cuales se indica que existe otra isoforma, la COX-3 (Lee et al., 2013).

Dentro de las PG, la PGE₂ es el principal prostanoide producido por muchos tejidos y tipos celulares, se considera que es el principal contribuyente al dolor inflamatorio, induciendo dolor y degeneración en procesos osteoartrosicos (Shimpo et al., 2009). Esta PG afecta a la remodelación, formación y resorción ósea, además de regular la respuesta inmune (Miyaura et al., 2000). Se ha visto que PGE₂ puede mediar en las vías del dolor en el cartílago articular, a través de su efecto estimulante sobre los factores asociados al dolor como IL-6 (Brenn et al., 2007) o la iNOS, además, en combinación con la citocina catabólica IL-1 aumenta de forma sinérgica este efecto sobre IL-6 e iNOS (Li et al., 2009).

En cuanto a la acción de los LT, en concreto de LTB₄, se ha demostrado que en el líquido sinovial de los pacientes con EDA, existe una elevada actividad de esta enzima, contribuyendo al incremento de importantes factores catabólicos involucrados en la patofisiología de la OA como las MMP, además se considera un fuerte quimiotáctico para los neutrófilos, aumentando

de esta manera el componente inflamatorio en la patología (Chen et al., 2010, Martel-Pelletier et al., 2004).

Óxido nítrico (NO)

El NO es un radical libre gaseoso, sintetizado a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina por la iNOS. El NO es lábil y se metaboliza en presencia de oxígeno a su forma inactiva, estable y definitiva, los nitritos (NO₂⁻) y los nitratos (NO₃⁻). Por este motivo, la vida media del NO es breve, pero aun así, sus efectos biológicos perduran debido a la formación de productos estables y activos, cuando reacciona con proteínas y otras moléculas (Alvarez, 2006).

El líquido sinovial de articulaciones sanas no contiene prácticamente NO, en cambio, el procedente de articulaciones artrósicas contiene elevadas concentraciones. Esto nos indica que la cantidad de NO producido por el tejido artrósico está en relación directa con el grado de lesión del cartílago (Attur et al., 2002).

Cuando existe un estrés mecánico en la articulación, debido sobre todo a la compresión intermitente y a la compresión estática, se produce un aumento en la expresión de iNOS, lo que da lugar a un incremento de NO. Este mediador, consecuencia de la sobre-regulación de la iNOS a través de las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF α , está involucrado en la destrucción del cartílago de forma autocrina, produciendo efectos catabólicos y antianabólicos (de Andres et al., 2013). El NO inhibe la síntesis de agregano, aumenta la actividad de las MMP, incrementa la susceptibilidad del condrocito a oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y contribuye a la resistencia a los efectos anabólicos del factor de crecimiento insulínico (IGF), concretamente en IGF-11 (de Andres et al., 2013, Goldring y Goldring, 2004). Por otro lado, también se ha visto que el NO está implicado en la formación de osteofitos (Nishida et al., 2001), además de inducir la mineralización del cartílago en la OA mediante la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Johnson et al., 2000).

Metaloproteasas (MMP)

Son una familia de enzimas endopeptidasas compuesta por al menos 18 miembros que se clasifican estructuralmente en cinco subgrupos dependiendo del sustrato sobre el que actúan (Lopez-Armada et al., 2007):

- Colagenasas, escinden la triple hélice de fibras de colágeno (MMP-1, MMP-8 y MMP-13).
- Gelatinasas, degradan gelatina y colágeno tipo IV (MMP-2 y MMP-9).

- Estromelisininas, degradan proteoglicanos, fibronectina y laminina, entre otras proteínas (MMP-3 y MMP-10).
- Estromelisininas de membrana (MMP-14 y MMP-15).
- Otras (MMP-7, MMP- 12).

Estas enzimas desempeñan un papel clave en la degradación del cartílago en procesos osteoartrosicos y su actividad está controlada por sus inhibidores específicos denominados inhibidores de tejido de MMP (TIMP). Cuando existe un proceso degenerativo articular, el equilibrio existente entre estas enzimas se rompe, existiendo una deficiencia en los enzimas TIMP (Monfort et al., 2006).

Dentro de las MMP, una de las más importantes, implicada en la degradación del cartílago es la MMP-3. Los valores plasmáticos de esta enzima se correlacionan con una disminución del espacio articular, expresándose también en la superficie del cartílago en articulaciones osteoartrosicas (Blom et al., 2007). Por otra parte, la MMP-2 escinde los diferentes tipos de colágeno, a la vez que activa otras MMP. Enzimas como la MMP-7 y la MMP-13 únicamente se detectan en cantidades importantes en el cartílago de pacientes con OA (Lopez-Armada et al., 2007).

Adipocinas

Las adipocinas son proteínas secretadas por el tejido adiposo que incluyen una variedad de péptidos proinflamatorios o citocinas, entre las que se encuentran la leptina, la resistina y la adiponectina, las cuales se ven implicadas en procesos de degradación del cartílago articular (Presle et al., 2006).

La leptina es una hormona no glicosilada que se ha detectado en el líquido sinovial y suero de pacientes artrosicos y se ha demostrado que su expresión está incrementada en los condrocitos de estos pacientes. Esta enzima actúa de forma sinérgica con citocinas proinflamatorias incrementando la síntesis de NO, lo que dará lugar a una destrucción del cartílago articular (Otero et al., 2005, Presle et al., 2006, Staikos et al., 2013). También, se ha demostrado que esta adipocina es capaz de modular las células que participan en reacciones inmunes e inflamatorias, incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células T (Lam y Lu, 2007).

Existen estudios en los que se demuestra que esta adipocina está incrementada en mujeres con OA, lo que se relacionaría con la mayor predisposición de las mismas a padecer la patología ya que el porcentaje de tejido adiposo en las mujeres es mayor que en hombres

(Presle et al., 2006). Otros estudios demuestran que en ratones hembra a los que se les ha deteriorado la señalización de la leptina están protegidos de la osteoartritis inducida por la obesidad. Estos hallazgos indican que la grasa corporal elevada en ausencia de señalización de leptina es insuficiente para inducir la inflamación sistémica y la OA (Griffin et al., 2009).

El efecto de la adiponectina en el proceso de degradación del cartílago es controvertido, ya que se han demostrado efectos tanto condroprotectores como adversos sobre el mismo. Por una parte, se ha visto en un modelo animal que pacientes con OA presentan un nivel de adiponectina más bajo en suero, en comparación con animales que no presentan la patología, lo que nos sugiere un papel protector de esta enzima frente a la enfermedad (Uchida et al., 2009). Además de esto, la adiponectina modula la destrucción del cartílago, ya que regula positivamente en los condrocitos la expresión de la TIMP-2 y negativamente la MMP-13 (Chen et al., 2006b).

Por otro lado, la adiponectina induce la secreción de la iNOS y de citocinas proinflamatorias por parte de los condrocitos, a la vez que causa la destrucción de la matriz de cartílago en la OA originando con todo esto un proceso degenerativo sobre el cartílago articular (Kang et al., 2010).

La resistina es una proteína dimérica que produce un aumento de la producción de IL-1, TNF- α , y diversas quimiocinas. Después de una lesión traumática articular, los niveles de resistina aumentan, provocando degradación de la matriz y liberación de citoquinas inflamatorias en el cartílago articular (Lee et al., 2009).

Diagnóstico

El diagnóstico de esta patología se establece fundamentalmente por criterios clínicos y por la radiología convencional. Esto hace que existan muy pocos datos sobre la fisiopatología de la enfermedad en fases tempranas, lo que dificulta la adecuada valoración de su progresión y la pauta temprana de los tratamientos disponibles en la actualidad (Dougados, 2005, Camafeita, 2011)

Signos clínicos

En medicina humana, la manifestación clínica más frecuente es el dolor, este es el síntoma de comienzo de la OA, tiene un inicio insidioso, es profundo y mal localizado. Su intensidad aumenta con los años, aunque en muchos enfermos, sobre todo en las etapas más precoces,

muestra un curso intermitente y los pacientes no padecen síntomas durante años. El dolor es de característica mecánica, se desencadena con el ejercicio y mejora hasta desaparecer con el reposo. A medida que empeora la enfermedad, el dolor se hace más continuo, persiste durante un tiempo más prolongado y se induce por cualquier movimiento de la articulación afectada. En los últimos estadios evolutivos es casi continuo, incluso en reposo, y durante el descanso nocturno de los pacientes (Mas Garriga, 2014, Dieppe y Lohmander, 2005).

Las causas del dolor en este proceso son diversas. En los estadios iniciales se debe a la inflamación de estructuras periarticulares y también a brotes inflamatorios sinoviales inducidos por múltiples factores como microtraumatismos, depósitos de cristales e irritación sinovial por detritos cartilagosos. En ningún caso provienen del cartílago, ya que carece de terminaciones nerviosas (Mas Garriga, 2014, Dieppe y Lohmander, 2005).

El origen del dolor en los estadios más avanzados no se conoce bien y se ha atribuido a la congestión venosa producida en el hueso subcondral. El dolor se acompaña de incapacidad funcional progresiva. En los estados avanzados aparecen grandes deformaciones e incluso subluxaciones de las articulaciones provocadas por la incongruencia articular, la proliferación de osteofitos y el engrosamiento capsular. También se produce rigidez después del reposo, que en general, no dura más de media hora y se circunscribe a la articulación afectada (Mas Garriga, 2014, Dieppe y Lohmander, 2005).

La exploración de la articulación artrósica muestra una limitación de la movilidad con dolor ante la presión que será mayor durante los brotes de inflamación de la membrana sinovial o de alguna estructura periarticular. Son frecuentes los chasquidos y la crepitación cuando la articulación se moviliza, debido a la irregularidad de la superficie. Las características de la hinchazón articular dependen del grado de deformidad articular y de la coexistencia de focos inflamatorios, sinovitis o derrame sinovial (Mas Garriga, 2014, Dieppe y Lohmander, 2005).

En el caso de la especie canina, es muy importante el diagnóstico precoz de la patología, ya que estos animales aprenden a compensar el dolor y cuando los signos clínicos dan la cara la patología puede estar bastante avanzada. Para realizar un buen diagnóstico se deben establecer revisiones periódicas de los animales, en los cuales es conveniente llevar a cabo una evaluación del dolor miofascial. Para ello se debe realizar un examen físico mediante palpación muscular para valorar los grupos musculares más importantes asociados a cada miembro (Rychel, 2010).

Existen algunos casos donde los propietarios al observar que sus mascotas presentan un descenso en su calidad de vida debido a esta patología, se decantan por la eutanasia. En otros

casos, la OA, puede no ser la patología principal que presenta el animal, pero contribuye en la decisión de no tratar otra enfermedad concomitante. Todo esto se puede evitar además de con una buena educación de los propietarios, con el establecimiento precoz del diagnóstico y consecuente tratamiento de la patología, permitiendo a las mascotas vivir más tiempo y con mejor calidad de vida. Es importante también hacer entender a los propietarios que la OA es una patología de por vida que no se puede curar, sino simplemente paliar sus síntomas y retrasar su progresión (Rychel, 2010).

Escalas subjetivas de control de la OA

Existen diversas escalas para clasificar tanto el dolor, como el grado de OA presente en una articulación. Entre estas escalas, cabe destacar:

Escala analógica visual (VAS)

La VAS es una escala subjetiva unidimensional ideada por Scott Huskinson en 1976. Se basa en la valoración de la intensidad del dolor que presenta el paciente y es uno de los métodos de evaluación más empleados, sobre todo en medicina humana, validándose su uso también para medicina veterinaria (Price et al., 1983, Price et al., 1994, Hudson et al., 2004).

La VAS se utiliza universalmente para la valoración de la intensidad sensorial y el malestar de inducciones dolorosas experimentales, así como para evaluar los mecanismos y eficacia de intervenciones farmacológicas y no farmacológicas (Price et al., 1983, Price et al., 1994).

Consiste en una línea que puede ser tanto horizontal como vertical, de unos 10 cm de longitud que representa el espectro continuo de la experiencia dolorosa y está dispuesta entre dos puntos, donde uno de los extremos indica que no existe dolor, y el otro extremo que existe el máximo dolor imaginable. Estos extremos se corresponden con las puntuaciones de 0 a 10 respectivamente. El paciente debe marcar aquel punto de la línea que mejor refleje el dolor que padece (Price et al., 1983, Yarnitsky et al., 1996).

Su principal ventaja estriba en el hecho de que no contienen números o palabras descriptivas. Al paciente no se le pide que describa su dolor con palabras específicas, sino que es libre de indicarnos sobre una línea continua la intensidad de su sensación dolorosa en relación con los dos extremos de la misma. La VAS es un instrumento simple, sólido, sensible y reproducible, siendo útil para reevaluar el dolor en el mismo paciente en diferentes ocasiones. Su validez para la medición del dolor experimental ha sido demostrada en numerosos estudios, así como su fiabilidad, la cual se ha evaluado, encontrándola satisfactoria en humana

(Price et al., 1983, Yarnitsky et al., 1996) y en veterinaria (Hudson et al., 2004, Fahie et al., 2013).

Entre sus inconvenientes destacan la limitación impuesta por los extremos, la falta de comprensión por parte de los pacientes y la uniformidad en la distribución de las mediciones (Price et al., 1983, Yarnitsky et al., 1996). Además, en medicina veterinaria el principal inconveniente sería que la persona que realiza la valoración del dolor que presenta el paciente es el propietario o, como en nuestro caso, el propietario junto con el veterinario y no es el propio animal el que nos indica su dolor sino que valoramos la percepción del dolor que creemos que tiene el paciente (Hudson et al., 2004).

Escala Kellner-Lawrence

La escala Kellner-Lawrence es una escala subjetiva que se utiliza para la clasificación radiológica del grado de artrosis presente en cualquier articulación. Esta escala se basa en la evaluación de signos radiológicos tales como osteofitos, disminución del espacio articular, esclerosis del hueso subcondral, quistes óseos subcondrales y alteración morfológica de las epífisis óseas, clasificando en base a estos hallazgos el grado de OA presente en la articulación (Wright, 2014, Schiphof et al., 2008).

Teniendo en cuenta los parámetros anteriores, la escala se divide en los siguientes grados:

- **Grado 0:** Articulación normal. Ausencia de osteofitos, estrechamiento o quistes.
- **Grado 1:** Articulación dudosa. Dudoso estrechamiento del espacio articular, con posible presencia de osteofitos.
- **Grado 2:** Artrosis leve. Posible estrechamiento del espacio articular con presencia de osteofitos.
- **Grado 3:** Artrosis moderada. Con estrechamiento del espacio articular. Presencia de moderada a múltiple de osteofitos. Leve esclerosis, con posible deformidad de los extremos de los huesos.
- **Grado 4:** Artrosis grave. Existe un marcado estrechamiento del espacio articular, con abundante presencia de osteofitos. Esclerosis grave, y marcada deformidad de los extremos de los huesos.

Métodos de Diagnóstico

Los biomarcadores utilizados para el diagnóstico de OA pueden clasificarse como biomarcadores secos o biomarcadores solubles. Los biomarcadores secos incluyen la

radiografía, la ecografía y la resonancia magnética. Todos estos biomarcadores son útiles para confirmar el diagnóstico y poder llevar un control de la evolución de la patología y su gravedad. Los biomarcadores solubles o mojados pueden ser indicadores específicos de la inflamación y la degradación de las articulaciones, y se clasifican de acuerdo con el medio en el que se detectan (suero, orina o líquido sinovial) (Ramonda et al., 2013).

Biomarcadores secos (Diagnóstico por imagen)

Entre los métodos de diagnóstico por imagen, el más utilizado y no por ello el que mejores resultados ofrece, es la radiología convencional ya que se trata de una técnica rápida, sencilla y muy económica (Neogi et al., 2009). Otras técnicas más actuales que se utilizan sobre todo en medicina humana, son la ultrasonografía, la artroscopia para la valoración directa del cartílago (condroscopia), la resonancia magnética (RM) y la tomografía computerizada (TC) (Calvo et al., 2001, Braun y Gold, 2012).

Existen además diversas variantes dentro de los métodos ya nombrados, además de métodos utilizados de manera menos frecuente, entre los que se encuentran la macro-radiografía digitalizada, la absorciometría radiológica de doble contraste, la artrotomografía computarizada, la tomografía computarizada de alta resolución con mapeo topográfico de densidad subcondral, la resonancia magnética con inyección de contraste, la artroresonancia magnética, la gammagrafía ósea, la tomografía por emisión de positrones y la tomografía computarizada por emisión de fotones simples, la microtomografía computarizada de rayos x y la tomografía de coherencia óptica entre otros (Braun y Gold, 2012, Roemer y Guermazi, 2012, Rogers et al., 2013, Guermazi et al., 2013).

Radiografía convencional

En cuanto a la radiografía convencional, nos permite una evaluación bidimensional de estructuras tridimensionales, tiene una eficacia limitada en el diagnóstico de la patología, ya que únicamente observamos cambios radiológicos significativos en fases muy avanzadas de la enfermedad. También hay que tener en cuenta que aunque los síntomas de enfermedad tienden a aumentar a medida que aumenta el cambio estructural a nivel radiológico, en muchos casos, los signos clínicos no se correlacionan con los cambios radiológicos, ya que las radiografías sólo pueden mostrar un número limitado de estructuras (Neogi et al., 2009).

Esta técnica nos permite evaluar los cambios morfológicos osteoarticulares que se producen en la patología, al mismo tiempo que analizamos indirectamente el grado de afectación del cartílago articular y de los tejidos blandos periarticulares mediante la medición de la distancia

interósea o amplitud del espacio articular. También podemos evaluar la presencia de osteofitos (OF), los cuales se clasifican en cuatro tipos diferentes, marginales, centrales, sinoviales y capsulares, cuya apariencia radiográfica es también diferente. Los OF marginales aparecen como neoformaciones de hueso nuevo en los márgenes articulares (zonas de bajo estrés biomecánico). Los OF centrales aparecen como protuberancias óseas planas o en botón localizadas en áreas centrales de la articulación, lo que determina un contorno articular irregular. Los OF sinoviales se observan radiográficamente como un engrosamiento cortical intraarticular. Y por último, los OF capsulares, producidos por tracción de la cápsula articular, se muestran radiográficamente como una labiación ósea que se extiende siguiendo las líneas de tracción capsular (Braun y Gold, 2012, Sautner y Schueller-Weidekamm, 2013).

Otras alteraciones que se producen en la EDA son esclerosis, quistes o geodas y osteonecrosis. La esclerosis subcondral traduce radiográficamente como el aumento del volumen total del hueso trabecular que se produce en respuesta a un incremento de la carga mecánica. Este tipo de estrés biomecánico provoca micro fracturas en el HS que activan el proceso de remodelado óseo, y como consecuencia, degeneración del cartílago articular y perpetuación del proceso. Los quistes y geodas subcondrales se desarrollan en áreas focales de necrosis ósea, pudiendo ser de tamaño variable, únicos o múltiples, y comunicados o no con el espacio articular. La osteonecrosis aparece en los estadios más avanzados de la enfermedad, reflejando la existencia de zonas sometidas a una elevada carga mecánica y, por lo tanto, a una elevada resorción y neoaposisión ósea en las trabéculas subcondrales existentes (Sautner y Schueller-Weidekamm, 2013).

Resonancia magnética (RM)

Respecto a la RM, es la mejor técnica para realizar un buen diagnóstico de la patología, ya que tiene la gran ventaja de ser capaz de mostrar todas las estructuras dentro de la articulación, manipulando la imagen para poder observar tanto tejidos blandos como hueso, mejorando así la comprensión sobre la asociación entre el cambio estructural y los signos clínicos de la patología, permitiendo de esta forma una evaluación de las modificaciones que ocurren dentro de estas estructuras en el tiempo, mostrando detalladamente las características morfológicas de cada estructura (Haugen et al., 2011, Hunter et al., 2011b).

Algunas de las características que se observan en la OA mediante RM son cambios focales del cartílago articular como adelgazamiento del mismo, acompañados de modificaciones en el HS con crecimientos marginales de crestas óseas (osteofitos), anomalías de la médula ósea, formación de quistes y cambio en la forma de los huesos (Haugen et al., 2011).

Dentro de la RM, existen diferentes técnicas que nos permiten resaltar o mejorar el contraste sobre un tejido específico que nos interese, lo que da más sensibilidad y especificidad a la técnica (Hunter et al., 2011a).

Ultrasonografía

La ultrasonografía o ecografía también proporciona conocimiento sobre la OA aunque carece de la capacidad para evaluar las superficies de cartílago tan detalladamente como la RM y no se puede evaluar el HS (Iagnocco et al., 2010). Es una técnica no invasiva capaz de aportar información iconográfica valiosa, multiplanar y en tiempo real del estado de las estructuras óseas, articulares y periarticulares. Este método de evaluación ha demostrado precisión y fiabilidad a la hora de constatar la presencia de sinovitis ecográfica. Además, es capaz de detectar alteraciones estructurales del cartílago articular, revelando una pérdida de nitidez del borde externo del cartílago hialino en los estadios iniciales de la enfermedad. Igualmente, se ha descrito como signo sonográfico temprano de EDA el incremento del grosor del cartílago, relacionado con la presencia de edema intersticial en el mismo. En los estadios más avanzados de la enfermedad se observa una disminución, focal o generalizada, del espesor del cartílago articular y una pérdida de la morfología de la interfaz cartílago-sinovial, con presencia de fibrilación y/o fisurización en la misma (Guermazi et al., 2008).

Tomografía computerizada (TC)

La TC nos permite obtener imágenes seccionales secuenciales de las regiones articulares y periarticulares a evaluar, presentando como mayor desventaja la menor capacidad de contraste que presenta sobre los tejidos blandos (Guermazi et al., 2008).

Esta técnica hace posible la realización de reconstrucciones multiplanares de igual calidad de imagen que las imágenes seccionales originales, y nos permite visualizar mejor que otras técnicas las calcificaciones periarticulares de los tejidos blandos, alteraciones morfológicas del hueso cortical, cuerpos libres intraarticulares pequeños y presencia de derrame articular, razón por la que se ha convertido en una herramienta muy útil para el diagnóstico de esta patología (Guermazi et al., 2008).

Biomarcadores húmedos

A nivel analítico cabe destacar el uso de biomarcadores de degradación del cartílago, los cuales han sido objeto de una creciente atención debido a su potencial utilidad en la detección de la patología mediante un diagnóstico precoz, además de ser medidas no invasivas y de bajo

coste (Punzi et al., 2005a). La identificación de un único marcador predictivo es probablemente un objeto poco realista, por este motivo las investigaciones actuales se centran en la identificación de combinaciones de varios marcadores capaces de proporcionar información sobre el alcance de la degradación y remodelación del cartílago articular, el metabolismo del HS y cambios reactivos en los tejidos sinoviales y periarticulares (Lotz et al., 2013).

Los marcadores moleculares más útiles en la identificación de la síntesis o la degradación del cartílago se originan de diferentes fuentes articulares tales como el cartílago, hueso y tejido sinovial, y se utilizan como variables indirectas de la evolución y monitorización de la OA, pero siempre teniendo en cuenta que ninguna de ellas está actualmente validada para su utilización en la práctica de la clínica diaria (Poole, 2003, Bauer et al., 2006).

Entre estos marcadores, en medicina humana, se encuentra la proteína oligomérica de la matriz (COMP). Es un componente estructural del cartílago que se sintetiza por los condrocitos y está presente en pequeñas cantidades en la membrana sinovial y el tendón, además de ser detectable en el suero. Estudios previos han demostrado que los niveles séricos de COMP predicen la progresión de la enfermedad, además de ser un indicador temprano de la progresión radiológica de OA (Dragomir et al., 2002, Vilim et al., 2002, Williams y Spector, 2008). También se ha comprobado que COMP es la prueba más sensible para la identificación prematura de sujetos afectados genéticamente por la OA (Williams et al., 2006).

Otro enzima utilizado en medicina humana es la mieloperoxidasa (MPO), una enzima leucocitaria que forma parte del sistema inmune y se libera por los neutrófilos. Concentraciones de MPO elevadas están relacionadas con actividad inflamatoria articular y podrían desempeñar un papel importante en el mantenimiento de estrés oxidativo en la OA. La MPO podría servir como un marcador de diagnóstico para la detección temprana de la OA, ya que en pacientes con OA temprana la actividad de MPO es mayor que en pacientes con OA crónica (Steinbeck et al., 2007).

Hoy en día con la reciente introducción de inmunoensayos de alta sensibilidad, existe un número creciente de estudios que han sugerido que la proteína C reactiva (PCR) puede ser un marcador de la OA y de su gravedad. Parecería que los niveles más altos de PCR pueden predecir el desarrollo de patologías más graves durante los siguiente cuatro años, ya que se ha observado que los niveles más altos de PRC en suero, se corresponden con pacientes que presentan EDA (Punzi et al., 2005b, Punzi et al., 2005c).

Otros biomarcadores descritos en humana son el HA, que es un marcador de la proliferación sinovial y degradación, que parece reflejar la progresión de la OA (Sasaki et al., 2013), el

keratan sulfato en suero (KS), la proteína de quitinasa 3 like 1 (YKL-40), y los telopéptidos carboxi terminales de degradación de colágeno tipos I y II entre muchos otros (Punzi et al., 2005b).

En la especie canina, se han llevado a cabo diferentes estudios en busca de biomarcadores que nos ayuden en el diagnóstico de la OA. Uno de estos estudios realizó un mapeo del proteoma del suero canino antes y después de una transección del ligamento cruzado anterior para determinar de esta manera posibles biomarcadores de la patología. En este análisis se vio que proteínas, tales como fetuina B, complemento C3 y C1s y proteína de la zona embarazo (PZP), se modificaron en suero de la misma manera que ocurría en pacientes humanos con OA, aumentando la concentración de fetuina B, proteína del complemento C3 y PZP, y disminuyendo la concentración de proteína del complemento C1 (Gharbi et al., 2013). La fetuina B es un inhibidor de proteasas cuyo papel fisiológico es poco conocido, pero comparte algunas funciones con fetuina A, la cual desempeña un papel en muchos aspectos fisiológicos, como transporte de ácidos grasos, respuesta a la inflamación sistémica, osteogénesis y resorción ósea, e inhibición de la calcificación (Schafer et al., 2003, Ombrellino et al., 2001). La haptoglobina (HP) es otra proteína que podría ser de interés en la OA canina, ya que se observó una disminución en suero de los animales con OA. La HP desempeña un papel antiinflamatorio en condiciones normales mediante la inhibición de la síntesis de PG. Por este motivo, su disminución en el suero canino podría favorecer el estado inflamatorio que existe en la OA (Jue et al., 1983). Otras proteínas que disminuyeron su concentración sérica en este estudio fueron el inhibidor de proteasas ITIH4, que juega un papel importante en la inflamación y posee la capacidad de unirse covalentemente HA y estabilizar la MEC, y la proteína de unión al ácido hialurónico de plasma (PHBP) (Gharbi et al., 2013).

Otro estudio realizado anteriormente en la misma especie, evaluó los niveles de fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), MMP-2, y el TIMP-2 en el líquido sinovial y el suero de canidos en los que se indujo quirúrgicamente una luxación patelar medial en la rodilla izquierda (Alam et al., 2011). La TRAP se expresa por los macrófagos celulares y células dendríticas que contiene la íntima sinovial (Muir et al., 2005). Estas células mononucleares TRAP positivas, expresan muchas enzimas colagenasas degradativas, incluyendo la catepsina K, la catepsina S, y MMP, por lo que se considera un factor importante en la degradación progresiva e irreversible de la superficie articular (Tsuboi et al., 2003).

Las MMP se producen en los fibroblastos, macrófagos y condrocitos, y su formación está mediada por los macrófagos sinoviales y linfocitos. Estas proteasas participan en la

degradación y remodelación de la matriz extracelular. La actividad proteolítica de las MMP está regulada por inhibidores específicos conocidos como TIMP (Klimiuk et al., 2002).

En los resultados obtenidos en el estudio se observó un aumento significativo en el nivel de TRAP en líquido sinovial y en suero, así como un aumento del número de células TRAP positivas en los tejidos de las articulaciones que se analizaron durante la etapa temprana de la OA indicado que TRAP podría tener un papel potencial en la patogénesis de esta enfermedad. Por otra parte el equilibrio entre MMP y TIMP está estrechamente controlado en las articulaciones sanas. Sin embargo, en la OA, y como se vio en el estudio, la cantidad de MMP se encuentra significativamente aumentada (en líquido sinovial), y la cantidad de TIMP significativamente disminuida (tanto en suero como en líquido sinovial), resultando en la degradación de la MEC (Alam et al., 2011).

Henrotin y colaboradores, en 2012 realizaron otro estudio en el cual se llevó a cabo una evaluación de los biomarcadores Coll2-1 y Coll2-1NO2 en modelos caninos con rotura del ligamento cruzado anterior (Henrotin et al., 2012). Debido a que la degradación del colágeno es una de las principales características del desgaste del cartílago durante la OA, los productos de la degradación del coll-II podrían servir como un biomarcador específico para evaluar la progresión de la enfermedad, ya que estos productos reflejan no sólo la degradación del cartílago, sino también la inflamación y el estrés oxidativo, principales características de la OA, por lo que se considerarían biomarcadores del catabolismo del cartílago (Mobasheri y Henrotin, 2010).

El objetivo de este estudio fue medir los cambios en el tiempo de Coll2-1 y Coll2-1NO2 durante el desarrollo de la OA. En los resultados obtenidos, se observó que ambos biomarcadores se incrementaron significativamente después de la transección del ligamento cruzado anterior. El aumento en el nivel de Coll2-1 se observó tan solo 2 semanas después de la cirugía y el nivel de Coll2-1NO2 aumentó a lo largo del período de estudio llegando a sus niveles máximos 6 y 8 semanas después de la cirugía. Estos datos demostraron que existe una fuerte correlación entre Coll2-1 y Coll2-1NO2 y el nivel de degeneración articular (Henrotin et al., 2012).

Estudios cinéticos

Plataforma de fuerza

El análisis cinético mediante plataforma de fuerza es un método objetivo que cuantifica el apoyo de las extremidades afectadas por la OA. Mediante este método es posible detectar pequeñas variaciones en la fuerza ejercida contra el suelo por la extremidad, evaluando el pico de fuerza vertical (PVF) y el impulso vertical (VI). El PVF cuantifica la máxima fuerza que ejerce la extremidad cuando se produce el apoyo de la misma durante la marcha. El VI evalúa la distribución de fuerzas a través del tiempo (Vilar et al., 2013).

Dichas diferencias a lo largo del tiempo podrán determinar la evolución real y objetiva de la patología, así como la eficacia de los diversos tratamientos, observándose una mejora de los anteriores parámetros cuando la evolución es favorable. (Vilar et al., 2013).

Esto se ha demostrado en el estudio realizado por nuestro equipo de investigadores con los animales evaluados en las Palmas de Gran Canaria, en los cuales, tras la aplicación de los diversos tratamientos se ha visto una mejora significativa de estos parámetros a lo largo del tiempo (Vilar et al., 2013).

Otro estudio realizado por Fahie y colaboradores, demostró el efecto beneficioso del PRP en infiltración intraarticular en perros con OA. Doce semanas tras la aplicación del tratamiento se evaluó el PVF, observándose una mejora de este parámetro, en relación a su valor basal, y en relación al grupo control, en los animales tratados con PRP (Fahie et al., 2013).

Tratamiento

Los tratamientos disponibles para la OA, generalmente producen mejoras sintomáticas, pero no detienen el avance de la patología (Lawrence et al., 2008), por este motivo, los tratamientos actuales van encaminados a paliar el dolor y la inflamación presentes en la zona afectada a la vez que se intenta frenar el avance de la misma, para incrementar así la calidad de vida de los pacientes y permitirles ganar fuerza y movilidad articular. Esto se consigue mediante una combinación de tratamientos farmacológicos y no farmacológicos, ya que, hoy por hoy, dentro de los tratamientos farmacológicos no existe ninguno que por sí solo detenga la progresión de los cambios estructurales que se dan en esta enfermedad (Hunter, 2011, Wenham y Conaghan, 2013, Zhang et al., 2010).

Tratamientos farmacológicos

Antiinflamatorios no esteroides (AINES)

Los AINES son un grupo de compuestos heterogéneos con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, que se utilizan para reducir el dolor, disminuir la rigidez, y mejorar la función en pacientes con OA. El principal mecanismo de acción de estos medicamentos radica en la inhibición de la COX, lo que provoca un bloqueo en la fase inicial de la cascada proinflamatoria de las acciones mediadas por los eicosanoides (Simon, 2013).

Existen muchas formas disponibles de AINES, entre ellas inyectable, tópica y oral. La dosificación oral es la ruta más común, y por lo general se asocia con un uso crónico, por lo tanto el que lleva el mayor riesgo de presentar efectos adversos. Entre los potenciales efectos adversos se incluyen úlceras gastrointestinales con hemorragia consecuente, perforación, obstrucción, disfunción renal e insuficiencia renal consiguiente, efectos cardiovasculares, y en los casos más graves riesgo de muerte (Simon, 2013).

Para evitar la aparición de estos efectos adversos se desarrollaron inhibidores selectivos de la COX-2 esperando que tuvieran acciones terapéuticas similares a los inhibidores no selectivos pero sin causar los efectos adversos citados anteriormente. La caracterización de la estructura tridimensional de las ciclooxigenasas permitió el desarrollo de los COXIBs, los cuales son capaces de inhibir a la COX-2 sin modificar la actividad de la COX-1. El celecoxib (CBX) fue el primer COXIB aprobado para el tratamiento de la OA y de la artritis reumatoide. Este fármaco es capaz de mejorar el dolor y la movilidad de forma similar a los AINES convencionales, presentando menos complicaciones (Clemett y Goa, 2000).

En medicina veterinaria, los AINES suelen ser los primeros fármacos de elección. Como todo tratamiento tiene sus ventajas e inconvenientes, pero bajo un correcto seguimiento y control se pueden administrar durante largos periodos para controlar así el componente inflamatorio, gran causante de dolor en la patología. Antes de pautar cualquier tratamiento con AINES se debe realizar una analítica sanguínea y de orina al paciente, para descartar deshidratación o insuficiencia renal, las dos contraindicaciones para el tratamiento con AINES. Entre los efectos secundarios más nocivos en medicina veterinaria encontramos la ulceración o incluso perforación gastrointestinal. Se debe llevar a cabo un seguimiento de los parámetros hepáticos, además de los renales, ya que cuando no se tolera bien este tratamiento puede ocasionar hepatotoxicidad (Rychel, 2010).

Antiinflamatorios esteroideos

Los corticoides constituyen uno de los grupos farmacológicos más utilizados en el tratamiento de la EDA, sobre todo en inyección intraarticular (Maricar et al., 2013). Se pueden clasificar en función de su vida media biológica en fármacos de vida corta (cortisona), fármacos de vida intermedia (metilprednisona) o fármacos de vida prolongada (dexametasona) (Alvarez, 2006).

Estos compuestos presentan acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras dependiendo de la dosis utilizada. Actúan estimulando la síntesis de la lipocortina I, proteína que bloquea la acción de la fosfolipasa A, por lo que provocan la inhibición de la producción intracelular de PG y LT. Por otra parte, también inhiben la síntesis de enzimas proinflamatorias como colagenasas, elastasa y el activador del plasminógeno, además de disminuir la expresión de diversas moléculas de adhesión y modular la apoptosis linfocitaria (Alvarez, 2006).

Analgésicos

Opiáceos

Los opiáceos son analgésicos fuertes, que por lo general se dan cuando otras intervenciones farmacológicas y no farmacológicas han fallado. Entre los opiáceos más utilizados en medicina humana para la OA se encuentran la morfina, hidrocodona, oxicodona, hidromorfona y fentanilo, utilizado normalmente en parches (Reid et al., 2012).

Un estudio realizado por Papaleontiou y colaboradores mostró que pacientes con EDA en cadera y rodilla tratados con opiáceos mostraron efectos significativamente positivos que consistieron en la reducción del dolor y la discapacidad física, pero no hubo una mejora significativa en la calidad de vida. Además, se dieron efectos adversos de manera frecuente, que incluían estreñimiento, náuseas y mareos, por lo que solicitaron una interrupción del tratamiento en aproximadamente el 25% de los casos (Papaleontiou et al., 2010).

Por estos motivos, las preocupaciones sobre el posible uso indebido de opiáceos o su abuso persisten, por lo que su empleo para el dolor relacionado con la OA sigue siendo controvertido. Una directriz reciente para el manejo del dolor persistente en la OA recomienda que los médicos consideren el uso de opioides para los adultos mayores que no responden al tratamiento con paracetamol y cuyo deterioro funcional o dolor sea moderado o grave (Spitz et al., 2011).

En medicina veterinaria, uno de los opiáceos que se utiliza con más frecuencia para la OA, es el tramadol, opiáceo sintético que tiene un mecanismo de acción dual. Por una parte, posee actividad agonista sobre los receptores opiáceos centrales μ , reduciendo el AMPc intracelular, inhibiendo así la adenilato-ciclasa que, a su vez, modula la liberación de neurotransmisores nociceptivos como la sustancia P, la dopamina, la acetilcolina y la noradrenalina, teniendo como resultado final la inhibición del estímulo nociceptivo. Por otra parte, el tramadol también inhibe la recaptación de norepinefrina y de serotonina en el sistema nervioso central impidiendo así la transmisión del dolor a través de la médula (KuKanich y Papich, 2004, Rychel, 2010).

Paracetamol

Se han realizado diferentes estudios en medicina humana en los que se ha demostrado el efecto beneficioso de este fármaco en la OA, teniendo en cuenta estos resultados junto con el excelente historial de seguridad del paracetamol, se considera el tratamiento de primera elección para el alivio del dolor en esta patología (Zhang et al., 2004b, Juni et al., 2006).

En medicina veterinaria, aunque el uso de paracetamol se considera como una opción para el tratamiento de la OA en los perros, no se han realizado ensayos clínicos controlados para evaluar la seguridad y eficacia de esta droga, por lo que su uso en esta patología no está muy extendido (Johnston et al., 2008).

Otros fármacos analgésicos

Existen muchos otros fármacos utilizados en la terapia de la EDA, entre los que se encuentran:

Gabapentina

Es un derivado del neurotransmisor GABA. Aunque el mecanismo de acción fue pensado inicialmente para ser a través de la transmisión GABAérgica, ahora se cree que es a través del bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje. La gabapentina actúa principalmente por la influencia en el sistema nervioso central y se reconoce como beneficioso para el tratamiento del dolor neurogénico (Curros-Criado y Herrero, 2007).

Amantidina

Es otro tipo de fármaco que se puede utilizar en el tratamiento de la OA para reducir el dolor de las terminaciones nerviosas en estadios de dolor crónico consecuencia de un diagnóstico y tratamiento tardío de la patología. La amantidina se une a receptores del ácido

N-metil-D-aspartato (NMDA) responsables de amplificar las señales de dolor enviadas al cerebro para la percepción del mismo. En algunos casos, este fármaco muestra sinergia con los AINES, por lo que se pueden emplear de manera conjunta, o individualmente para el control del dolor a largo plazo. Entre los efectos adversos podemos encontrar cierta agitación o molestias gastrointestinales, pero en general se tolera bien incluso por pacientes geriátricos comprometidos (Lascelles et al., 2008).

Amitriptilina

La amitriptilina es un antidepresivo tricíclico que se ha utilizado para tratar el dolor crónico y neuropático en los seres humanos. La amitriptilina actúa centralmente mediante la inhibición de la recaptación neuronal de noradrenalina y serotonina. El resultado de esta acción es un aumento en la actividad de las vías inhibitorias descendentes que modulan la entrada aferente nociceptiva. La amitriptilina también puede actuar periféricamente mediante la inhibición de los canales de sodio (Vadalouca et al., 2006). No existen ensayos clínicos publicados que evalúen el uso de la amitriptilina para el tratamiento de la artrosis en perros (Johnston et al., 2008).

Nutracéuticos

La palabra nutracéutico viene de la combinación de las palabras nutrición y farmacéutica, y se trata de productos de origen natural con propiedades biológicas activas beneficiosas para la salud y con una capacidad preventiva o terapéutica definida. Los nutracéuticos son buenos candidatos para la prevención a largo plazo de las enfermedades crónicas, como la artrosis, ya que podrían ayudar a mantener la salud ósea y articular (Henrotin et al., 2011).

Estudios recientes indican que fitoflavonas, polifenoles y bioflavonoides, compuestos naturales que se encuentran en frutas, té, especias, vino y verduras, han mostrado el mayor potencial de modificar la enfermedad osteoartrosica y sus síntomas, debido a las propiedades antiinflamatorias, anticatabólicas, y a los efectos de protección contra el estrés oxidativo de estos compuestos (Shen et al., 2012).

En particular, la glucosamina y el sulfato de condroitina se encuentran entre los nutracéuticos más comunes utilizados para el tratamiento de la OA. La glucosamina es un aminosacárido aislado inicialmente de la quitina de crustáceos, se trata de un componente importante en las cadenas de glucosaminoglicanos y en la producción de proteoglicanos, una importante proteína de la matriz extracelular del cartilago. El sulfato de condroitina es un glicosaminoglicano utilizado en la síntesis de proteoglicanos (Black et al., 2009). Además el

ácido hialurónico (AH), un polisacárido de origen natural, que se encuentra como el componente viscoso del líquido sinovial, actuando como lubricante y ayudando a absorber y amortiguar los movimientos, también se encuentra entre los nutraceuticos más utilizados en la clínica diaria, sobre todo en infiltración intraarticular. Algunos estudios han demostrado que estos tres compuestos pueden ayudar a reducir el dolor asociado a la patología, mientras que otros lo que recalcan es su efecto condroprotector (Akhtar y Haqqi, 2012, Henrotin et al., 2011).

Otro producto incluido dentro de los nutraceuticos es el ácido graso Omega-3 que se utiliza en estados de inflamación crónica tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. Los ácidos grasos Omega-3 tienen propiedades antiinflamatorias, además de incorporarse en las células que forman parte de la membrana sinovial y otras estructuras articulares dando lugar a una disminución de la magnitud de la cascada inflamatoria en la articulación afectada por la patología. A parte de esto, éstos ácidos grasos, tienen muchos beneficios adicionales para la salud sobre todo sobre el sistema cardiaco y renal, además mejora la enfermedad atópica en dermatología (Hansen et al., 2008, Bauer, 2007).

Tratamientos no farmacológicos

Laser de baja intensidad

Se utiliza como terapia no invasiva coadyuvante que proporciona una disminución del dolor en casos de OA. Este tipo de terapia presenta muchas ventajas, ya que puede ser utilizada donde están contraindicadas otras modalidades terapéuticas, como por ejemplo en pacientes con marcapasos, implantes metálicos, quemaduras, heridas y áreas anatómicamente peligrosas, además de poder utilizarse en personas inmunodeprimidas. Tiene un bajo coste, y su aplicación, disminuye el espasmo muscular y mejora la circulación aumentando el aporte sanguíneo en la articulación, siendo en general una terapia bien tolerada por las personas y los animales. Estudios previos han demostrado su efectividad sobre la proliferación de fibroblastos, osteoblastos, síntesis de colágeno y regeneración ósea (Hegedus et al., 2009, Al Rashoud et al., 2013).

Ultrasonidos

Los ultrasonidos se utilizan para aportar calor a los tejidos más profundos, ayudando así a controlar el dolor y mejorar la extensibilidad de los tejidos. Las ondas de sonido se convierten en calor a medida que se absorben en los músculos. Se puede alcanzar una profundidad de 5

cm, causando una elevación de la temperatura a 40 a 45 °C. Los ultrasonidos también producen la estimulación de la actividad fibroblástica, aumentando el metabolismo celular, lo que ocasiona una mejora en la circulación y un aumento en la fuerza y la flexibilidad de los tendones. Entre los efectos atribuidos al aumento de la temperatura, se incluyen el aumento de permeabilidad de la membrana celular, el transporte de calcio, la eliminación de células de la sangre desde el espacio intersticial, y aumento de la actividad fagocitaria de los macrófagos (Cakir et al., 2013).

Acupuntura

Es un tipo de terapia coadyuvante en el tratamiento de la OA. La acupuntura es una terapia original de la medicina tradicional china, que utiliza pequeñas agujas finas las cuales son manualmente insertadas en puntos anatómicos específicos del cuerpo. Existen más de 2000 puntos de acupuntura en el cuerpo humano clasificados en 14 grupos separados. La línea imaginaria que conecta los puntos de cada grupo se denomina “meridiano”, la punción de estos puntos sirve para desbloquear las vías de flujo natural de energía. Hay, por tanto, 14 meridianos, de estos, 12 se encuentran a ambos lados del cuerpo (son bilaterales) mientras que los 2 restantes se encuentran en la línea media. Cada meridiano tiene un trayecto definido en el cuerpo, que se divide en dos partes; la vía interna y la vía externa. La interna tiene su origen en un órgano, recorre internamente el cuerpo y se conecta a la ruta externa en el punto de acupuntura. La ruta externa finaliza en la terminal del punto de acupuntura y se conecta a otra ruta interna, llevándola de regreso al órgano de origen, convirtiendo el meridiano en un circuito cerrado (Fang et al., 2013, Vickers et al., 2012).

La acupuntura ha demostrado ser eficaz en el alivio del dolor y la disfunción asociada con condiciones musculoesqueléticas, incluyendo la osteoartritis (Lu et al., 2010).

Estimulación eléctrica

La estimulación eléctrica se utiliza para aumentar la fuerza muscular, mejorar el rango de movimiento articular, reeducar los músculos y disminuir el edema y el dolor. En la estimulación eléctrica la corriente pulsada puede ser alterna o bifásica, o directa o monofásica. La estimulación nerviosa eléctrica transcutánea (TENS) se utiliza para tratar el área del dolor y para combatir la atrofia muscular (Mascarin et al., 2012).

Un electrodo se coloca sobre el punto motor del músculo y el otro a lo largo del vientre del músculo. Habitualmente, los tratamientos duran de 20 a 30 minutos. El estimulador neuromuscular se puede ajustar con una frecuencia específica (Hertz, pulsos por segundo),

amplitud y duración del pulso. La amplitud y la duración del pulso se deben ajustar para hacer el tratamiento más cómodo para el paciente. El ciclo de trabajo óptimo depende de la condición que esté siendo tratada (Mascarin et al., 2012).

Reducción del peso

Estudios recientes han demostrado una relación directa entre la pérdida de peso y el nivel de mejora de los síntomas en pacientes obesos con OA (Christensen et al., 2007). Estos hallazgos apoyan los resultados epidemiológicos previos que muestran que la pérdida de peso reduce el riesgo de desarrollar o experimentar artrosis de rodilla en humana, y que los síntomas relacionados con la patología tienden a empeorar en pacientes obesos. Como consecuencia de ello, en los pacientes con sobrepeso actualmente se recomiendan bajar de peso como primera opción terapéutica (Zhang et al., 2010, Gudbergsen et al., 2012).

En la especie canina, se ha demostrado de la misma manera que la disminución de la ingesta de calorías y la reducción del peso del animal, puede prevenir o disminuir los signos clínicos de la patología y mejorar la movilidad articular, con el consecuente aumento de la calidad de vida, a la vez que su aumenta también la longevidad de los mismos (Smith et al., 2006, Impellizeri et al., 2000).

Tratamiento quirúrgico

Artroscopia

La cirugía artroscópica es una de las intervenciones quirúrgicas más comunes en humana, sobre todo en OA leve o moderada de rodilla, y cada vez se utiliza más en medicina veterinaria (Mariee et al., 2014). Existen varias técnicas diferentes, incluyendo el lavado simple, desbridamiento y abrasión, intentando de esta manera reparar lo máximo posible los defectos del cartílago (Juni et al., 2006, Katz et al., 2014).

A mediados de la década de 1980, con la evidencia de varias ventajas de la artroscopia sobre los procedimientos de cirugía abierta, la artroscopia se convirtió en uno de los métodos preferidos de tratamiento cuando estaba indicado (Bigony, 2008). Los primeros estudios mostraron que la artroscopia en general, daba lugar a menos dolor y la inflamación post quirúrgica que los procedimientos abiertos, y además, disminuía el riesgo de complicaciones como la infección, y artrofibrosis, lo que permitía al paciente retornar al trabajo, y a sus actividades normales más rápidamente (Treuting, 2000).

Mediante la artroscopia, se puede realizar la extracción de cuerpos libres o eliminar crecimientos óseos, que provocan limitación dolorosa de la movilidad. Puede ser útil para la eliminación de sinovitis reactivas crónicas, rigidez articular y para el mismo lavado articular. Todo ello va encaminado a dejar la articulación en las mejores condiciones mecánicas posibles, lo que ayudará a que tratamientos posteriores obtengan un mejor resultado (Liu et al., 2013, Mayr et al., 2013).

En las últimas décadas ha habido controversia en cuanto a los resultados de esta técnica en el tratamiento de la patología artrósica. Un estudio muy importante se realizó en 2002 por Moseley y colaboradores. En este estudio se incluyeron 180 pacientes con artrosis de rodilla los cuales se asignaron al azar en 3 grupos de estudio, recibiendo cada grupo uno de estos tratamientos: artroscopia de desbridamiento, lavado artroscópico, o cirugía placebo. Los pacientes del grupo de placebo recibieron incisiones en la piel y se les realizó un desbridamiento simulado sin inserción del artroscopio. No existieron diferencias significativas entre ninguno de los grupos en los parámetros evaluados (Moseley et al., 2002).

En cambio otro estudio realizado en 2013 por Mayr y colaboradores, concluyó que el tratamiento mediante artroscopia en la OA sí que es efectivo en la mayoría de casos, pero ofrece mejores resultados bajo ciertas condiciones como OA no muy avanzada, sin presencia de edema óseo en resonancia magnética, en personas menores de 60 años y pacientes con aparición reciente (menor a 6 meses) de los síntomas (Mayr et al., 2013).

Reemplazo protésico

Los tratamientos quirúrgicos mediante reemplazo protésico únicamente se plantean cuando los tratamientos terapéuticos y farmacológicos previos no han aportado mejora en la capacidad de movimiento y disminución del dolor (Hermida 2010). En Estados Unidos 27 millones de adultos, es decir, más del 10% de la población adulta padece la OA. De ese número de personas, 21 millones, padecen limitaciones asociadas con la OA, existiendo 36 millones de consultas ambulatorias, y 750.000 hospitalizaciones por año (Murray et al., 2012, Murphy y Helmick, 2012).

En 2005, y en 2009 la OA fue la cuarta causa más común de hospitalización, y la principal indicación para la cirugía de reemplazo articular. En 2009 se dieron un total de 905.000 reemplazos de rodilla y cadera, con un coste de 42.3 mil millones de dólares (Murphy y Helmick, 2012). Estimaciones recientes sugieren que la OA, solo de rodilla, afecta a aproximadamente 250 millones de personas en el mundo (Murray et al., 2012).

En medicina humana cuando la OA es grave y los pacientes superan los 60 años, el tratamiento más usado es el reemplazamiento protésico de la articulación mediante artroplastia. En pacientes más jóvenes, no está aconsejada esta intervención, ya que las prótesis presentan un tiempo de vida limitado, haciendo necesaria otra intervención tras 12-18 años (Hermida 2010).

Estudios recientes indican que la realización del reemplazo articular antes de una disminución funcional grave puede estar asociada con un mejor resultado. Existen una serie de directrices orientativas con respecto a qué pacientes son los más adecuados para el procedimiento, éstas se basan en la intensidad del dolor, la aparición de dolor nocturno o dolor en reposo y el grado de pérdida funcional (Nakai et al., 2013).

Resultados más favorables se observan en personas entre 50 y 75 años de edad con dolor intenso, relativamente bajo índice de masa corporal y bajo riesgo perioperatorio. La situación es más complicada en personas con obesidad, y para aquellos que son más jóvenes de 50 años o mayores de 75 años (Scott et al., 2003).

Entre los efectos adversos o desventajas que se pueden dar en un reemplazo protésico se encuentran la mortalidad, la morbilidad, la necesidad de revisiones periódicas, y el hecho de que alrededor del 10 % de los operados parecen obtener pocos beneficios. La mortalidad en medicina humana después del reemplazo de cadera o rodilla se estima alrededor de 1 % en los primeros 3 meses, pero la mayoría de las muertes prematuras ocurren en los pacientes que están enfermos en el momento de la cirugía, como por ejemplo los que tienen fracturas en la misma extremidad afectada. La infección en la articulación protésica puede ocasionar la necesidad de una cirugía de revisión temprana. Otro de los problemas es el aflojamiento aséptico, causa principal de las revisiones posteriores y que es cada vez más común después de 10 años de la intervención quirúrgica (Fortin et al., 2002).

Las técnicas quirúrgicas y diseños de prótesis están cambiando continuamente, tanto de cadera como de rodilla. Los tipos de prótesis se clasifican en función de los componentes que se implantan en prótesis totales o parciales, y en función de la forma de anclaje en no cementadas o cementadas (Robertsson et al., 2000).

Nuevas terapias regenerativas: implante tisular y celular

Este tipo de terapias más novedosas, se dirigen principalmente a vencer la dificultad regenerativa del cartílago, manteniendo o mejorando la estructura y función articular mediante el fomento de los fenómenos regenerativos o reparativos sobre los degenerativos.

Estos fenómenos de reparación y remodelación se llevan a cabo mediante la implantación de tejidos o nuevas células con capacidad condrogénica, y favoreciendo o facilitando el acceso del sistema vascular, siendo de esta manera, una alternativa a terapias más agresivas y que causan mayor daño en el (Williams et al., 2012).

Penetración del hueso subcondral

Mediante la penetración del hueso subcondral, lo que pretendemos realizar es una abertura del área vascular subcondral para favorecer el aporte sanguíneo al área lesionada proporcionando un ambiente adecuado para la formación de tejido nuevo (Johnson y Pittsley, 2006, Steadman et al., 2006).

Existen varias técnicas quirúrgicas para el acceso al área vascular subcondral, como la abrasión artroscópica, la perforación del hueso subcondral, la esponjialización y la microfractura (Steadman et al., 2006, Johnson y Pittsley, 2006) .

Cuando penetramos en el hueso subcondral, provocamos una hemorragia en la zona. Junto con la sangre se produce la liberación de factores quimiotácticos y factores de crecimiento que atraen a macrófagos y células mesenquimales no diferenciadas. Al cabo de los días, el coágulo sanguíneo se reabsorbe por los macrófagos, pero las células no diferenciadas se multiplican y se diferencian en fibroblastos, elaborando un tejido fibroso. Bajo el efecto de estímulos mecánicos, el tejido sufrirá una metaplasia condroide donde los fibroblastos se diferenciarán en condrocitos, formándose finalmente un tejido fibrocartilaginoso que rellenará la herida. Este tejido de reparación es muy diferente al tejido articular normal ya que es menos organizado, más vascular y biomecánicamente diferente en contenido de agua, proteoglicanos y tipo de colágeno, predominando el colágeno tipo I. Desde el punto de vista mecánico este tejido de reparación dura menos y es diferente en su estructura (Safran y Seiber, 2010, Mika et al., 2011).

Las indicaciones para este tipo de procedimientos son lesiones osteocondrales degenerativas y lesiones traumáticas del cartílago que afectan todo el espesor del cartílago, es decir, que llegan al hueso subcondral, pero sin llegar a ser de gran tamaño. En general los orificios se practican desde la periferia del defecto, inmediatamente adyacentes al margen del cartílago sano, hacia el centro del defecto. Una vez realizada la microfractura, se observan gotas de grasa y sangre en los orificios con el objetivo de la formación y estabilización de un coágulo rico en médula ósea que recubre la lesión (Solheim et al., 2010).

Injertos de periostio, pericondrio y osteoperiósticos

Los injertos de periostio y pericondrio se utilizan para la introducción de una nueva población celular incluida en una matriz orgánica. Ambos tejidos tienen el mismo origen embrionario, pero el periostio es mucho más abundante que el pericondrio. El periostio consta de una capa externa fibrosa, que contiene fibroblastos, pero en su capa profunda los dos tejidos están compuestos por células mesenquimales indiferenciadas, que pueden experimentar condrogénesis u osteogénesis para reparar o repoblar el tejido dañado (Carranza-Bencano et al., 2000).

Mediante la implantación de estos tejidos, se forma un tejido de reparación fibrocartilaginoso que parece no madurar con el tiempo, teniendo en cuenta que con la edad del paciente, disminuye el potencial condrogénico del periostio, ya que disminuye la capacidad de las células mesenquimales de proliferar y diferenciarse hacia condrocitos (Trzeciak et al., 2006).

En un estudio realizado por Carranza y colaboradores, se vio que existe una capacidad limitada de reparación en defectos de cartílago de espesor total, donde no se conseguía regenerar todo el defecto, cubriéndose el mismo de un tejido fibrocartilaginoso con pocas áreas de cartílago hialino. En cambio, teniendo en cuenta parámetros como el tamaño de la lesión, su ubicación en un área de soporte de peso y utilizando un adhesivo de fibrina para una mejor adherencia, se conseguía una regeneración principalmente de cartílago hialino, cuyas características se mantenían o incluso mejoraban a medida que aumentaba el tiempo de seguimiento (Carranza-Bencano et al., 2000).

Los injertos osteoperiósticos se tratan de cilindros de hueso recubiertos de periostio que se utilizan para el tratamiento de defectos osteocondrales. Los injertos osteocondrales presentan la ventaja de suministrar matriz y condrocitos viables que mantengan a esa matriz. A la vez, el sangrado de médula ósea en la lesión puede interferir con la acción reparadora de la capa germinal del periostio, produciendo mayor efecto beneficioso debido a la liberación de factores quimiotácticos y de crecimiento (Hu et al., 2013).

En un estudio realizado recientemente por Hu y colaboradores en 2013 observaron que los injertos autólogos de cilindros osteoperiósticos de cresta ilíaca son un procedimiento simple, seguro y eficaz para el tratamiento de grandes lesiones osteocondrales reparando el defecto del cartílago (Hu et al., 2013).

Mosaicoplastia

La mosaicoplastia consiste en la obtención de injertos osteocondrales cilíndricos de pequeño tamaño de zonas poco comprometidas con la absorción de cargas, para posteriormente colocarlas en la zona afectada por la EDA. El área donante se autorrepara con células mesenquimales del estroma de la médula ósea provenientes del sangrado que promueven la formación de un tejido fibrocartilaginoso (Hangody y Fules, 2003).

Esta técnica se recomienda sobre todo en lesiones condrales pequeñas sin lesión del hueso subcondral en pacientes jóvenes. Actualmente, en medicina humana se lleva a cabo en lesiones localizadas principalmente en la cúpula del astrágalo, en la meseta tibial, en el capitelum humeral, en la cabeza humeral y en la cabeza femoral. Entre las ventajas de la técnica encontramos que se trata de un trasplante de cartílago hialino viable que se puede realizar en un único tiempo quirúrgico y mediante una cirugía artroscópica. Además al ser un procedimiento autólogo no implica riesgo de transmisión de enfermedades, ni problemas inmunológicos. En contraposición, las principales desventajas de la técnica son la limitación y morbilidad de la zona dadora, a la vez que la incompleta cobertura del defecto o los problemas que ocasiona la incorrecta colocación de los cilindros haciendo que estos sobresalgan respecto a la superficie articular (Reverte-Vinaixa et al., 2013, Radulescu et al., 2010).

Estudios en los que se ha realizado esta técnica, han observado que después del implante osteocondral, existe una congruencia de las superficies articulares, y una supervivencia del cartílago hialino trasplantado, a la vez que se da una reparación fibrocartilaginosa de las zonas donantes (Hangody y Fules, 2003, Reverte-Vinaixa et al., 2013, Radulescu et al., 2010).

Trasplante de condrocitos

Los principios de esta técnica se basan en la capacidad de adhesividad de los condrocitos y otras células a ciertas superficies del cartílago articular dañado, sobre las que se esparcirán y proliferarán produciendo su matriz extracelular específica, formando así un nuevo tejido que ayudará a reparar la lesión (Foldager, 2013).

En la década de 1970 el médico sueco Lars Peterson estaba preocupado por la ausencia de un buen tratamiento para las lesiones del cartílago en sus pacientes, esto le llevó a la idea del cultivo de condrocitos autólogos para ampliar el número de células y volver a implantarlas en un defecto del cartílago bajo una membrana perióstica. En 1982 el mismo Dr. Peterson junto con el profesor Víctor Frankel empezaron a trabajar en un modelo de conejo y en 1984 se

presentó la primera evidencia de la regeneración del cartílago por implantación de condrocitos autólogos (Grande et al., 1987).

En 1997, la Sociedad Americana Food and Drug Administration (FDA) aprobó la tecnología celular que usa los condrocitos autólogos para reparar lesiones en el cartílago articular de la rodilla. Este fue el primer tipo de tecnología celular regulado por la industria para uso en trasplante humano (Brittberg et al., 2001).

La implantación de condrocitos autólogos es un procedimiento de dos etapas, en una primera etapa, se realiza una biopsia mediante artroscopia de una zona del cartílago de la articulación afectada donde no exista carga de peso. Las células de la biopsia son aisladas y expandidas *in vitro* para aumentar el número de células. Inicialmente estas células se cultivaban durante 2-3 meses mientras que actualmente el tiempo de cultivo es de 4 a 6 semanas. Después estas células son reimplantadas en el defecto en un segundo procedimiento quirúrgico. Existen diferentes maneras de reimplantar estas células, en una primera generación, estos implantes se colocaban debajo de una cubierta de periostio. A continuación la segunda generación de implantes colocaban los condrocitos debajo de una membrana, a menudo realizada con colágeno de tipo I o III y, finalmente, los más actuales son los implantes de tercera generación sembrados ya directamente sobre una matriz que hace de andamio (Foldager, 2013).

Existen diferentes estudios que parecen indicar que el implante de condrocitos autólogos no sólo produce reparación, sino que es capaz de inducir la regeneración del cartílago articular, debido al remplazo y la remodelación de una matriz inicialmente fibrocartilaginosa, mediante degradación enzimática y síntesis de colágeno tipo II (Tins et al., 2005, Minas et al., 2014).

Otras alternativas terapéuticas al trasplante autólogo de condrocitos son el alotrasplante y el xenotrasplante de condrocitos, de manera que se evita el daño añadido a la articulación durante el autotrasplante para la obtención de condrocitos aislados para su posterior cultivo. Las características inmunológicas de este tipo de células han sido motivo de múltiples estudios, los cuales encuentran en la barrera inmunológica una de sus principales objeciones, aunque el cartílago articular presenta muchos menos inconvenientes que otros tejidos. Si bien, los condrocitos aislados resultan inmunogénicos, el aloimplante de condrocitos atrapados en su propia MEC o embebidos en geles produce nulas o escasas reacciones de rechazo. En el caso del xenotrasplante *in vivo* de condrocitos de cerdo en defectos condrales de conejo cubiertos con membrana de periostio no se observaron signos de infiltración de células inmunes,

obteniendo buenos resultados con la técnica (Ramallal et al., 2004, Giza y Howell, 2013, Triche y Mandelbaum, 2013).

Biomateriales: Plasma rico en plaquetas

Los biomateriales son todos aquellos compuestos farmacológicamente inertes que se han diseñado para ser implantados o incorporados en un ser vivo. Sus propiedades mecánicas y biológicas principales son biocompatibilidad con el tejido receptor, integración con los tejidos nativos, posibilidad de reabsorción, manipulables, estabilidad mecánica, que permitan la migración celular, la proliferación celular, el intercambio de nutrientes y metabolitos y la adhesión de células y moléculas (Frenkel y Di Cesare, 2004).

Actualmente los biomateriales se dividen en dos tipos, los naturales y los sintéticos. Dentro de cada uno de los dos tipos existen multitud de compuestos en estudio, con resultados aún controvertidos. Uno de los biomateriales de origen natural más utilizado hoy en día es el plasma rico en plaquetas (Tuli et al., 2003).

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) se define como un producto biológico autólogo, derivado de la sangre del paciente, y en el cual tras un proceso de centrifugación se obtiene una fracción plasmática con una concentración de plaquetas mayor que la existente en sangre circulante (Ahmad et al., 2012, Marx et al., 1998). Las plaquetas contenidas en esa fracción de plasma pueden ser activadas artificialmente para que liberen el contenido del interior de sus gránulos. Entre las sustancias contenidas en el interior de los gránulos plaquetarios se encuentran diversos factores de crecimiento (Anitua, 1999, Marx et al., 1998).

Los factores de crecimiento son un grupo de sustancias de naturaleza polipeptídica, solubles y difusibles, que tienen la capacidad de regular el crecimiento, diferenciación y fenotipo de numerosos tipos de células. Son sintetizados por una amplia variedad de tipos celulares, y pueden ejercer su efecto sobre el metabolismo celular a nivel local, o bien pasar a circulación sistémica. En circulación, los factores de crecimiento se pueden encontrar libres o unidos a proteínas, o bien se pueden encontrar en el interior de los gránulos α de las plaquetas, de los cuales serán liberados tras el proceso de activación plaquetaria (Grageda, 2004, Canalis, 1992). A nivel local, los factores de crecimiento pueden actuar de forma autocrina (sobre las mismas células que los producen) y/o paracrina (sobre otras estirpes celulares situadas en las cercanías), regulando las funciones celulares (Canalis, 1992, Grageda, 2004).

La aplicación del PRP en las articulaciones osteoartrosicas está destinada a desencadenar, fomentar e imitar el proceso fisiológico de regeneración y reparación que se pone en marcha

espontáneamente en los tejidos tras una lesión. Este proceso se basa sobre todo en la función que ejercen las proteínas interviniendo en la comunicación celular, transmitiendo su información al interactuar con los receptores de la membrana celular, dando lugar a una migración celular dirigida, proliferación y diferenciación celular entre otros, aumentando así la actividad celular que tendría lugar de forma fisiológica (Fortier et al., 2011, Goldring et al., 2006, Shi et al., 2009).

Existen diferentes estudios que avalan la eficacia de este tratamiento. Algunos ejemplos de los estudios realizados en medicina humana son el de Wang y colaboradores, los cuales obtuvieron una mejora significativa en la función y calidad de vida de los pacientes con osteoartrosis de rodilla a los 6 meses post tratamiento (Wang-Saegusa et al., 2011), o el de Sánchez y colaboradores, que compararon la eficacia de la infiltración intraarticular de PRP en comparación con ácido hialurónico, obteniendo resultados más favorables en el grupo tratado con PRP 5 semanas después del tratamiento (Sanchez et al., 2008). En medicina veterinaria se han obtenido también resultados muy satisfactorios, como por ejemplo los de Kwon y colaboradores que consiguieron mejoras macroscópicas e histológicas en conejos con enfermedad degenerativa articular tratados con PRP (Kwon et al., 2012), al igual que Serra y colaboradores los cuales observaron que la evolución del tejido dañado tratado con PRP autólogo mostró una tendencia positiva hacia la reparación en el tiempo (Serra et al., 2012). Otro estudio de Milano y colaboradores también apoya la eficacia de este tratamiento en modelos ovinos que padecían la patología (Milano et al., 2010). En perros, también se están llevando a cabo estudios con PRP, como por ejemplo Silva y colaboradores, que han demostrado que tras la cirugía de ligamento cruzado anterior no existió una evolución de la artrosis en los pacientes tratados con plasma rico en plaquetas (Silva et al., 2013).

Por todo esto, el PRP juega un papel crucial en el tratamiento de la enfermedad fomentando la reparación y remodelación del tejido lesionado, así como evitando la degradación del cartílago y la atrofia de las estructuras peri articulares (Anitua et al., 2013a).

Células madre mesenquimales

En los últimos años las células madre (CM) han generado enormes expectativas y se han convertido en una gran esperanza para el desarrollo de nuevas terapias celulares en el contexto de una medicina regenerativa (Diekman y Guilak, 2013, Fortier y Travis, 2011)

Las células madre o células troncales, son un tipo especial de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades y llegar a producir células especializadas (Diekman y Guilak, 2013).

Las células madre de origen adulto, dentro de las cuales encontramos las células madre mesenquimales, son una muy buena opción terapéutica para diversas patologías ya que están presentes en gran cantidad de órganos y tejidos conectivos postnatales, y no están sujetas a las mismas restricciones que las células madre embrionarias (ESC) (Mizuno et al., 2012). Estas células poseen una serie de características que las definen como su capacidad de autorrenovación, su multipotencialidad y la viabilidad funcional de las células que generan (Cahan y Daley, 2013, Kolios y Moodley, 2013).

El tratamiento de la enfermedad degenerativa articular con células mesenquimales, tiene diferentes efectos, por una parte reduce el dolor y la dependencia a los medicamentos, además las células secretan proteínas que son conocidas por su potencial antiinflamatorio, también poseen diversas proteínas minimizadoras de varios marcadores de estrés en las células que las rodean, y por último, las células se instalan en los tejidos de alrededor y generan nuevo cartílago, lo cual ralentiza la degeneración y favorece la cicatrización intraarticular, mejorando de esta manera el estado general de los pacientes (Black et al., 2007).

Existen diversos estudios realizados en diferentes especies animales que demuestran la eficacia de este tipo de terapia en el tratamiento de lesiones degenerativas en el cartílago articular, como el realizado por Mokbel y colaboradores, que utilizaron células mesenquimales en el tratamiento de la osteoartrosis en burros demostrando una mejora significativa en los signos clínicos, así como en los radiológicos, al igual que modificaciones histopatológicas observando células mesenquimales integradas tanto en la superficie, como en el interior del cartílago, manteniéndose como células mesenquimales o diferenciándose a condrocitos (Mokbel et al., 2011). Otros estudios se han realizado en ratas con lesiones condrales de rodilla tratadas con inyección intraarticular de células mesenquimales, demostrando que estas células se movilizaban hacia los tejidos afectados y contribuían a la regeneración tisular (Agung et al., 2006, Nishimori et al., 2006). Lee y colaboradores utilizaron células mesenquimales autólogas en rodillas porcinas para regenerar los defectos creados experimentalmente en el tejido cartilaginoso, obteniendo una reparación mayor en el grupo experimental que en el grupo control (Lee et al., 2007). En animales domésticos también se ha demostrado la efectividad de su uso en esta patología, así Black y colaboradores han llevado a cabo diversos estudios en perros con osteoartrosis en cadera y rodilla, los cuales tras ser tratados con células

mesenquimales derivadas de la grasa de forma intraarticular observaron una reducción del dolor que presentaban los pacientes, así como una mejora en la cojera y un aumento del rango de movilidad (Black et al., 2008, Black et al., 2007).

En humana también se han realizado diversos estudios que apoyan la eficiencia de este tratamiento tanto con células mesenquimales como con células hematopoyéticas. Existe un estudio realizado en 24 pacientes con osteoartritis de rodilla a los cuales se les infiltró células madre procedentes de médula ósea, observándose en el grupo tratado con células una mejora artroscópica e histológica en comparación con los restantes grupos (Wakitani et al., 2002), o el realizado por Kudora y colaboradores que concluyeron que el trasplante de células procedentes de médula ósea autólogas promueve la reparación de grandes defectos focales del cartílago articular en pacientes jóvenes y activos (Kuroda et al., 2007). Los estudios realizados en medicina humana con pacientes que presentaban OA y que fueron tratados con células mesenquimales también obtuvieron resultados satisfactorios, reduciendo los síntomas de enfermedad y con esto aumentando la satisfacción del paciente ante el tratamiento, demostrando además el potencial regenerativo inducido en el cartílago (Emadedin et al., 2012, Davatchi et al., 2011, Koh et al., 2013).

Teniendo en cuentas estos estudios, podemos decir que las células madre adultas tienen el potencial de diferenciarse en múltiples linajes integrándose así en articulaciones afectadas por la OA. Estas células se encuentran en variedad de tejidos y tienen la capacidad de migrar a los lugares de lesión donde ejercen un considerable efecto inmunomodulador y antiinflamatorio que se lleva a cabo a través de la interacción celular directa o de mediadores solubles. El uso de células mesenquimales en la regeneración tisular representa una vía prometedora para el tratamiento de enfermedades degenerativas del cartílago abriéndose un amplio campo de estudio sobre su papel en la fisiopatología de la OA (MacFarlane et al., 2013).

Terapia génica

En las últimas dos décadas, la medicina regenerativa ha ido centrado más atención en el potencial de la terapia génica para el tratamiento de lesiones locales y trastornos sistémicos. Cada vez existen más aproximaciones de la terapia génica que se han adoptado con éxito en modelos preclínicos para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades locales que afectan a casi todos los tipos de tejido, como por ejemplo la OA (Giatsidis et al., 2013).

El proceso que se da en la terapia génica consiste en determinar los genes adecuados y las células propicias para la transferencia génica, e incorporar los ADNc (ácido desoxirribonucleico

complementario) en vectores, para que así estos genes se expresen en el paciente (Trippel et al., 2004).

Uno de los estudios más recientes y más esperanzadores es el de Ruan y colaboradores, basado en la lubricina, también llamada proteoglicano 4, o PRG4. Se trata de una proteína que tiene una acción lubricante y se encuentra en la superficie del cartílago y el líquido sinovial. Existen personas que no tienen capacidad de segregar esta proteína a causa de una rara enfermedad genética, sufriendo artrosis desde la infancia. Por este motivo, en el estudio, se preguntaron si la falta de lubricina sería causante de la artrosis. Para averiguar esto, Ruan y su equipo realizaron una serie de experimentos con un tipo ratones que sufren una forma de artrosis similar a la humana. Les administraron una terapia génica, que consistió en inyectar el gen de la lubricina en las articulaciones para que sus propias células produjeran mayor cantidad de la proteína. Observaron que, a medida que los ratones envejecían, sus articulaciones se mantenían tan sanas como en animales jóvenes. También vieron que los ratones que tenían lesiones traumáticas en las articulaciones no desarrollaban artrosis, además no observaron ningún efecto secundario adverso del tratamiento. Con todo esto, se vio, que la lubricina no sólo tiene una acción lubricante sino que además previene el deterioro del cartílago en la articulación (Ruan et al., 2013).

Plasma Rico en Plaquetas

Los preparados plasmáticos ricos en plaquetas empezaron a desarrollarse a principios de los años 90, siendo sus primeras aplicaciones en cirugías cardíacas (Ferrari et al., 1987). A finales de los 90, se introdujo su uso en cirugía bucal (Whitman et al., 1997), y a partir de ese momento empezó su utilización en diversos campos, como en cirugía general, cirugía plástica, neurocirugía, cirugía vascular, oftalmología, cirugía maxilofacial, ortopédica, etc. (Floryan y Berghoff, 2004, Sampson et al., 2008).

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) se define como un producto biológico autólogo derivado de la sangre, en el cual tras un proceso de centrifugación se obtiene una fracción plasmática con una concentración de plaquetas por encima de la línea basal. Es una forma de coágulo sanguíneo autólogo que contiene un número favorablemente elevado de plaquetas y presenta un pH aproximado de 6,6, además, al provenir de la propia sangre del paciente está libre de enfermedades transmisibles y no causa reacciones adversas de hipersensibilidad (Marx, 2001).

Las plaquetas contenidas en esa fracción de plasma pueden ser activadas artificialmente para que liberen el contenido del interior de sus gránulos. Entre estas sustancias, se encuentran diversos factores de crecimiento (FC), los cuales, como ya hemos comentado anteriormente, son moléculas polipeptídicas solubles y difusibles que actúan como agentes reguladores de la proliferación, diferenciación y metabolismo celular a través de las interacciones que establecen con receptores específicos de la membrana de las células diana (Marx, 2001, Marx et al., 1998, Anitua, 1999, Canalis, 1992).

El PRP además de los FC, contiene diversas proteínas en suspensión que juegan un papel importante en el proceso de reparación y regeneración tisular, entre las que destacan el fibrinógeno, la fibronectina y la vitronectina. Éstas ayudan a la adhesión de células y de otras moléculas útiles para la conducción celular, actuando como “matriz” base para la reparación tisular (Okuda et al., 2003, Kawase et al., 2005).

Más de un centenar de proteínas siguen ligadas a la fibrina tras su activación. El rol de estas proteínas, detectadas mediante análisis proteómico de la fibrina con técnicas ELISA, es colaborar en los procesos de coagulación, intervenir en la respuesta inmune, participar en la regeneración tisular y formar parte de la actividad plaquetaria (Anitua et al., 2012b).

Papel de las plaquetas en la reparación tisular

El proceso de reparación tisular se basa en una compleja cascada de sucesos en los cuales intervienen multitud de mecanismos celulares y moleculares. En todos estos procesos participan diversos tipos de células que producen distintas moléculas cuyo objetivo final es la cicatrización y recuperación funcional del tejido dañado. Dentro de estos tipos celulares, cabe destacar el papel de las plaquetas en el proceso de cicatrización de los tejidos (Fernandez, 2012).

Un coágulo de sangre normal contiene 93% de células rojas, 6% de plaquetas y en algunos casos menos de un 1% de células blancas. En contraste, un coágulo de PRP contiene un 94% de plaquetas, sólo un 5% de células rojas y menos de un 1% de células blancas. Esta alteración de las proporciones celulares de las células que no estimulan la cicatrización (células rojas) por las que sí estimulan todas las fases de cicatrización (plaquetas), es lo que explica su habilidad en reforzar la regeneración tisular (Anitua, 2001, Marx, 2004, Sampson et al., 2008).

No existen datos concretos sobre la cuenta exacta de plaquetas requerida en un coágulo para calificarlo como PRP, pero se han realizado estudios en los cuales se ha demostrado que

una concentración moderada de plaquetas, aproximadamente de 1,5 a 2 veces el valor basal, proporciona mayores efectos beneficiosos clínicos (Anitua et al., 2009, Anitua et al., 2013b)

Las plaquetas además de sus cualidades hemostáticas, poseen una importante actividad pro-inflamatoria, reguladora y regenerativa, debido a su interacción con otras células, principalmente neutrófilos y células endoteliales, y a través de la liberación de moléculas, como los factores de crecimiento y las citoquinas, entre otras (Anitua et al., 2004, Hartwig y Italiano, 2003, Mannaioni et al., 1997).

Composición de las plaquetas

Las plaquetas son células sanguíneas de pequeño tamaño derivadas de los megacariocitos, cuya principal función es garantizar la correcta hemostasia en el organismo, debido principalmente a sus propiedades adhesivas. Las plaquetas poseen una vida media de unos 8 días y en el organismo sano la tasa normal se sitúa entre 150.000 y 400.000 plaquetas por microlitro de sangre. Su forma es discoidal biconvexa cuando están en reposo, pero experimentan cambios morfológicos tras su activación con estímulos solubles (George, 2000).

Las plaquetas están formadas principalmente por:

Membrana plaquetaria

La membrana plaquetaria está constituida por el glicocáliz, la capa fosfolipídica y la capa submembranosa. El glicocáliz es la capa más externa y contiene una serie de receptores glicoproteicos implicados en la activación y adhesión plaquetaria. Estas glicoproteínas constituyen los antígenos de la membrana plaquetaria, y se dividen en tres familias: integrinas, proteínas ricas en leucina y selectinas. La capa central está constituida por una bicapa fosfolipídica asimétrica con propiedades anticoagulantes. La capa más interna o capa submembranosa es parte del citoesqueleto y sujeta a algunas de las glicoproteínas de la capa más externa (Tablin, 2000).

Citoplasma plaquetario

El citoplasma plaquetario está constituido por las mismas proteínas citoplasmáticas que existen en los megacariocitos (Leven, 2000, Hartwig y Italiano, 2003). Los filamentos de actina actúan como soporte estructural para los diferentes gránulos plaquetarios y mitocondrias. El adecuado ensamblaje del citoesqueleto plaquetario es de vital importancia para el proceso de

activación y secreción del contenido de los gránulos plaquetarios al espacio extracelular (Hartwig y Italiano, 2003, Tablin, 2000)

Gránulos plaquetarios

Las plaquetas de los mamíferos contienen tres tipos diferentes de gránulos: gránulos alfa, gránulos densos y gránulos lisosomales (Gentry, 2000, Tablin, 2000, Hartwig y Italiano, 2003, Anitua et al., 2004). Las actividades beneficiosas sobre los procesos de reparación y regeneración tisular, dependen de las sustancias contenidas en el interior de los gránulos existentes en su citoplasma y serán liberadas al medio extracelular durante el proceso de activación plaquetaria (Rendu y Brohard-Bohn, 2001).

Gránulos α

Los gránulos α son reservorio de múltiples sustancias de vital importancia funcional en el organismo. Las sustancias liberadas por los gránulos α se agrupan de acuerdo con su funcionalidad. De este modo, encontramos diferentes tipos de proteínas (Rendu y Brohard-Bohn, 2001, Anitua et al., 2004, Galvin et al., 2000, Reed, 2004).

- Proteínas adhesivas, como son fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, trombospondina-1 y factor de von Willebrand, que intervienen en las fases iniciales del trombo sanguíneo durante la hemostasia.
- Proteínas fibrinolíticas, como el plasminógeno, el inhibidor-activador del plasminógeno tipo I (PAI- I), la macroglobulina α_2 , la osteonectina, glicoproteína rica en histidina y la antiplasmina α_2
- Proteínas mitógenas, uno de los grupos de sustancias de mayor interés biológico existentes en el interior de los gránulos α . Son el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento transformante, vascular, fibroblástico, epidérmico e insulínico, estimulan la quimiotaxis y la proliferación y maduración celular.
- Otras proteínas, además de estas sustancias, en el interior de los gránulos α también podemos encontrar otras moléculas como condroitín 4-sulfato, albúmina, inmunoglobulinas (IgG) y trombocidinas. A estas últimas sustancias se les han atribuido propiedades bactericidas y fungicidas.

Gránulos densos

En su interior se encuentran receptores cuya activación promueve la agregación plaquetaria, la migración y proliferación celular y el tono vascular entre otros efectos. Cabe destacar entre las sustancias que se encuentran en su interior, la serotonina e histamina, debido a sus efectos vasculares y pro- antiinflamatorios (Burnstock, 2002, Lansdown, 2002).

Gránulos lisosomales

Estos gránulos contienen en su interior glucosidasas, proteasas, hidrolasas y proteínas catiónicas con actividad bactericida. En el interior de los gránulos lisosomales plaquetarios también se han detectado otras enzimas hidrolíticas como la colagenasa y elastasa (Rendu y Brohard-Bohn, 2001).

Activación plaquetaria

La liberación de las sustancias contenidas en el interior de los gránulos plaquetarios, junto con los metabolitos activos derivados de la activación de las plaquetas, y la trombina que generan a partir de la protrombina, crean el ambiente propicio para que transcurran de manera adecuada los diferentes procesos de reparación y regeneración tisular.

Las plaquetas son unas células muy reactivas que responden frente a diversos estímulos liberando las sustancias que almacenan en sus gránulos mediante un proceso de exocitosis. Un determinado agonista como trombina, ADP, colágeno y tromboxano A₂, entre otros, interactúa con ciertos receptores glicoproteicos de la membrana plaquetaria, dando lugar a la señal de transducción que dispara el proceso de activación. Tras la activación, el calcio almacenado en el interior del retículo endoplásmico se libera rápidamente al citoplasma, lo que acaba produciendo el movimiento de los gránulos hacia la membrana plasmática. Una vez que se establece el contacto entre la membrana plasmática y la membrana del gránulo, se produce la fusión de las mismas. Tras la fusión de ambas membranas se produce el vaciado del contenido de los gránulos al espacio extracelular. A este proceso se le conoce como reacción de liberación, y requiere energía, que proporcionan el glucógeno y las mitocondrias existentes en el citoplasma plaquetario (Rendu y Brohard-Bohn, 2001, Reed, 2007).

La cinética de liberación es diferente para cada tipo de gránulos. En primer lugar, se produce la liberación del contenido de los gránulos alfa, posteriormente los gránulos densos, y por último se liberan los productos proteolíticos del interior de los gránulos (Tablin, 2000).

Factores de crecimiento

Los Factores de crecimiento (FC) se clasificaron por primera vez en 1988 por Canalis, y son un grupo de sustancias de naturaleza polipeptídica, solubles y difusibles, que tienen la capacidad de regular el crecimiento, diferenciación y fenotipo de numerosos tipos de células (Canalis et al., 1988). Estos factores proporcionan señales iniciales para la activación de las células integrantes de los tejidos que los rodean. Como respuesta a las señales, las células locales y las infiltradas sufren cambios en la proliferación, diferenciación y síntesis de proteínas con diversas funciones biológicas. En conjunto, todos estos fenómenos, definen el proceso conocido como activación celular (Reed et al., 2000).

Los FC son sintetizados por una amplia variedad de tipos celulares, y pueden ejercer su efecto sobre el metabolismo celular a nivel local, o bien pasar a circulación sistémica. En circulación, los factores de crecimiento se pueden encontrar libres o unidos a proteínas, o bien se pueden encontrar en el interior de los gránulos α de las plaquetas, de los cuales serán liberados tras el proceso de activación plaquetaria (Canalis, 1992, Grageda, 2004). Al liberarse de las plaquetas, estos FC hacen posible la multiplicación y el desarrollo de las células endoteliales vasculares, de las células musculares lisas y de los fibroblastos. Además ejercen múltiples efectos sobre los fenómenos de remodelación celular (Barnes et al., 1999, Anitua, 2001), permitiendo que interactúen recíprocamente con los leucocitos y con las células endoteliales para modular la reacción inflamatoria en los procesos de cicatrización y de regeneración tisular (Bazzoni et al., 1991, Klinger, 1997, Onyango y Khan, 2006), actuando sobre las mismas células que los sintetizan (factores autocrinos) o sobre células de una clase distinta dentro del tejido (factores paracrinos) (Grageda et al., 2005).

Estas proteínas afectan al comportamiento celular uniéndose a receptores específicos situados en las membranas de las células, pero no todos los fenotipos celulares tienen los mismos receptores, por tanto, el efecto de los FC no será el mismo en todos los tejidos ni en todas las situaciones (Stone, 1998). Es importante destacar, que además los factores de crecimiento pueden potenciarse o inhibirse entre ellos mismos. Un ejemplo, es la actuación del TGF- β 1, el IGF-I y el factor derivado de las plaquetas (PDGF) sobre la síntesis de proteoglicanos, quienes individualmente incrementan su síntesis en más de un 100%, pero al actuar en diferentes combinaciones, los efectos son aditivos y estimulan de forma sinérgica la síntesis de dichos compuestos (Chopra y Anastassiades, 1998).

Entre los diversos FC, encontramos el factor de crecimiento transformante (TGF- β), el factor de crecimiento derivado del hueso (BDGF), el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) y el PDGF que son sintetizados por células esqueléticas. Otros factores sintetizados por diferentes tipos celulares son el factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico (aFGF y bFGF) aislado de la matriz ósea. El factor de necrosis tumoral (TNF- α), los factores de crecimiento derivados de los macrófagos y el PDGF, sintetizados por células sanguíneas. Estudios posteriores, han demostrado que tanto estos factores, como muchos otros son sintetizados por más de un tipo celular (Grageda, 2004).

En cuanto a las concentraciones de FC en el PRP son superiores a las del plasma normal en entre 5 y 25 veces (v) según el FC (25 v: PDGF-AB, 5-11v: EGF, VEGF, PDGF-BB. 5v: IGF-I, TGF- β 1, y TGF- β 2). Sin embargo, no siempre más concentración y más FC suponen un mayor efecto, lo que debe tenerse en cuenta (Weibrich y Kleis, 2002, Kevy y Jacobson, 2004, Weibrich et al., 2005, Beca et al., 2007).

Principales factores de crecimiento

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Se identificó por primera vez en las plaquetas, en el interior de los gránulos alfa (Antoniades et al., 1979). También puede encontrarse en otros tipos celulares como macrófagos, células endoteliales, monocitos, fibroblastos y en la matriz ósea (Rappolee et al., 1988, Sitaras et al., 1987, Antoniades et al., 1991).

El PDGF es un polipéptido de naturaleza catiónica que permanece estable hasta alcanzar temperaturas próximas a los 100°C. Su punto isoeléctrico es muy básico (10.2)²⁵ y su peso molecular es de 30.000 daltons (Deuel et al., 1981, Raines y Ross, 1982). Tiene una estructura dimérica formada por dos cadenas de aminoácidos llamadas A y B, con una similitud estructural entre ellas de un 60%. Sus isoformas, pueden presentarse en tres combinaciones (AA, BB y AB), ejercen su función sobre las células diana mediante la unión a dos receptores tirosina kinasa. El receptor α permite la unión de ambas cadenas mientras el β únicamente lo permite a la cadena B (Anitua, 1999).

Su actividad esta mediada por sus receptores, estimulando ambos una respuesta mitogénica, y exclusivamente el β , además una estimulación de la quimiotaxis. Estos factores también están relacionados con el efecto favorecedor sobre la angiogénesis, induciendo a las células endoteliales a la formación de nuevos capilares. También existen evidencias de que

estos factores de crecimiento estimulan la proliferación de células mesenquimales indiferenciadas (Anitua, 1999)

A nivel articular, los condrocitos expresan receptores para el PDGF (Bowen-Pope et al., 1991) y, en general, se acepta que esta sustancia es mitógena para los condrocitos articulares normales (Deuel et al., 1981), cultivados y reimplantados (Ljung et al., 1995), y que induce la proliferación a menudo asociado con el fibrinógeno de las células así como su migración (Rybarczyk et al., 2003). La administración intraarticular en ratas de PDGF-BB (una de sus tres isoformas conocidas) tiene como consecuencia un aumento transitorio y precoz de la actividad osteogénica en las capas profundas del cartílago articular (Hulth et al., 1996).

El PDGF favorece la producción de algunos componentes de la matriz extracelular, aunque no del colágeno, a la vez que previene el proceso de maduración endocondral (Kieswetter et al., 1997). También estimula la resorción ósea mediante el incremento en el número de osteoclastos, los cuales pueden incrementar la velocidad del remodelado óseo. *In vivo*, el PDGF en concentraciones de 20 a 100 ng ha demostrado su capacidad de incrementar la formación de hueso ectópico y la actividad de la fosfatasa alcalina, usando matriz de hueso desmineralizada como transportador en ratas (Howes et al., 1988). Su aplicación local también ha estimulado la cicatrización ósea (Nash et al., 1994, Vikjaer et al., 1997).

La síntesis local de PDGF está regulada por otros factores de crecimiento como puede ser el TGF- β (Grageda, 2004).

Factor de crecimiento transformante (TGF)

Existen dos tipos de TGF, α y β . Este último es una sustancia polipeptídica considerada como miembro del grupo de las citoquinas, con una estructura dimérica formada por 2 subunidades de 112 aminoácidos unidas por puentes disulfuro, con un peso molecular total de 25.000 daltons (Centrella et al., 1986, Assoian et al., 1983).

Su nombre se debe a su identificación por primera vez en tejidos transformados (sarcomas) (Burgess, 1989).

La familia TGF- β consta de 35 miembros que incluyen, además de los TGF- β s, activinas y BMPs (Proteínas Morfogenéticas Óseas) entre otras. Todos ellos juegan un papel importante en el desarrollo y homeostasis de varios tejidos (de Caestecker, 2004)

En mamíferos existen tres isotipos, llamados β 1, β 2 y β 3. Todas las isoformas presentan un grado de homología del 84 al 92%. La expresión de dichas isoformas se regula de forma

diferente a nivel transcripcional debido a las diferentes secuencias promotoras (Roberts, 1998, Govinden y Bhoola, 2003, Jobling et al., 2004). El TGF- β 1 se encuentra principalmente en plaquetas, linfocitos y neutrófilos; mientras el β 2 en extractos óseos, plaquetas, linfocitos y neutrófilos (Derynck et al., 1985).

Una vez sintetizado, el TGF- β se secreta al exterior como un complejo inactivo que consta de un dímero TGF- β , su pro péptido LAP (“latency associated peptide”) y LTBP (“latent TGF- β binding proteins”) (Lawrence, 2001, Todorovic et al., 2005). Por lo tanto, el TGF- β secretado necesita ser activado antes de poder unirse al receptor. Este proceso se llama “latent TGF- β activation” o “TGF- β formation” (Gleizes et al., 1997).

Este estado inactivo o de “latencia” es un mecanismo de control de la actividad de los factores de crecimiento, que permite regular su biodisponibilidad y limitar su difusión desde las células que lo secretan, de este modo se logra regular las acciones autocrinas y paracrinas del TGF- β (Arrick et al., 1992).

Este factor de crecimiento estimula la replicación de células precursoras de la línea de los osteoblastos y además tiene efecto estimulador directo sobre la síntesis de diversos tejidos, destacando notablemente su efecto sobre el tejido óseo y cartilaginoso (Pelletier y Martel-Pelletier, 1994).

El TGF- β interviene modulando la síntesis de matriz ósea por varios mecanismos, incluyendo el incremento en el número de células capaces de expresar el genotipo de los osteoblastos, así como actuar directamente sobre los osteoblastos diferenciados. También es capaz de disminuir la resorción ósea al inducir la apoptosis de los osteoclastos (Grageda, 2004) y al disminuir su formación (Bonewald y Mundy, 1990, Steenfos, 1994).

Se ha observado que una administración exógena de TGF- β en fracturas experimentales, resulta en un incremento del tamaño del callo óseo, así como mejoras en parámetros biomecánicos (Lind et al., 1993).

En definitiva, el TGF- β está involucrado directa o indirectamente en procesos como la cicatrización, angiogénesis, hematopoyesis, desarrollo de las glándulas mamarias, metabolismo óseo y formación de piel, así como en múltiples patologías como enfermedades inflamatorias y fibróticas y el desarrollo de tumores (Roberts et al., 1986, Bierie y Moses, 2006).

El TGF- β 1 es un factor de crecimiento anabólico expresado en altos niveles en el cartílago sano, pero se encuentra prácticamente ausente en cartílago afectado por osteoartritis

(Davidson et al., 2006). Su uso en traumatología viene derivado de su función sobre el tejido cartilaginoso, ya que aumenta la síntesis de componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, el colágeno tipo I y el biglicano y disminuye las actividades proteolíticas responsables del catabolismo de esta matriz (Gleizes et al., 1997).

A nivel del cartílago articular, el empleo conjunto de TGF- β y PDGF ha mostrado efectos positivos actuando como sustancias reguladoras del crecimiento celular y de la síntesis de algunos componentes de la matriz extracelular, que se secretan por los condrocitos como moléculas inactivas, que deben ser disociadas antes de su activación funcional. Muchas de sus acciones las ejercen regulando la acción de otros factores tróficos o sobre las interleucinas. Por ejemplo, inhibe la acción de IL-1 y la expresión de su receptor (Chandrasekhar et al., 1993)

Su presencia en el líquido sinovial ha sido demostrada al igual que en el propio cartílago articular a niveles elevados (Guerne et al., 1994).

Es un potente mitógeno para los condrocitos articulares humanos (Guerne et al., 1994, Nixon et al., 1998), y sus tres isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) tienen potencialidades proliferativas semejantes (van der Kraan, 2012). Algunos autores, han sugerido que las acciones del TGF- β sobre los condrocitos estarían en relación con su estado de diferenciación, hecho que no ha podido ser demostrado (van Osch et al., 1998).

Factor de crecimiento insulínico (IGF)

El IGF existe en dos isoformas, I y II. En la mayoría de las especies animales, el IGF-I es más común, mientras que en humana es el tipo II el que aparece en mayor concentración. Sin embargo, se ha referenciado que el tipo I tiene un efecto tres veces mayor sobre determinados tejidos (Grageda, 2004).

La síntesis de IGF se realiza mayoritariamente en el hígado, de donde se libera al torrente sanguíneo, y es capturado por las plaquetas mediante un mecanismo de endocitosis, para posteriormente ser almacenado por los gránulos alfa (Duan, 2002).

In vivo, ambas isoformas pueden ser sintetizadas por células osteoblásticas, teniendo un efecto positivo mínimo sobre su proliferación. En cambio, sí que mejoran la funcionalidad de los osteoblastos al incrementar la expresión de colágeno tipo I, al igual que el ratio de aposición de matriz ósea, y consecuentemente aumenta la producción de nuevo hueso (Mohan y Baylink, 1991).

El IGF-I o somatomedina C fue aislado por primera vez de suero humano en 1976. Es un polipéptido de 70 aminoácidos con un peso molecular de 7,6 kDa. La molécula de IGF-I tiene un 48% de homología estructural con la proinsulina y ejerce su acción en las células al unirse a receptores específicos en la superficie de éstas. Actúa como un potente mitógeno ya que induce la proliferación, diferenciación e hipertrofia de múltiples líneas celulares, en particular, del músculo esquelético (Philippou et al., 2007).

Las concentraciones en plasma/suero de IGF-I varían según la especie, la edad, el sexo, el aporte nutricional, tamaño corporal, ejercicio y secreción de la hormona de crecimiento del paciente. Sin embargo, en humana, se han descrito valores de 300 ng/ml (rango 94-506 ng/ml) en adultos de 17 a 20 años de edad y de 250 ng/ml (rango 117-358 ng/ml) en personas de 21 a 30 años (Creaney y Hamilton, 2008).

Se ha descrito que el perfil de liberación de GH en seres humanos difiere con el sexo (las mujeres secretan 2 veces más GH por cada pulso que los hombres) y esta circunstancia repercute en las concentraciones circulantes de IGF-I (Giustina y Veldhuis, 1998, Veldhuis et al., 2005).

Los IGF están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales. De este modo la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben (Hill et al., 1995)

El rango de referencia de IGF-I en perros adultos normales es mayor de 200 ng/ml, mientras que en los animales de hasta un año de edad es superior a 500 ng/ml (Schafer, 2006)

Elevadas concentraciones de este factor están asociadas a resultados positivos en la salud, por ejemplo, buen estado físico, óptima densidad ósea y neurocognición (Adams, 2002, Nindl et al., 2007). En estudios con animales se ha demostrado que el IGF-I mejora la cicatrización de lesiones musculares (Menetrey et al., 2000), siendo necesario para la diferenciación y proliferación mioblástica (Engert et al., 1996, Damon et al., 1998).

Los principales tejidos diana afectados por el IGF-I, en combinación con la hormona de crecimiento, son: músculos, cartílagos, huesos, nervios, piel, hígado, riñones y pulmones. Este factor produce numerosos efectos estimulantes del crecimiento, entre los que destacan efectos mitogénicos y la promoción de la sulfatación del cartílago. Asimismo, actúa como mediador de las acciones estimulantes del crecimiento en el esqueleto y otros órganos desencadenados por la hormona de crecimiento (Trejo et al., 2007).

El IGF-I, también se sintetiza por los condrocitos y se almacena en la matriz extracelular del cartílago (Gaismaier et al., 2008). Es el factor de crecimiento del que mejor se conocen los efectos sobre la proliferación y desarrollo de los condrocitos del cartílago de crecimiento (Takigawa et al., 1997). IGF-I favorece la síntesis de proteoglicanos y colágeno tipo II, a la vez que inhibe la destrucción de matriz extracelular (Verschure et al., 1994b, van Osch et al., 1998). Estudios *in vitro* pusieron de manifiesto que la aplicación de IGF-I sobre cultivos celulares de condrocitos produjo un aumento en la síntesis de proteoglicanos, que coincide con un aumento en la expresión de su receptor (Verschure et al., 1994b).

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

El FGF fue aislado por primera vez en los años 70 a partir de extractos de cerebro bovino, basándose en su carácter mitogénico y angiogénico. Posteriores estudios establecieron que los FGFs constituyen una familia de veinte proteínas monoméricas estructuralmente relacionadas (peso molecular entre 16.000 y 18.000 daltons), con diversas actividades y producidas en algún momento durante el desarrollo de tejidos tales como epitelial, muscular, conectivo y nervioso. Debido a que los FGFs han perdido la secuencia del péptido señal, el cual determina en otros factores de crecimiento su secreción extracelular vía retículo endoplásmico rugoso/aparato de Golgi, se ha sugerido que su liberación fuera de la célula puede darse siguiendo una ruta exocítica independiente (Mignatti y Rifkin, 1991)

Es un polipéptido relacionado estructuralmente con los mitógenos “heparin binding”. Sus efectos biológicos son mediados por receptores de superficie de alta afinidad con actividad tirosina-kinasa (Hughes, 1997)

La familia de los factores de crecimiento ligados a heparina incluye 9 proteínas, de FGF-1 o aFGF (ácido) a FGF-9. La FGF-2 o bFGF (básico), presente en plaquetas, contribuye a la angiogénesis en el tejido granulado estimulando la infiltración y proliferación de células endoteliales (Grageda, 2004, Bennett et al., 2003).

La forma básica del FGF (bFGF o FGF-2) es un factor de crecimiento multifuncional que ejerce una profunda influencia en la fisiología de la cicatrización de los tejidos. Su modo de acción incluye la modulación de poblaciones de células madre, así como de la expresión de genes específicos que codifican para las proteínas de la matriz extracelular (MEC), receptores celulares, proteasas de MEC e inhibidores de las mismas. Estudios en animales han demostrado la eficacia del FGF-2 exógeno al favorecer la cicatrización de las heridas, lo que ha llevado también a su utilización clínica. Ha sido empleado en heridas quirúrgicas, para la

reparación ósea, así como para el tratamiento de úlceras (de piel y digestivas) y quemaduras en pacientes diabéticos, cuya velocidad de cicatrización se ha visto reducida a la mitad (Gospodarowicz et al., 1987).

A pesar de su gran potencia angiogénica y mitogénica, el FGF-2 se degrada rápidamente cuando se inyecta o es ingerido, llegándose a perder hasta un 99% de su actividad mitogénica en poco tiempo (Edelman et al., 1991).

Puesto que el FGF-2 es un agente pleiotrópico, es decir, que estimula, inhibe y modula procesos celulares de manera tiempo y dosis-dependiente, es esencial controlar su liberación en el lugar deseado y su biodisponibilidad mientras se necesite de su acción como agente terapéutico. En este sentido, un grupo de investigación del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Málaga, produjo un rhFGF-2, cuya novedad reside en la incorporación de una secuencia aminoacídica auxiliar (correspondiente al dominio molecular modificado del factor de von Willebrand), de alta afinidad de unión específica al colágeno tipo I, que confiere al factor propiedades únicas y exclusivas. De esta forma, este factor de crecimiento, llamado rhFGF-2-F2, puede ser almacenado por tiempos prolongados y ser dirigido a dianas celulares o tisulares específicas donde se precise su actuación, controlando su liberación y preservando su estabilidad o vida media. De esta manera, se acentúa su potencial como agente terapéutico en la cicatrización de heridas y en otros procesos de reparación tisular (Andrades et al., 1999).

Con respecto al cartílago, bFGF es capaz de promover la proliferación y diferenciación de condrocitos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Gaissmaier et al., 2008). En varios modelos experimentales de defecto de cartílago, la aplicación de bFGF aceleró la formación de cartílago sobre la superficie articular, mejorando las propiedades biomecánicas así como la formación de hueso subcondral (Chuma et al., 2004, Fukuda et al., 2005). Sobre la matriz extracelular, el FGF posee efectos ambivalentes ya que favorece la síntesis de sus componentes y de moléculas degradantes. Estimula la síntesis de proteoglicanos (Verschure et al., 1994a) a la vez que suprime la síntesis de condroitín-6- sulfato (Matsusaki et al., 1998)

Factor de crecimiento epitelial (EGF)

Se descubrió inicialmente en las glándulas salivares en 1962, siendo el primer factor de crecimiento identificado, su peso molecular es de 6.000 daltons y contiene 53 aminoácidos. Otros lugares de los que se ha aislado han sido orina, lágrimas, plaquetas, líquido amniótico y

cerebroespinal, y se conoce también con el nombre de urogastrona. Comercialmente, está disponible como EGF recombinante (Cohen, 1962, Savage et al., 1972).

Su principal acción es su efecto estimulador sobre la epitelización, teniendo también importantes efectos sobre los fibroblastos y las células musculares lisas. También se caracteriza por su participación activa en la angiogénesis (Playford y Macdonald, 1997) .

A nivel de los condrocitos, se ha observado que aumenta la síntesis de ADN *in vitro* de forma edad-dependiente (Ribault et al., 1997). Sobre la matriz extracelular, puede tanto favorecer como inhibir la síntesis de proteoglicanos (Hiraki et al., 1987, Chandrasekhar et al., 1993). Al menos en los condrocitos de la placa de crecimiento, es posible que actúe potenciando otros factores como la IGF-I, mientras que sus efectos son contrarrestados por otros como el TGF- β (Bonassar y Trippel, 1997).

Factor de crecimiento neurotrófico (NGF)

Las neurotrofinas constituyen una familia de factores de crecimiento que ejercen sus funciones principalmente sobre algunas poblaciones específicas de neuronas (Lewin y Barde, 1996) y posiblemente sobre algunos tipos de tejidos no nerviosos (Shibayama y Koizumi, 1996, Yamamoto et al., 1996). Las neurotrofinas actúan por medio de dos tipos de receptores, los de alta afinidad y los de baja afinidad.

Estudios realizados sobre receptores de baja afinidad (p75LNGFR) en cartílago articular, con animales deficientes en p75LNGFR han mostrado una reducción en torno al 20% del espesor del cartílago articular y disminución del número de mitosis en los condrocitos. Todo lo anterior sugiere que, por un mecanismo aún desconocido y sin que se pueda asegurar cuál es su ligando, la p75LNGFR está implicada en el desarrollo y maduración de los condrocitos y en la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (Vega et al., 2000).

También se ha demostrado que el NGF produce un aumento tanto de la síntesis de DNA como de glucosaminoglicanos en el cartílago en desarrollo (Kawamura y Urist, 1988).

Factor de crecimiento hepatocítico (HGF)

El factor de crecimiento hepatocítico se describió por primera vez en 1992 como mitógeno para los hepatocitos. Se trata de una proteína multifuncional presente en los gránulos α plaquetarios, que posee múltiples funciones biológicas en una gran variedad de células, que incluyen actividades mitogénicas, morfogénicas, antiapoptóticas así como un incremento de la motilidad celular. De esta manera, está implicado en procesos fisiológicos, entre ellos

embriogénesis y desarrollo hepático, y en la regeneración y carcinogénesis hepáticas (Madonna et al., 2012).

HGF es un factor de crecimiento que demuestra capacidad y habilidad para promover la reparación del tejido y la regeneración de varios órganos tras un daño, por lo tanto, tiene un potencial clínico importante para el tratamiento de varias enfermedades (Madonna et al., 2012). El HGF cuando participa conjuntamente con las células mesenquimales posee un efecto antifibrótico (Liu et al., 2011, Song et al., 2012).

Los condrocitos del cartílago articular por sí solos no producen HGF funcional, pero esta proteína sí que se detecta en el líquido sinovial, y su concentración se correlaciona positivamente con la severidad de la OA (Bau et al., 2004, Guevremont et al., 2003). Hay que destacar que existe un estudio donde se ha visto que el HGF aumenta la síntesis de proteoglicanos en condrocitos de conejo (Dankbar et al., 2007).

Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Se aisló en los años 70 identificándose como mediador de la permeabilidad vascular. Actúa sobre receptores tirosina-kinasa situados en las células endoteliales. Proporciona un estímulo angiogénico potente y prolongado, teniendo efectos sinérgicos con el FGF (Bennett et al., 2003, Tohyama et al., 2009).

Actualmente se reconoce al sistema que incluye al VEGF y sus receptores como el principal regulador de las células endoteliales (ECs) vasculares y de la formación de vasos sanguíneos (Carmeliet y Collen, 1999, Ferrara, 2002). Es uno de los factores de crecimiento pro-angiogénicos más potentes secretados por las células endoteliales. La familia VEGF abarca siete miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento placentario (PlGF) (Veikkola et al., 2000, Shibuya, 2001).

Se ha visto que el VEGF juega un papel importante en la osificación endocondral mediante el acoplamiento de la angiogénesis con la remodelación hipertrófica del cartílago y la formación de hueso. En cultivos de cartílago se ha visto que los condrocitos expresan VEGF y sus receptores, los cuales no se encuentran en el cartílago articular maduro. Sin embargo, estas proteínas sí que se han encontrado expresadas en el cartílago articular artrósico humano, por lo que se ha sugerido una correlación positiva entre esta proteína y la destrucción del cartílago articular y desarrollo de la OA (Lingaraj et al., 2010).

Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF)

El factor de crecimiento de crecimiento de tejido conectivo, también conocido como CCN2, fue identificado por primera vez en un medio condicionado de células endoteliales de vena de cordón umbilical (Bradham et al., 1991).

Aún no se conoce un receptor específico para CTGF. Sin embargo, se ha descrito que interacciona con diversas proteínas, como receptores tirosín-quinasa e integrinas, que activan múltiples sistemas de señalización. Los primeros estudios de interacción revelaron que existen complejos «receptor-CTGF» con un peso molecular de unos 280.000 daltons en condrocitos, osteoblastos y células endoteliales (Yokoi et al., 2002).

Diversas enfermedades, como desordenes proliferativos y lesiones fibróticas, afecciones de la piel, arterioesclerosis, fibrosis pulmonar y diversas patologías renales, presentan niveles elevados de CTGF tisular, localizado principalmente en áreas fibróticas. Aunque clásicamente CTGF se ha considerado como un factor profibrótico, se trata de un factor multifuncional, cuyas actividades biológicas varían según el tipo celular e incluyen la regulación de la proliferación/apoptosis celular, diferenciación, el desarrollo, la curación de heridas, la angiogénesis, la condrogénesis, migración, adhesión y fibrosis (Lau y Lam, 1999, Perbal, 2004, Cicha y Goppelt-Struebe, 2009, Ivkovic et al., 2003).

En un estudio realizado por Kumar y colaboradores, se valoró la expresión de CTGF en el cartílago articular degenerado, llegando a la conclusión que el CTGF está implicado en el desarrollo de la OA (Kumar et al., 2001). Otro estudio anterior, también demostró, que existe una sobre regulación de la expresión de CTGF en los condrocitos del cartílago humano con OA, lo que sugiere que los condrocitos humanos pueden sintetizar CTGF (Omoto et al., 2004). Además, recientemente Honsawek y colaboradores evaluaron los niveles CTGF en plasma y líquido sinovial de pacientes con OA de rodilla, para así correlacionar el nivel de CTGF en estos fluidos con la gravedad radiológica de la OA de rodilla. Observaron que concentraciones de CTGF en el líquido sinovial fueron notablemente superiores con respecto al plasma. Tanto los niveles de CTGF en plasma como en líquido sinovial mostraron una correlación positiva con el grado de severidad radiográfica en pacientes con OA de rodilla, siendo los niveles de este factor significativamente elevados en comparación con los controles sanos (Honsawek et al., 2012). Con todos estos resultados, se ha especulado que el CTGF puede ser responsable de la patogénesis de la OA (Honsawek et al., 2012).

Plasma rico en plaquetas (PRP) vs. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)

En relación a la obtención de los diversos tipos de PRP, existe discrepancia en detalles técnicos como la inclusión de leucocitos o hematíes, y la velocidad y tiempo de centrifugación (Weibrich et al., 2002, Weibrich et al., 2005, Kevy y Jacobson, 2004).

En los últimos años se ha establecido una diferenciación entre PRP y PRGF, al considerar que en el PRGF, además de existir un incremento de la concentración plaquetaria, también debe coexistir una ausencia de glóbulos blancos y una confirmación cuantitativa y cualitativa de los principales factores de crecimiento conocidos; obteniéndose también un aumento con respecto a los valores en plasma. Esta nomenclatura confiere una nueva importancia al plasma como fuente de factores de crecimiento de origen plasmático, con importancia similar a las plaquetas (Anitua et al., 2007a).

Anitua defiende la no inclusión de leucocitos, fracción situada justo por encima de los hematíes, argumentando que alteran la función de algunos FC e interfieren en la acción antiinflamatoria (Anitua et al., 2004). Otros como el grupo de Harvest (Smart PreP[®]2 APC⁺ System) alegan que carece de importancia este detalle y además, su PRP contiene algunos hematíes. Otros autores prefieren la inclusión de leucocitos para el tratamiento de las úlceras u otras cirugías, ya que consideran que tiene un efecto antimicrobiano y desinfectante (Trowbridge et al., 2005, Bielecki et al., 2007).

En nuestro estudio utilizamos el PRGF ya que posee una eficacia demostradas con más de 70 publicaciones científicas de alto nivel en distintas áreas de la medicina, con patente nº EP1066838. Además la metodología del PRGF no es extrapolable a otros PRP, pues las sustancias biológicas varían tanto en composición como en procesado. Entre las principales ventajas del PRGF encontramos (Anitua et al., 2012a, Anitua et al., 2014, Anitua et al., 2007b, Anitua et al., 2004):

- Utiliza concentraciones de factores de crecimiento dentro de la ventana terapéutica para la estimulación de la regeneración tisular, tal y como ha sido demostrado en investigaciones in vitro, en animales o en ensayos clínicos. Otros productos usan concentraciones fuera de esta ventana, obteniendo resultados impredecibles.
- A partir del mismo protocolo y la misma extracción de sangre del paciente se pueden obtener hasta cuatro formulaciones diferentes con diferente potencial terapéutico en función del grado de coagulación y activación de las muestras.

- La UE certifica el uso de PRGF, lo que asegura la calidad de los materiales y legaliza su aplicación en múltiples áreas de la medicina.
- Permite evitar la infiltración de leucocitos en la zona dañada, eliminando así efectos proinflamatorios no deseados, a diferencia de otras metodologías.
- La técnica de obtención del PRGF emplea anticoagulantes y protocolos de centrifugado que conservan la integridad de las plaquetas, por lo que la liberación de factores de crecimiento se produce en la zona de interés y de forma gradual.
- A partir de un bajo volumen de sangre del paciente podemos obtener volúmenes elevados de PRGF. Con un protocolo Sencillo y rápido, de un solo centrifugado de 8 minutos y 20 minutos de preparación.
- Al provenir del mismo paciente, es totalmente biocompatible.

Metodología de obtención de los preparados ricos en plaquetas

Para la obtención de las plaquetas y su concentración se deben realizar todos los procedimientos con la máxima asepsia posible, y mediante una técnica con mínimo traumatismo para obtener un pequeño volumen de sangre, normalmente entre 10-60 ml, dependiendo de la extensión y el tipo de cirugía. Debe ser un proceso viable, estéril y libre de pirógenos para que las plaquetas se mantengan ilesas (Anitua, 1999, Marx, 2001, Anitua, 2001, Marx, 2004).

En humana, el clínico debe tener presente que cualquier dispositivo de PRP terapéutico debe procesar una concentración aproximada de 1.000.000 plaquetas/ μ l y la sangre entera contiene aproximadamente 200.000 \pm 75.000 plaquetas/ μ l. Algunos autores afirman que el PRP terapéutico es el que tiene un promedio de aproximadamente un 400% de aumento en el conteo plaquetario con respecto a la sangre entera (Marx, 2004), mientras otros consideran el PRGF aquel que posee aproximadamente una concentración de plaquetas de 2 a 3 veces la concentración en sangre entera (Anitua et al., 2008).

Para que la muestra no coagule inmediatamente, se coloca en un recipiente estéril (tubo de ensayo) con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante, ya que esta solución capta los iones calcio que se encuentran en la sangre y los neutraliza formando un compuesto químico llamado quelato, impidiendo de esta manera la coagulación sanguínea. Además el citrato sódico no altera los receptores de membrana de las plaquetas y permitirá revertir el proceso al añadir Calcio en forma de Cloruro de Calcio (CaCl_2). Se coloca 1 ml de anticoagulante por cada

5 ml de sangre y ambos se mezclan moviendo el tubo por inversión. La sangre con anticoagulante se coloca entonces en el dispositivo para su centrifugación (Marx, 2001, Marx, 2004, Anitua, 2001).

Obtención del PRGF

Dentro de los diversos métodos de obtención de PRP, el PRGF System, es el sistema autólogo más avanzado, comercializado por BTI. Cuenta con la certificación CE de las autoridades sanitarias europeas, por lo que está autorizado en Europa para la obtención de factores de crecimiento plasmáticos y su aplicación en diversas especialidades médicas. En USA se comercializa con la denominación ENDORET, es la tecnología PRGF®-Endoret®, pionera en el desarrollo de protocolos específicos para la regeneración tisular y la primera técnica 100% autóloga del mercado. Entre sus ventajas destacan (Anitua et al., 2007b):

- Biocompatible, versátil y seguro.
- Control en su activación y utilización.
- Protocolo sencillo: un solo centrifugado.
- Protocolo rápido: 8 minutos de centrifugación y 20 minutos de preparación.
- No contiene leucocitos, por tanto, evita su actividad proinflamatoria.
- Posee propiedades bacteriostáticas.
- Gran potencial terapéutico, sin efectos secundarios, reduce notablemente el tiempo de recuperación de fracturas, lesiones musculares, tendinosas e intervenciones quirúrgicas.
- Aplicable en numerosos campos de la medicina en los que se ha comprobado su alta eficacia en la regeneración de diferentes tejidos: hueso, piel, mucosa oral, tendones, ligamentos, músculos, cartílago y córnea. Abarcando así especialidades médicas tales como: cirugía oral y maxilofacial, ortopedia y medicina deportiva, dermatología, oftalmología, cirugía vascular, cirugía plástica y estética e incluso cirugía veterinaria.

El protocolo a seguir para aislar el PRGF consiste en primer lugar en rellenar los tubos de citrato de 5 ó 9 ml con sangre del propio paciente, y centrifugarlos a 460 o 580G respectivamente, durante 8 minutos. La G representa la unidad de la fuerza centrífuga relativa y es el resultado de la fórmula: $11.18 \times r(\text{rpm}/1,000)^2$, donde r es el radio del rotor de giro de la centrifugadora y rpm las revoluciones por minuto de la misma. Tras la centrifugación se obtienen tres capas con los diferentes componentes sanguíneos (de superficie a profundidad):

plasma (que contiene la mayor parte de sus plaquetas en la zona más cercana a la capa leucocitaria), capa leucocitaria (compuesto principalmente por leucocitos y un cuarto de las plaquetas aproximadamente), y eritrocitos (que contiene las plaquetas más inmaduras en la parte superior) (Weibrich et al., 2005).

A continuación se pasa a la fase de pipeteado, que debe llevarse a cabo en una cámara de flujo laminar, para así evitar la contaminación microbiológica del PRGF. Se destapa el tubo centrifugado con cuidado de no mezclar las diferentes fases, y se desecha 1 ml del plasma más superficial. Para ello se emplea un pipeteado cuidadoso y preciso, evitando en todo momento crear turbulencias, y aspirando siempre desde la superficie. El 40% del volumen de plasma situado inmediatamente por encima de la capa leucocitaria es el PRGF, y debe ser aspirado con un pipeteo cuidadoso y preciso, para evitar tanto la creación de turbulencias como el aspirado de la capa leucocitaria o de eritrocitos. El PRGF de cada uno de los tubos se transfiere hasta el tubo sin anticoagulante (Anitua, 1999).

Otros métodos de obtención

La primera referencia bibliográfica de obtención de plasma rico en plaquetas autólogo es del año 1992. En ésta, la sangre entera se extraía y se almacenaba en tubos de citrato para proceder a su centrifugado (1120 rpm durante 10 minutos) (Uhlin-Hansen et al., 1992).

Los métodos descritos para la obtención de estos concentrados plasmáticos se agrupan en:

Métodos de aféresis

Whitman y colaboradores y Marx y colaboradores utilizaron un equipo de aféresis para separar el PRP del resto de componentes sanguíneos (Whitman et al., 1997, Marx et al., 1998). Así preparaban PRP autólogo a partir de 450 ml de sangre, extraída del propio paciente, la cual introducían en una bolsa que contenía como anticoagulante citrato-fosfato-dextrosa. La sangre se procesaba en un aparato de aféresis en el propio quirófano. Este aparato separaba la sangre en sus tres componentes básicos según las diferentes densidades: por un lado plasma pobre en plaquetas (PPP), por otro lado capa leucocitaria (que contiene los leucocitos y parte de las plaquetas), y por otro eritrocitos. Para conseguir esto, la sangre se sometía a una primera centrifugación a 5.600 rpm. Las diferentes densidades de los componentes sanguíneos hacen que los eritrocitos permanezcan en el nivel más bajo, la capa leucocitaria en un nivel intermedio, y el PPP en lo más alto. Una vez que se retiraba el PPP, los restantes componentes se sometían a una segunda centrifugación a menor velocidad (2.400 rpm) para conseguir una

separación más precisa entre capa leucocitaria y eritrocitos. Tras esta segunda centrifugación se obtiene un volumen de plasma en el cual estaba concentrada la capa leucocitaria y las plaquetas. A esta fracción se le consideró como PRP. Estos autores activaban las plaquetas mediante la adición de una mezcla de cloruro cálcico 10% y trombina bovina. Su recuento plaquetario medio en el PRP obtenido era de 750.000/ μ L aproximadamente (Marx et al., 1998, Whitman et al., 1997).

Existen otros autores que han utilizado esta misma técnica para la obtención de PRP, algunos obteniendo una concentración de plaquetas incluso más elevada, entre 1.250.000 y 1.500.000 plaquetas por μ L (Zimmermann et al., 2001, Weibrich et al., 2003, Weibrich y Kleis, 2002).

El contenido leucocitario del PRP obtenido según esta metodología es muy bajo 160 y 180/ μ L (Weibrich et al., 2002; Weibrich et al., 2003), y los niveles de FC como el PDGF-AB rondan entre 125 y 190 ng/mL, los de TGF- β 1 entre 133 y 268 ng/mL, y los de IGF-I se mantienen en torno a 85 ng/mL (Weibrich y Kleis, 2002, Weibrich et al., 2003, Zimmermann et al., 2001).

Doble centrifugación

Método de Landesberg

En el año 2000, Landesberg y colaboradores proponen un protocolo utilizando material básico de laboratorio, sometiendo la sangre a una doble centrifugación, obteniéndose de esta manera una concentración plaquetaria entre 550.000 y 900.000 plaquetas/ μ L.

Para ello, la sangre se extrae del paciente en tubos de 5 mL con citrato sódico como anticoagulante. La primera centrifugación se lleva a cabo a 200G durante 10 minutos. Tras esta primera centrifugación, el plasma sobrenadante se recoge y se deposita en un tubo sin anticoagulante, y este segundo tubo se somete a otra centrifugación, también a 200G durante 10 minutos. Tras la segunda centrifugación, en el fondo del tubo quedará un sedimento plaquetario, que tras ser resuspendido en un volumen determinado de plasma residual, constituirá el PRP (Landesberg et al., 2000).

Curasan PRP® Kit (Fa. Curasan, Kleinostheim, Germany)

En el método Curasan, la sangre se extrae directamente en unos tubos comercializados con el nombre Monovette (Sarstedt®). Estos tubos permiten extraer la sangre haciendo succión con un émbolo, o bien usando el propio vacío del tubo. Los tubos empleados para la extracción son de 8.5 mL y contienen citrato sódico como anticoagulante. Este método emplea una centrífuga estándar de laboratorio (Weibrich et al., 2002, Weibrich y Kleis, 2002).

Una vez extraída la sangre, se centrifuga durante 10 minutos a 2.400 rpm. Esto producirá un fraccionamiento de la sangre en plasma, capa leucocitaria y eritrocitos. A continuación, el plasma sobrenadante se transfiere a otro Monovette. Este plasma se centrifuga de nuevo a 3.600 rpm durante 15 minutos, con la intención de crear un sedimento que contenga las plaquetas. Una vez finalizada esta segunda centrifugación, el plasma sobrenadante (PPP) se elimina del tubo hasta dejar aproximadamente 0.5 mL. Este volumen de plasma se usará para suspender el sedimento de plaquetas. La suspensión resultante es el PRP y contiene una concentración plaquetaria entre 1.000.000 y 2.500.000 plaquetas/ μ L) y una concentración leucocitaria entre 14.800 y 33.100/ μ L (Weibrich et al., 2002, Weibrich y Kleis, 2002).

Sistemas semiautomáticos

La obtención de PRP mediante sistemas semiautomáticos nos permite obtener un concentrado plaquetario de forma rápida y muy cómoda, con un riesgo menor de contaminación bacteriana (Vasconcelos et al., 2003).

Entre estos métodos se encuentran:

Platelet Concentrate Collection System (PCCS[®] Kit) (3i-Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL, USA):

Para la preparación del PRP mediante este sistema es necesario extraer 60 ml de sangre entera con anticoagulante (ACD-A9), la cual se somete a dos centrifugaciones. Se centrifuga una primera vez durante 3 minutos y 45 segundos a 3.000 rpm, y a continuación, tiene lugar una segunda centrifugación durante 13 minutos a 3.000 rpm, con el objetivo de sedimentar las plaquetas (Appel et al., 2002, Weibrich y Kleis, 2002, Weibrich et al., 2002).

Todo este proceso dura unos 30 minutos y permite una concentración plaquetaria de entre 1.100.000 y 2.200.000/ μ L, con una eficiencia de extracción plaquetaria que ronda el 50% y una concentración leucocitaria de entre 5.500 y 14.800/ μ L. En referencia a los factores de crecimiento presentes en el PRP obtenido con PCCS[®] Kit, los niveles de PDGF-AB se situaron entre 156.7 y 251.8 ng/mL, los de TGF- β 1 entre 144.7 y 467.1 ng/mL, y los de IGF-I entre 78 y 91 ng/mL (Weibrich et al., 2005, Weibrich et al., 2002, Weibrich y Kleis, 2002, Appel et al., 2002).

Gravitational Platelet Separation (GPS[®] System) (Biomet Merck Biomaterials, Darmstadt, Germany):

El GPS[®] System utiliza una jeringa de 60 mL, en la cual aspiran 6 mL de anticoagulante (ACD-A) y 54 mL de sangre del paciente. La sangre con el anticoagulante se vierte en los tubos GPS[®],

que son centrifugados a 3.200 rpm durante 12 minutos. La duración media de todo este proceso es de 30 minutos (Marlovits et al., 2004, Saleh y Cox, 2004).

Se alcanza una concentración plaquetaria aproximada de 1.600.000/ μL , y uno niveles leucocitarios de 31.100/ μL . A excepción del IGF-I, las concentraciones de factores de crecimiento en el PRP obtenido son superiores a las presentes en el plasma sanguíneo: los valores de TGF- β 1 se sitúan en 120 ng/mL; 72 ng/mL para IGF-I; 955 pg/mL para VEGF; y 470 pg/mL para EGF (Eppley et al., 2004).

Smart PReP[®] System (Harvest Technologies Corporation, Munich, Germany):

Este protocolo que realiza una doble centrifugación de la sangre que dura un total de 12 minutos, con una duración media de todo el proceso de unos 20 minutos (Weibrich et al., 2003).

Se necesitan 52 mL de sangre en mujeres y 48 mL en hombres, debido a que se trata de un proceso hematocrito-dependiente, obteniendo un PRP con una concentración plaquetaria cercana a 1.250.000/ μL , una concentración leucocitaria de 19.261/ μL y una eficiencia en la extracción de plaquetas del 63.4%. Por lo que respecta a los factores de crecimiento presentes en el PRP obtenido, el PDGF-AB alcanza una concentración de 208.3 ng/mL, el TGF- β 1 presenta una concentración de 77.2 ng/mL, y IGF-I se sitúa en 91.4 ng/mL (Weibrich et al., 2003).

Recientemente, Harvest Technologies ha presentado la evolución de Smart PreP[®] System, el llamado Smart PreP[®] 2 APC⁺ System. Los sistemas suministrados por Harvest Technologies han sido registrados como productos terapéuticos (<http://www.harvesttech.com/harvest-prp>, 2012)

Plateltex[®] (Plateltex, Bratislava, Slovakia):

Esta metodología se lleva a cabo mediante una doble centrifugación. La sangre se extrae en tubos de ensayo de 8.0 mL, que contienen ACD-A como anticoagulante, y se somete a una primera centrifugación suave a 180G durante 10 minutos. Tras aspirar el plasma sobrenadante, se procede a un segundo centrifugado, esta vez a 1000G durante 10 minutos. Este sistema busca eliminar la cantidad suficiente de PPP para conseguir una concentración plaquetaria en torno a 1.600.000/ μL , y una concentración de PDGF-AB de 60 ng/mL (Mazzucco et al., 2008).

Secquire PRP[®] System (PPAI Medical, Fort Myers, FL, USA):

En este protocolo, tras la extracción de la sangre del paciente mezclada con el anticoagulante, se procede al centrifugado. La sangre quedará dividida en tres fracciones:

eritrocitos, capa leucocitaria, y el plasma, en la superficie. Con una jeringa, se aspiran los eritrocitos del fondo del contenedor respetando la capa leucocitaria Seguidamente, con otra jeringa colocada en el otro puerto de aspiración, se recoge el plasma existente justo por encima de la capa leucocitaria (PRP) (<http://www.secquire.com/index4.htm>., 2013).

Arthrex ACP® System (Arthrex Bio Systems, Autologous Conditioned Plasma (ACP), Naples, FL, USA)

Mediante este método se obtiene un plasma autólogo rico en plaquetas, denominado “plasma autólogo acondicionado” (ACP). Se realiza una única centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. El ACP obtenido alcanza una concentración plaquetaria de aproximadamente 550.000/ μ L, sin la presencia de leucocitos. Además, logra multiplicar por 25 la concentración de PDGF-AB (60 ng/mL) y cuadruplicar la de TGF- β 1 (145 ng/mL), si se compara con los valores de sangre periférica, mientras que la concentración de IGF-I (125 ng/mL) sufre poca variación con respecto a los niveles existentes en sangre (<http://secure.cdn.arthrex.com>, 2012).

Otros dispositivos comerciales:

- Fibrinet® Autologous Fibrin & Platelet System (Cascade Medical Enterprises Ltd, Plymouth, UK) (Mazzucco et al., 2009, Leitner et al., 2006).
- Regen PRP® Kit (RegenLab, Mollens-VD, CH) (Mazzucco et al., 2009).
- Vivostat® PRF Kit (Vivolution A/S, Birkerød, Denmark) (Leitner et al., 2006).

En la tabla 1 se exponen las principales características cuantitativas y cualitativas de los métodos comerciales anteriormente mencionados:

Tabla 1: Métodos de obtención de PRP. (*) Referencias bibliográficas a lo largo del texto

MÉTODO	PLAQUETAS (x10 ³ /mL)	LEUCOCITOS (x10 ³ /mL)	PDGF-AB (nG/mL)	TGF-B1 (nG/mL)	IGF-I (nG/mL)	VOLUMEN SANGRE (mL)
AFÉRESIS	750 - 1500	0.16 – 0.18	125 - 190	133 - 268	86	> 450
PRGF - ENDORET [®]	500	≈ 0	47.0	73.3	78.0	10 – 20
LANDESBERG	550 - 900	N/D	39.8	42	N/D	5
PCSS [®]	1100-2200	5.5 – 14.8	156.7-251	144-467	78 – 91	54
CURASAN PRP [®]	1000 -2500	14.8 – 33.1	233-314.1	79.7–499	69-101	8.5
GPS [®] SYSTEM	1600	31.1	N/D	120	72	54
SMART PREP [®] SYSTEM	1250	19.2	208.3	77.2	91.4	52
FRIADENT- SCHÜTZE PRP [®]	1440	21.7	251.6	196.8	72.8	8.5
PLATELTEX [®]	1600	N/D	60	N/D	N/D	N/D
SECQUIRE PRP [®] SYSTEM	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
ARTHREX ACP [®]	550	≈ 0	60	145	125	9
VIVOSTAT [®]	N/D	N/D	130	N/D	N/D	120
FIBRINET [®]	346	N/D	105	N/D	N/D	8
REGEN PRP [®]	430	N/D	140	N/D	N/D	10

N/D = No determinado

Empleo del PRP en lesiones osteoartrosicas

El PRP es una herramienta terapéutica novedosa de naturaleza autóloga que ha surgido con fuerza en los últimos años, y tiene diversas aplicaciones en el campo de la medicina. Este éxito, se debe además de sus efectos beneficiosos, a que deportistas de élite muy mediáticos los han utilizado para el tratamiento de diversas patologías (De La Mata, 2013).

Muchos de los factores contenidos en el interior del PRP tienen actividad específica de neoproliferación y regeneración del cartílago. Además, poseen un efecto antiapoptótico en los condroblastos. Esto hace que el uso de los FC autólogos sea un campo en rápido crecimiento en la ortopedia ya que podrían tener un papel crucial en el tratamiento de la osteoartrosis debido a su influencia en la quimiotaxis, diferenciación, proliferación y actividad sintética sobre el cartílago y células óseas, regulando así la remodelación fisiológica y reparación de articulaciones afectadas por esta patología (Civinini et al., 2013).

Hoy en día, el tratamiento adecuado en la enfermedad degenerativa articular sigue siendo un reto clínico desalentador a pesar de los avances en medicina ya que el cartílago tiene una capacidad regenerativa limitada. Habitualmente los tratamientos para esta patología solo alcanzan mejoras clínicas o funcionales temporales, por ello los principales objetivos a cumplir

cuando se trata esta patología son controlar el dolor, mejorar la funcionalidad y detener la progresión de la enfermedad (Hunter y Felson, 2006).

La aplicación de PRP en las articulaciones con osteoartrosis está destinada a desencadenar, fomentar e imitar el proceso fisiológico de regeneración y reparación que se pone en marcha espontáneamente en los tejidos tras una lesión. Este proceso se basa sobre todo en la función que ejercen las proteínas interviniendo en la comunicación celular, transmitiendo su información al interactuar con los receptores de la membrana celular, dando lugar a una migración celular dirigida, proliferación y diferenciación celular entre otros, aumentando así la actividad celular que tendría lugar de forma fisiológica (Fortier et al., 2011, Goldring et al., 2006, Shi et al., 2009).

Este material al ser autólogo, bioreabsorbible, biocompatible y libre de leucocitos y glóbulos rojos es uno de los mejores elementos utilizados en ingeniería de tejidos (Anitua et al., 2013a). El PRGF se utiliza en infiltración intraarticular en pacientes afectados de patología degenerativa articular, y aporta, además de factores de crecimiento, citoquinas y morfógenos contenidos también en las plaquetas, así como fibrinógeno y otras proteínas plasmáticas en un agregado biológicamente equilibrado (Anitua et al., 2004, Anitua et al., 2012a). Una vez activado el PRP se infiltra en la articulación dañada, dando lugar a una distribución gradual y homogénea en la zona afectada convirtiéndose en una matriz viscosa y maleable. Además, el PRP también proporciona a las articulaciones un “andamio biológico” o red tridimensional compuesto de fibrina que deriva de la polimerización del fibrinógeno. Esta red contiene sitios de unión para la adhesión celular, así como proteínas que forman un microambiente adecuado que da lugar a la adhesión de diferentes moléculas y células que ayudan a la reparación biológica del cartílago (Anitua et al., 2010).

La homeostasis y el funcionamiento del cartílago articular están regulados por numerosos factores de crecimiento que actúan de manera coordinada. Diversas investigaciones *in vivo* e *in vitro* han desplegado una larga lista de factores de crecimiento decisivos en el proceso de reparación del cartílago, ya sea a través del estímulo de la síntesis de proteoglicanos, agreganos o colágeno de tipo II por parte de los condrocitos, mediante la proliferación de sinoviocitos, mediante la diferenciación condrogénica de células mesenquimales, o bien mediante la disminución de los efectos catabólicos de citoquinas, tales como la interleucina-1 (IL-1), o enzimas proteolíticas, como la metaloproteasas de la matriz (Fortier et al., 2011).

Algunos de estos factores de crecimiento han sido estudiados de manera independiente, aunque parece poco probable que el efecto individual conduzca a la obtención de un efecto

beneficioso global sobre la salud de la articulación, debido a que el proceso de reparación del cartílago es un proceso complejo en el que, generalmente, los diferentes factores de crecimiento interactúan entre sí (Fortier et al., 2011).

El uso del PRP en articulaciones es relativamente reciente y se dispone de escasa bibliografía preclínica (De La Mata, 2013). Experimentalmente, el grupo de investigadores de Gaismaier y colaboradores, analizaron el efecto del sobrenadante de plaquetas humanas en cultivo de condrocitos articulares humanos. Estos descubrieron un incremento en la proliferación de los condrocitos en los cultivos (Gaismaier et al., 2005). En 2006 Akeda y colaboradores cultivaron condrocitos y los expusieron a PRP para evaluar sus efectos. De esta manera, se determinó que el PRP provocaba un aumento en la proliferación celular y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular del cartílago, como proteoglicanos o colágeno de tipo II (Akeda et al., 2006). El año siguiente, en 2007, Anitua y su equipo observaron que los cultivos de sinoviocitos procedentes de individuos con osteoartritis expuestos a PRGF originaban un aumento en la síntesis y excreción de ácido hialurónico en comparación con los controles, apuntando que el PRGF podría ser usado potencialmente como una fuente de condroprotección y de lubricación articular (Anitua et al., 2007a, Anitua et al., 2007b). En otro estudio realizado por Mishra y colaboradores en 2009, se vio que la diferenciación condrogénica de cultivos de células mesenquimales estaba causada por una exposición al PRP (Mishra et al., 2009). Ese mismo año, también se demostró el efecto proliferativo que el PRP ejerce tanto sobre cultivo de condrocitos como de células mesenquimales (Drengk et al., 2009). En una investigación similar llevada a cabo por van Buul y colaboradores en 2011, se evaluó el efecto del PRP sobre cultivo de condrocitos humanos procedentes de individuos con osteoartritis. En este estudio se advirtió que el PRP causó una disminución en la expresión génica de varias sustancias proinflamatorias que favorecen la degradación de la matriz cartilaginosa y fomentan el progreso de la enfermedad articular (van Buul et al., 2011).

A nivel de estudios *in vivo* sobre modelos animales, unos de los trabajos más importantes en el cual se demostró la eficacia de la aplicación del PRP fue el realizado por Serra y Soler en 2006, los cuales utilizaron un modelo experimental de defecto condral de espesor completo inducido en el cóndilo femoral de conejos. En su trabajo de Tesis Doctoral, Soler comprobó que la administración intraarticular de PRGF resultó efectiva para la reparación del defecto condral, rebajando el tiempo de cicatrización obtenido por tratamientos convencionales, como el condroitín sulfato o el ácido hialurónico, y obteniendo un efecto sinérgico entre PRGF y ácido hialurónico, logrando un beneficio más pronunciado mediante inyecciones conjuntas (Soler, 2006). Por su parte, Serra describió en su Tesis Doctoral que el tejido de reparación

creado tras la administración intraarticular de PRGF tenía unas características histológicas muy parecidas a las del cartílago hialino, y unas propiedades biomecánicas equivalentes a las de un material viscoelástico muy similares a las del cartílago articular sano (Serra et al., 2012, Serra, 2006).

Un estudio realizado por Saito y colaboradores en 2009 donde evaluaron histológicamente rodillas de conejos con OA tratados mediante el uso intraarticular de microesferas impregnadas en PRP, evidenció que en estas articulaciones disminuía la progresión de la OA con respecto al grupo control. Mediante el uso de cultivos celulares complementarios, los autores concluyeron que este efecto se debía a una estimulación del metabolismo de la matriz condral mediante la síntesis de glucosaminoglicanos (Saito et al., 2009).

A parte de la especie cunícula donde existen diversos estudios, también se han realizado en otras especies animales como la especie ovina, donde por ejemplo Milano y colaboradores demostraron que el tratamiento con PRP produce una mejora notable tanto en la apariencia macroscópica del cartílago reparado como en sus propiedades biomecánicas, siendo más beneficiosa la aplicación del PRP en forma de gel que en forma líquida (Milano et al., 2010).

En la especie canina, también se han realizado estudios con PRP, evaluando la eficacia de la infiltración intraarticular en rodilla, donde Silva y colaboradores han demostrado que tras la cirugía de ligamento cruzado anterior no ha existido una evolución de la artrosis en los pacientes tratados con PRP (Silva et al., 2013).

En medicina humana, ya en el año 2003, el grupo pionero de Sánchez y colaboradores realizaron el primer estudio clínico que describió el tratamiento de problemas condrales. Se trató de un caso clínico en el que emplearon PRGF para tratar una avulsión de cartílago en un futbolista, logrando una cicatrización del cartílago completa y rápida, con un retorno prematuro a la actividad física (Sanchez et al., 2003). En estudios posteriores, Sánchez y colaboradores han aplicado tres inyecciones semanales de PRGF en osteoartrosis de rodilla; por su parte, Giannini y colaboradores han aplicado PRP de manera intraarticular. En ambos casos, los resultados apuntan a un mejor control del dolor y a una mejora de la actividad física (Sanchez et al., 2008), (Giannini et al., 2008).

A partir de aquí, cada vez más, se han ido sumando estudios realizados en medicina humana con pacientes que padecían la patología. Entre los diversos estudios cabe destacar el de Kon y colaboradores, los cuales llevaron a cabo un estudio realizado sobre 100 pacientes (115 rodillas) tratados con cuatro inyecciones intraarticulares de PRP administradas cada 21 días, en los que se vio que la administración de PRP era segura, reducía el dolor y mejoraba la

funcionalidad y calidad de vida de los pacientes con una duración media del tratamiento de nueve meses (Kon et al., 2010). Este mismo grupo de investigadores realizó otro estudio sobre 150 pacientes en el que compararon la eficacia de las inyecciones intraarticulares de PRP y las de ácido hialurónico para el tratamiento de lesiones condrales degenerativas y osteoartrosis de rodilla. Las inyecciones de PRP mostraron ser mejores y más duraderas a la hora de controlar el dolor y los signos clínicos, además de evidenciar una mejor función articular (Kon et al., 2011).

En 2011, el grupo de investigadores de Wang-Saegusa y colaboradores, también demostraron la eficacia de este tratamiento, realizando un estudio prospectivo con 261 con OA de rodilla, que recibieron 3 inyecciones de PRGF con un intervalo de 2 semanas. La evaluación clínica se realizó a los 6 meses de seguimiento mediante la puntuación de WOMAC, VAS, Índice de Lequesne y SF-36. El análisis estadístico reveló resultados significativos con una mejora en todas las puntuaciones valoradas (Wang-Saegusa et al., 2011).

Hay que destacar, que existen estudios en los que no se han obtenido resultados beneficiosos con la aplicación del PRP, como por ejemplo el de Sánchez y colaboradores en 2012, los cuales trataron a 40 pacientes afectados por la OA con 3 inyecciones semanales guiadas por ultrasonido. Once de los 40 paciente no obtuvieron ningún resultado favorable tras el tratamiento (Sanchez et al., 2012).

Con los resultados obtenidos en todos estos estudios, y en muchos otros, podemos decir que el PRP juega un papel crucial en el tratamiento de la enfermedad fomentando la reparación y remodelación del tejido lesionado, así como evitando la degradación del cartílago y la atrofia de las estructuras peri articulares. Sin embargo, a día de hoy, todavía necesitamos más estudios de investigación que aporten luz sobre la utilidad clínica de estos productos para tratar problemas articulares (Anitua et al., 2013a). Además, la comparación entre estudios es muy difícil debido a la gran variabilidad en los métodos de preparación de PRP, el contenido y la concentración de células, las modalidades de almacenamiento, los métodos de activación e incluso los protocolos de aplicación. De ahí, que los resultados que se pueden apreciar en la literatura sean tan controvertidos (Kon et al., 2013).

Empleo del PRP en otras disciplinas

Cirugía oral y maxilofacial

El empleo de PRP en reconstrucción maxilofacial y en terapias de regeneración periodontal, fue uno de los campos pioneros en los que se llevó a cabo su aplicación. Diversos estudios han demostrado como la aplicación de PRP favorece el incremento en la formación y densidad del hueso, tanto cortical como alveolar (Whitman et al., 1997, Marx et al., 1998, Shanaman et al., 2001, Kassolis et al., 2000).

La primera prueba clínica de aplicación (Kassolis et al., 2000) a rico en plaquetas en este campo, fue en la cirugía maxilofacial (Uhlín-Hansen et al., 1992), donde se obtuvieron resultados tan buenos que impulsaron su uso en otras ramas de la medicina (Anitua et al., 2004, Kovacs et al., 2005). Las aplicaciones se orientan desde la aplicación de PRP en los lechos de extracción de piezas dentarias como al intentar que los implantes dentarios queden perfectamente unidos al tejido óseo contiguo, además de promover la regeneración ósea y la osteointegración (Kim et al., 2010, Kim et al., 2002, Anitua, 1999) .

Anitua en 1999, publicó en sus conclusiones, que tras el uso de PRP autólogo en las zonas de extracción de piezas dentarias, había logrado una epitelización completa de la zona en el 100% de los casos, siendo significativamente mejor en las áreas tratadas con PRP, que en las no tratadas. Del mismo modo, la cantidad y calidad de la regeneración ósea de la zona era significativamente mejor (Anitua, 1999).

Whitman y colaboradores, lo emplearon en cirugía reconstructiva oral y maxilofacial en los procedimientos relacionados con la osteointegración de los implantes de titanio (Whitman et al., 1997). En otros estudios se ha evaluado el efecto del PRP autólogo asociado a injertos de hueso esponjoso autólogo durante la reconstrucción de defectos mandibulares, obteniendo unos resultados satisfactorios, atribuyéndole al PRP un importante efecto osteoconductor (Tayapongsak et al., 1994, Marx et al., 1998).

Cirugía ortopédica

El uso del PRP en cirugía ortopédica y traumatología ha demostrado tener el efecto clínico esperado. Este concentrado plaquetario se ha utilizado en cirugía protésica de rodilla, rupturas tendinosas, fracturas de cadera y rodilla y fracturas ligamentosas de rodilla entre otras (Ahmad et al., 2012, Filardo et al., 2011).

PRP en lesiones óseas

El PRP contiene múltiples factores que han demostrado tanto individualmente como en grupo un potente efecto anabólico óseo. Tras la activación del PRP, las plaquetas liberan una gran cantidad de sustancias que ejercen un papel esencial en el proceso de cicatrización ósea: factores de crecimiento como TGF- β 1, PDGF, IGF, o proteínas como la trombospondina y la osteonectina (Anitua et al., 2006). Las plaquetas existentes en el hematoma de la fractura marcan el inicio de la regeneración ósea con la liberación tanto de PDGF, encargado de estimular la mitogénesis de los osteoblastos del endostio y periostio y de promover la formación de yemas capilares hacia la zona lesionada en los capilares adyacentes, como de TGF- β 1, que activa a los fibroblastos e incita la proliferación de los osteoblastos. Los fibroblastos forman la matriz extracelular de colágeno, utilizada como armazón para el crecimiento capilar y posterior osteogénesis. Los factores de crecimiento estimulan la celularidad en el área de reparación. Mientras las plaquetas alcanzan el final de su ciclo vital, los macrófagos, procedentes del efecto quimiotáctico de determinados factores de crecimiento secretados por las plaquetas, son los principales responsables del proceso de reparación y de los procesos de comunicación intercelular gracias a la síntesis de nuevos factores de crecimiento (Mehta y Watson, 2008). La regeneración ósea comienza con la liberación del Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el Factor de crecimiento β transformante (TGF- β) desde la degranulación de las plaquetas del concentrado plaquetario. El PDGF estimula la mitosis de los osteoblastos, además inicia la angiogénesis; mientras que el TGF- β estimula la división de las células mesenquimales, activa los fibroblastos y puede potenciar la capacidad osteoinductiva de las proteínas óseas morfogenéticas actuando mediante un mecanismo sinérgico (Mehta y Watson, 2008).

Este potencial osteoinductor, se ha empleado en pacientes sometidos a fusiones vertebrales, mostrando su aplicación una mayor capacidad de regeneración ósea alrededor de los implantes de titanio. Este efecto se debe a que la liberación de factores de crecimiento por las plaquetas tiene un efecto quimiotáctico y mitogénico sobre las células mesenquimales ("stem cells") y osteoblastos, acelerando la cicatrización ósea (Lowery et al., 1999).

Resultados igualmente esperanzadores fueron los de Oyama y colaboradores en el año 2004, los cuales publicaron que el PRP puede acelerar la osteogénesis de una forma más intensa que la resorción ósea, al menos, durante la fase de remodelación dentro de los seis meses después de la cirugía (Oyama et al., 2004).

Del mismo modo, estos concentrados plaquetarios se han utilizado asociados a diversas sustancias, como coadyuvantes en la reparación de defectos óseos. En el caso de Kovacs y colaboradores, realizaron una evaluación histomorfométrica y densitométrica de los efectos del PRP utilizado junto a Fosfato β -tricalcico (β -TCP), sustancia utilizada para la sustitución de hueso. Los resultados de dicho estudio indicaron que la adición de PRP al β -TCP acelera la remodelación, mejora la efectividad y la reparación del tejido, que resultaba de una calidad similar a la de hueso autólogo (Kovacs et al., 2005).

En la misma línea, Hauschild y colaboradores en 2005 publicaron la resolución de un caso clínico utilizando una combinación de β -TCP y PRP. Observaron como la combinación de estos dos productos en la resolución de una panartrodesis tarsal, evidenciaba un mayor incremento de la densidad ósea en el sitio del injerto comparado con el hueso adyacente, así como una pérdida completa de la estructura granular, lo que indica una degradación del injerto y formación de nuevo hueso (Hauschild et al., 2005). Probablemente, la presencia de factores de crecimiento en el PRP favoreció la revascularización y por lo tanto la síntesis de colágeno y regeneración ósea por la estimulación de fibroblastos, médula ósea y células osteoprecursoras (Marx et al., 1998).

PRP en lesiones tendinosas

Además de la aplicación de los factores de crecimiento en lesiones óseas, a lo largo de estos años se ha podido comprobar su beneficio en la restauración de otros tejidos, como la regeneración de las roturas tendinosas, este es un proceso lento debido al poco aporte sanguíneo de sus células. La reparación del tendón se ve beneficiada principalmente por 5 Factores de crecimiento (IGF-I, TGF β , VEGF, PDGF y bFGF), que se encuentran en proporciones elevadas en las lesiones tendinosas y actúan activamente en el proceso de reparación (Molloy et al., 2003). Con su acción, se reduce el proceso inflamatorio y se acorta el periodo de reparación y/o regeneración, por lo que se acorta el tiempo de inmovilización y se alcanza una funcionalidad óptima más temprana (Sanchez et al., 2003).

El tratamiento quirúrgico del desgarro del Tendón de Aquiles, asociado a la aplicación de PRP autólogo, supuso un acortamiento en el tiempo de recuperación funcional y con un retorno precoz a sus actividades deportivas (Sanchez et al., 2008, Filardo et al., 2010).

Otros estudios, como el de Maniscalco y Randelli, detectaron como la aplicación de PRP en lesiones del tendón del manguito rotador en humana, mejoraron en 6 y 24 meses respectivamente (Maniscalco et al., 2008, Randelli et al., 2008). Al igual que los estudios de

Kon y Filardo, donde observaron una mejora funcional a los 6 meses de tratamiento basado en 4 y 3 inyecciones de PRP respectivamente, pero esta vez en el tendón rotuliano (Kon et al., 2009, Filardo et al., 2010).

La infiltración de PRP en lesión tendinosa en la especie ovina, mostró que a las 4 y 8 semanas la remodelación del tendón es mayor que en el grupo control (infiltrados con salino: menos células, menor organización de los haces colágeno y menos vasos sanguíneos) (Fernandez, 2012).

PRP en lesiones ligamentosas

La lesión ligamentosa es una de las más comunes entre los deportistas, de ahí la importancia de intentar utilizar tratamientos que consigan la recuperación del paciente en el menor tiempo posible. Los ligamentos son los encargados de evitar que la articulación se mueva más allá de los límites normales, y se lesionan en caso de que la articulación sobrepase el rango de movimiento permitido, es decir, se encargan de permitir la mayor movilidad articular sin comprometer la estabilidad (Morrey, 2012).

La rodilla es la articulación que con más frecuencia padece lesiones que afectan principalmente a sus estructuras ligamentosas, como es el caso del ligamento cruzado anterior, cuya lesión, ya sea por rotura total o parcial, constituye una entidad clínica de gran trascendencia en traumatología y ortopedia y en la mayor parte de las ocasiones requiere tratamiento quirúrgico, acompañado de un largo periodo de rehabilitación (Kon et al., 2011). Esta lesión puede comprometer seriamente la vida deportiva del atleta, ya que puede causar una disminución permanente de la funcionalidad de la rodilla, ocasionando graves pérdidas de rendimiento. Además, la rodilla acabará por desarrollar un proceso de osteoartritis en gran parte de los individuos lesionados (Kon et al., 2011).

El Dr. Mikel Sánchez fue pionero en el empleo de PRGF en la reconstrucción quirúrgica del ligamento cruzado anterior en casos clínicos y, junto con sus colaboradores, describieron en 2003 como el ligamento roto era eliminado mediante artroscopia y era reconstruido con un autoinjerto de tendón previamente tratado con PRGF. De modo que publicaron una serie de 50 casos retrospectivos donde registraban un aumento de la cicatrización y una disminución de las complicaciones, además de mejorar la funcionalidad de los pacientes (Sanchez et al., 2003).

Otros estudios que registran mejoras tras el tratamiento con PRP de roturas ligamentosas, son los realizados por Radice y colaboradores, los cuales evaluaron la maduración de la plastia

del ligamento cruzado anterior (LCA) y observaron una mejora en la velocidad de maduración de más del 50% (Radice et al., 2010), o el trabajo realizado por Mei-Dan y colaboradores, donde comprobaron la recuperación funcional en menos de 6 meses de la rotura del ligamento medial del codo en un medallista Olímpico judoka (Mei-Dan et al., 2010).

Recientemente la tesis publicada por Roberto Seijas, en la cual se reconstruye la rotura del ligamento cruzado de rodilla con un injerto de la cara anterior de la misma, ha demostrado que uso de PRP en la zona dadora del injerto rotuliano permite una regeneración de los tejidos tendinosos más precoz que en el grupo de control, mostrando diferencias especialmente significativas en el cuarto mes de seguimiento. Además se registró una disminución del dolor durante los primeros cuatro meses de la recuperación, con diferencias importantes respecto al grupo de control, confirmando la eficacia de dicho tratamiento en el injerto rotuliano, una técnica que ha demostrado ser muy estable y que es, por ello, la más empleada en deportistas en activo (Seijas, 2013).

PRP en lesiones musculares

Uno de los problemas ortopédicos más habituales y que impiden a la persona afectada desarrollar una actividad física normal son las lesiones musculares, ya sean causadas por contusión o por tirón muscular, que suelen aparecer en practicantes de deportes que implican contacto, carreras explosivas, saltos y aceleraciones bruscas (Kon et al., 2011).

La patología muscular deportiva sigue unos procedimientos terapéuticos normalizados pero en las roturas fibrilares y hematomas postcontusionales se ha propuesto recientemente un nuevo planteamiento terapéutico fundamentado en el uso de PRP (Balius, 2005).

En humana, un ejemplo del interés terapéutico de la utilización de PRP ante una lesión muscular es el efecto positivo de la infiltración del mismo en patologías como la epicondilitis lateral o “codo de tenista” (es una inflamación de las inserciones musculares en el epicóndilo del codo). Se ha demostrado que una única inyección de este concentrado plaquetario disminuye el dolor y mejora la función más que el tratamiento mediante infiltración local de corticoides (Peerbooms et al., 2010).

Ante una lesión muscular el hematoma se produce rápidamente, su contenido no es sólo hemático, ya que contiene también los restos celulares consecuentes a la necrosis de miofibras. En teoría, sí se procede a la evacuación del hematoma y se aporta PRP autólogo, podría disminuirse el riesgo de recidiva del mismo, disminuir, por tanto, “fisiológicamente” la

fase inflamatoria y acelerar y mejorar el proceso regenerativo minimizando la fibrosis (Balius, 2005).

Factores de crecimiento como el b-FGF, el IGF-I y el NGF son capaces de incrementar la regeneración y mejorar la fuerza en el músculo lesionado, según se ha revelado en varios estudios experimentales (Kasemkijwattana et al., 2000). El b-FGF y el IGF-I también son potentes estimulantes de la proliferación de los mioblastos, y su aplicación *in vivo* ha demostrado mejorar la cicatrización e incrementar la fuerza muscular (Menetrey et al., 2000).

Hay que destacar que en 2010 la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) publicó en su lista anual de las sustancias prohibidas el PRP, debido a esto, Elena Damiá realizó su tesis doctoral en la que demostró que la infiltración intramuscular de PRGF no produce una hipertrofia de la musculatura, y por lo tanto no se puede considerar dopaje (Damia, 2012).

Cirugía plástica

Los resultados obtenidos en cirugía plástica y reconstructiva han mostrado una disminución significativa de infecciones, del tiempo de cirugía y de la recuperación del paciente. Principalmente el empleo de PRP en este campo se ha centrado en pacientes con pérdidas de piel y tejidos blandos, a causa de accidentes o patologías crónicas (Valbonesi et al., 2002).

Las plaquetas autólogas son especialmente útiles en la reconstrucción de tejidos blandos en la cirugía facial y reconstructiva (Bhanot y Alex, 2002, Frechette et al., 2005).

Su aplicación también es efectiva en cirugía cosmética (estiramientos- “lifting” de piel), ya que los factores de crecimiento regulan la remodelación de la epidermis y de la dermis y tienen una profunda influencia sobre la apariencia y textura de la piel (Man et al., 2001).

Se ha comprobado que la aplicación tópica o la inyección subcutánea de estos factores produce fuertes cambios sobre la piel envejecida: restaura la vitalidad cutánea, aumenta su grosor, recupera la consistencia elástica, mejora la afluencia vascular, estimulando las secreciones e incrementando la tersura y apariencia de la piel (Mehta y Watson, 2008). De ahí su utilización junto a terapia láser para el rejuvenecimiento de la piel (Shin et al., 2012).

La utilización más habitual del PRP en medicina estética es (Arquero, 2009):

- Mesoterapia (arrugas, elastosis, discromías).
- En forma de coágulo plaquetario en una desepidermización de un peeling para favorecer la regeneración dérmica y epidérmica (en cicatrices para acelerar el proceso de cicatrización).

- En inyección subdérmica (surcos pronunciados, depresiones cicatriciales, fibrosis).
- En adición a material adipocitario (como injerto).
- En lipotransferencia enriquecida en PRP (arrugas, surcos, aumento o remodelación de pómulos, labios o mentón).
- En reparación tisular en paniculopatía ademado-fibro-esclerótica (celulitis).

Cicatrización de heridas

A principios de los 90 se propuso el uso de factores derivados de las plaquetas de sangre humana autóloga como tratamiento coadyuvante de la cicatrización de úlceras para promover la formación del tejido de granulación en las fases tempranas de cicatrización (Atri et al., 1990).

La utilización de PRP acelera la cicatrización de las heridas debido a su capacidad de aumentar la angiogénesis, estimulando la síntesis y diferenciación de células precursoras y liberando factores que estimulan la reproducción celular (fibroblastos y células endoteliales) (Bennett y Schultz, 1993a, Bennett y Schultz, 1993b).

Una de las aplicaciones más importantes del PRP en el campo de la dermatología ha sido la aceleración de la cicatrización de las úlceras cutáneas crónicas. Anitua y colaboradores en 2008, demostraron como a las 8 semanas de tratamiento de este tipo de heridas, el porcentaje de superficie curada en pacientes sometidos a PRP fue significativamente mayor que en el grupo control (Anitua et al., 2008).

Las úlceras son comunes en pacientes con afecciones sistémicas como la diabetes o la β -talasemia, y acaban teniendo complicaciones vasculares y neuropatías periféricas. El empleo de estos factores de crecimiento ha hecho que muchas de estas úlceras se puedan resolver disminuyendo el riesgo de complicaciones, el tiempo de curación y las posibilidades de infección (Gilsanz et al., 2001, Tarroni et al., 2002, Pietrzak y Eppley, 2005, Driver et al., 2006, Salemi et al., 2008).

Se ha demostrado que el tratamiento con PRP en heridas infectadas tras cirugía maxilofacial y cirugía vascular, favorece y acelera la curación de dichas heridas, a pesar de existir implantes exógenos bajo las mismas (Whitman et al., 1997, Centella et al., 2005).

En el estudio realizado en humana sobre heridas de espesor completo agudas en dermis, el 81,1% de los pacientes tratados con PRP estaban curados a los 42 días, frente a un 57,2% de los pacientes que no eran infiltrados (Hom et al., 2007).

En un estudio con una buena calidad metodológica, donde incluyeron 20 ensayos clínicos controlados y aleatorios en pacientes, de los cuales, 11 correspondían a cirugía oral y maxilofacial, 7 a úlceras cutáneas crónicas y 2 a heridas por cirugía, tratados con PRP. Sólo en 5 de los casos (4 de cirugía oral y 1 úlcera crónica) no hubo diferencias entre grupos y se dieron reacciones adversas. Los 14 ensayos restantes, tuvieron un intervalo de confianza (IC) del 95% y un exitoso proceso de curación (Martínez-Zapata et al., 2009).

El rápido desarrollo del tejido de granulación y epitelización que se consigue mediante la aplicación de PRP para la cicatrización de heridas, permite disminuir el dolor y obtener una temprana recuperación del paciente y vuelta a la normalidad (Mehta y Watson, 2008).

Además, también se ha empleado con el objetivo de acelerar la cicatrización de úlceras cutáneas crónicas. Un estudio de Anitua y colaboradores, demostró como a las 8 semanas de tratamiento de este tipo de úlceras con PRP, el porcentaje de superficie curada en el grupo tratado con PRP fue significativamente mayor que en el grupo control (73% frente a un 21,4%, $p < 0,05$) (Anitua et al., 2008). Ya a principios de los 90, se observó en una revisión de casos clínicos, como la presencia de factores plaquetarios autólogos sobre úlceras cutáneas recalcitrantes, promovía la aparición de un tejido de granulación en fases muy tempranas de cicatrización (Atri et al., 1990). Se ha observado como la aplicación de PRP en pacientes con úlceras maculares respondieron de forma significativamente positiva, alcanzando un elevado porcentaje de resolución anatómica (Gehring et al., 1999).

Gastroenterología

En 2006, Wallace y colaboradores demostraron que la administración oral de preparados plaquetarios aceleraba la cicatrización de úlceras gástricas a través de la presencia de VEGF. Además sugirieron que el contenido en factores pro y anti-angiogénicos podría ser regulado por diferentes fármacos, como AINE's o trombopoyetina. Esta nueva posibilidad, podría tener importantes consideraciones clínicas, ya que estos cambios en los niveles de los factores pro y anti-angiogénicos pueden influir en la cicatrización de úlceras en estómago y colon (Wallace et al., 2006).

Sistema nervioso periférico

Este sistema ha sido sometido a pequeños estudios con estos concentrados plasmáticos. Así, Farrag y colaboradores utilizaron roedores como modelo animal para demostrar que la

adición de PRP y fibrina a la sutura de un nervio mejoraba los resultados de regeneración, mostrando que estos concentrados también poseen efectos neurotróficos (Farrag et al., 2007).

Más recientemente, Lichtenfels y colaboradores, evaluaron el efecto del PRP y del plasma rico en plaquetas de fibrina (PRF) en la reparación del nervio periférico. Treinta y dos ratas Wistar se dividieron al azar en cuatro grupos de tratamiento (injertos autólogos nerviosos, tubo de silicona más solución salina, tubo de silicona más PRP, y tubo de silicona más PRF). Se obtuvieron resultados favorables en el grupo de PRP y PRF, observándose efectos positivos en la recuperación funcional del nervio (Lichtenfels et al., 2013).

Oftalmología

En esta disciplina cabe destacar su uso potencial en la reparación de la retina. En un estudio realizado por Cullinae y colaboradores, los cuales emplearon conejos como modelo animal, se demostró que el tratamiento adyuvante con PRP originaba un incremento en la proliferación celular en la cicatrización de heridas retinianas (Cullinane et al., 2002).

Con el objetivo de mejorar la clínica de pacientes con queratoconjuntivitis seca, Alio y colaboradores aplicaron PRP a 18 pacientes con ojo seco y observaron una mejora significativa de la sintomatología en el 89% de los casos (Alio et al., 2007).

En 2014, el grupo investigador de Acosta y colaboradores, evaluaron la eficacia del PRP en el tratamiento de úlceras corneales no infecciosas extensas en conejos albinos, observándose una evolución más favorable en la regeneración de estas úlceras en el grupo tratado con PRP en comparación con el grupo control (Acosta et al., 2014).

Controversia en el uso de PRP

Uno de los principales inconvenientes en el uso del PRP, es la falta de estandarización en el proceso de producción en cuanto a cantidad de sangre extraída, velocidad de centrifugación y separación, número de plaquetas, presencia o no de leucocitos y método de activación. Todos estos pasos dan como resultado diferentes preparados plasmáticos, que por lo tanto pueden tener una eficacia muy diferente (Kon et al., 2013).

La naturaleza autóloga del PRP parece ser el argumento principal por el cual la tolerancia a la infiltración es muy buena, produciéndose complicaciones en contadas ocasiones como una leve reacción inflamatoria local, dolor, nódulos o abultamientos en el lugar de inoculación,

problemas cutáneos, formación de tejido cicatricial, calcificación en el lugar de inyección o en casos más graves infecciones (De La Mata, 2013, Sampson et al., 2008).

Entre todos los motivos de controversia, el empleo de sustancias para la activación de las plaquetas contenidas en el PRP es una de las principales preocupaciones. En concreto, hablamos del uso de trombina bovina como agente activador del PRP. Varios investigadores han advertido que esta trombina bovina puede favorecer el desarrollo de anticuerpos frente a los factores de coagulación V y XI, y frente a la trombina humana, lo que podría desencadenar importantes coagulopatías que incluso harían peligrar la vida del paciente (Landesberg et al., 1998). La mayoría de las metodologías de obtención del PRP recomiendan en la actualidad el empleo exclusivo de cloruro cálcico, o bien el uso de trombina humana, como agentes activadores del PRP (Anitua et al., 2004)

Otro de los motivos de controversia es el riesgo de contaminación bacteriana tras su aplicación en la zona lesionada (Vasconcelos et al., 2003). Los métodos abiertos, como los de centrifugación en tubo, deben llevarse a cabo bajo las más estrictas medidas de asepsia, limitando su uso tras su extracción a unas pocas horas (de 4 a 6) (Anitua et al., 2004, Weibrich et al., 2005, Arguelles et al., 2006). Estos sistemas abiertos presentan un mayor riesgo de contaminación bacteriana, pero no se relacionó este hecho con el desarrollo de infección, en un estudio clínico con un gran número de pacientes (Vasconcelos et al., 2003). Incluso hay autores que señalan que el PRP presenta un cierto efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* tanto *in vitro* como *in vivo* (Moojen et al., 2008, Bielecki et al., 2007).

Existen determinadas contraindicaciones para el uso de PRP, por ejemplo en casos de trombocitopenia, en problemas de coagulación, pacientes tratados con terapias anticoagulantes, en infecciones, en tumores o durante el embarazo.

La terapia con PRP puede mejorar los resultados de los tratamientos convencionales, y debido a que cada vez existe un número mayor de aplicaciones terapéuticas de este producto con prometedores resultados, podemos decir que la estandarización del proceso es necesaria en cuanto a la forma de preparar el PRP, sus características, sus indicaciones, administración y los protocolos terapéuticos antes de que su uso sea utilizado indiscriminadamente. Debe continuarse investigando para conocer de verdad todas sus posibilidades terapéuticas reales.

En España en 2010, la WADA, una agencia independiente internacional que regula el deporte sin dopaje, publicó en su lista anual de sustancias prohibidas, el PRP. Posteriormente, en 2011, se suprimió de su lista de sustancias prohibidas. Inicialmente, se prohibió sólo las

inyecciones intramusculares de PRP, mientras que todas las otras vías de administración, como la intra articular, o intra o peri tendinosa, se permitieron y sólo requerían una declaración de uso. Esta restricción se debía a la preocupación del grupo de expertos de la WADA de que los factores de crecimiento contenidos en EL PRP pudieran estimular las células satélite del músculo y aumentar el tamaño del músculo y la fuerza más allá de la curación normal, ya que el PRP contenía factores de crecimiento que purificados son explícitamente prohibidos, como por ejemplo, IGF- 1, VEGF o PDGF entre otros (Dhillon et al., 2012). Hoy en día, se permite el uso de preparados derivados de plaquetas a partir de la centrifugación de sangre total autóloga, y hay que destacar que desde Mayo de 2013 el PRP ha sido aprobado como medicamento por la Agencia Española del Medicamento, por lo que su empleo ha quedado regularizado.

En cuanto al método de PRGF-ENDORET®, este ha sido patentado, y su metodología está avalada por los certificados ISO 9001: 2008, ISO 13485: 2003 e ISO 13485:2003 CMDCAS, marcado CE de cumplimiento con la Directiva Europea sobre productos sanitarios 93/42/CEE, otorgado por TÜV Product Service, así como con la autorización de la entidad estadounidense FDA (Food and Drug Administration) y la autorización de los ministerios de sanidad de Canadá y México (<http://bti-biotechnologyinstitute.com>, 2014). Este producto ha demostrado su eficacia en perro, de manera que empleando las mismas características de obtención que en humana la calidad el PRGF en perros es la misma (Dominguez, 2014).

Células madre

Las células madre o células troncales, son un tipo especial de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades y llegar a producir células especializadas (Diekman y Guilak, 2013).

En los últimos años las células madre (CM) han generado enormes expectativas y se han convertido en una gran esperanza para el desarrollo de nuevas terapias celulares en el contexto de una medicina regenerativa (Diekman y Guilak, 2013, Fortier y Travis, 2011).

La existencia de las células madre se dio a conocer por primera vez en los años 60, con los experimentos de Till y McCulloch basados en el trasplante de células mononucleadas de médula ósea en ratones letalmente irradiados, donde se demostró por primera vez la existencia de células con propiedades no solo de multiplicación, sino también de diferenciación (Till y Mc, 1961).

Las características más importantes que definen a las células troncales son (Cahan y Daley, 2013, Kolios y Moodley, 2013):

- Capacidad de autorrenovación, cuando inician el proceso de división se autogenera una nueva célula que conserva la característica primitiva de “madre” y permanece “aletargada” hasta recibir un nuevo estímulo que la induzca a multiplicarse y dar lugar a linajes celulares iguales o incluso diferentes al original.
- Multipotencialidad, capacidad de una célula para diferenciarse en células maduras distintas a las de su tejido de origen como adipocitos, condrocitos, osteocitos, mioblastos, cardiomiocitos, neuronas, astrocitos, miocitos, tenocitos, etc.
- Viabilidad funcional, capacidad de cumplir las funciones fisiológicas del tipo celular al que pertenecen.

Clasificación

Las células madre se pueden clasificar según su capacidad de diferenciación o según su origen (Kolios y Moodley, 2013).

Según su capacidad de diferenciación

Se clasifican en (Cahan y Daley, 2013):

Totipotenciales

Son las células que poseen mayor capacidad de diferenciación, se encuentran fases tempranas del desarrollo embrionario, cuando se producen las primeras divisiones de un óvulo fertilizado. Estas células componen el embrión y cuentan con el potencial para diferenciarse en células embrionarias o extraembrionarias. Las células madre totipotenciales poseen la capacidad de formar nuevos embriones, los cuales serán capaces de transformarse en nuevos organismos.

Pluripotenciales

Son células capaces de formar tejidos de las tres capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo). Este tipo de células derivan de la masa interna celular del blastocisto. No pueden generar un nuevo individuo.

En los últimos años, el equipo de investigadores de Takahashi y Yamanaka generaron en 2006 un nuevo tipo de células pluripotenciales mediante la reprogramación de células somáticas. Estas células se denominan células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) y

comparten características similares con las células pluripotenciales derivadas del blastocito (Takahashi y Yamanaka, 2006).

Multipotenciales

Este tipo de células se encuentran en la mayoría de tejidos del organismo adulto, y dan lugar a tipos celulares de la misma capa o linaje embrionario del que proceden, (por ejemplo: una célula madre mesenquimal de médula ósea, al tener naturaleza mesodérmica, dará origen a células de ese linaje embrionario como miocitos, adipocitos u osteocitos, entre otros).

Existe un fenómeno conocido recientemente y que se ha denominado transdiferenciación. Mediante este fenómeno, células multipotenciales procedentes de un linaje embrionario, se diferencian en células de otro linaje diferente del que proceden. Esto se ha visto por ejemplo, con células mesenquimales derivadas del mesodermo las cuales se han diferenciado a células del tejido neuronal procedente del ectodermo (Barzilay et al., 2009), o células madre hematopoyéticas que se han diferenciado en hepatocitos, músculo cardiaco y endotelio entre otros (Orlic et al., 2001, Krause et al., 2001).

Oligopotenciales

Las células madre oligopotenciales son capaces de autorrenovarse y formar dos o más linajes dentro de un tejido específico. Este tipo de células se ha descrito en el estudio realizado por Majo y colaboradores en 2008, donde se ha descrito la obtención de células oligopotenciales de la superficie ocular del cerdo, incluyendo la córnea, para generar colonias individuales de células de la córnea y de la conjuntiva (Majo et al., 2008). Las células madre hematopoyéticas son otro ejemplo de células madre oligopotenciales, ya que pueden diferenciarse en ambos linajes, tanto mieloides, como linfoides (Marone et al., 2002).

Unipotenciales

Las células madre unipotenciales pueden autorrenovarse y diferenciarse en un solo linaje. Se encuentran en tejidos adultos. Una célula madre unipotente, en comparación con otros tipos de células madre, tiene el potencial más bajo diferenciación (Young y Black, 2004).

Según su origen

Según su procedencia se clasifican en (Cahan y Daley, 2013):

Embrionarias

En el año 1978 nació en el Reino Unido el primer niño resultante de una fecundación *in vitro* (Steptoe y Edwards, 1978), a partir de aquí, en el año 1981, se obtuvieron las primeras células embrionarias de mamífero procedentes de embriones de ratón (Evans y Kaufman, 1981) y, diecisiete años más tarde, se publica la obtención de células madre embrionarias (ESC) a partir de embriones humanos sobrantes de procesos de reproducción asistida (Thomson et al., 1998).

Las ESC, son células pluripotenciales, que como ya hemos dicho anteriormente, se obtienen de los primeros estadios del desarrollo embrionario, a partir de la masa celular interna del blastocisto, una etapa del embrión previa a la implantación, 5-6 días después de la fecundación en la cual existen aproximadamente entre 150 y 200 células. Estas células se pueden diferenciar en tejidos de las tres capas germinales primarias, pero también pueden mantenerse en un estado no diferenciado durante un período prolongado en cultivo ya que poseen una capacidad de proliferación extensa *in vitro*, manteniéndose un cariotipo euploide normal (Yao et al., 2006, Hoffman y Carpenter, 2005).

El blastocisto tiene dos capas de células, la masa celular interna, que dará lugar a el embrión, y la masa celular externa llamada trofoblasto, que formará la placenta. Para mantener este tipo de células en un estado no diferenciado, la capa celular interna se separa del trofoblasto, y se transfiere a una placa de cultivo bajo condiciones muy específicas, de esta manera desarrollamos líneas de ESC no diferenciadas (Bongso, 2006)

Las ESC se identifican por la presencia de marcadores de superficie y factores de transcripción que se asocian a un estadio indiferenciado y desempeñan un papel crítico en la capacidad de auto-renovación de estas células. Entre los marcadores de superficie, se encuentran glicolípidos y glicoproteínas identificados originalmente de células de carcinoma embrionario humano o de embriones humanos, tales como SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81. Respecto a los factores de transcripción, uno de los más estudiados es Oct3/4, un miembro de la familia de dominio homeo POU. Otros reguladores transcripcionales como Sox-2 y Nanog, actúan coordinadamente con Oct3/4 manteniendo la pluripotencialidad de las ESC (Hoffman y Carpenter, 2005, Wang et al., 2012). Además, se ha visto que estas células presentan antígenos de superficie descritos inicialmente en otras células y se mantienen a lo largo de los cultivos en las ESC, entre los que se encuentran AC133, c-kit (CD117), FLT3 (CD135) y CD9 (Hoffman y Carpenter, 2005).

Célula madre germinales

Las células madre germinales son células madre embrionarias pluripotenciales que derivan de los esbozos gonadales del embrión, concretamente de una zona específica del embrión denominada cresta gonadal, que dará lugar a los óvulos y espermatozoides. Tienen una capacidad de diferenciación similar a las de las células madre embrionarias, pero su aislamiento resulta más difícil (Aflatoonian y Moore, 2005).

Células madre fetales

Se obtienen a partir de tejidos y órganos fetales como sangre, hígado, pulmón y poseen características similares a sus homólogas en tejidos adultos. Tienen mayor capacidad de expansión y diferenciación, aunque existen muchas dudas acerca del origen de estas células. Su origen podría ser células embrionarias que aparecen distribuidas por todos los tejidos fetales como reservorios de células troncales, o bien podría tratarse de células troncales que proceden de nuevas oleadas de progenitores sin relación con las células troncales embrionarias (Zhu et al., 2014).

Células somáticas o adultas

Las células madre adultas (ASC) se obtienen de cualquier tejido del organismo adulto que derive de las 3 capas germinales y tenga capacidad de reparación o regeneración, así como de tejidos como placenta y cordón umbilical (Timmins et al., 2012, Yang et al., 2012).

En un principio, se creía que estas células eran multipotenciales, es decir, se podían diferenciar únicamente en tipos celulares derivados del mismo linaje embrionario del que procedían. Sin embargo, en los últimos años, se han realizado varios estudios que han aportado resultados sorprendentes los cuales sugieren que la potencialidad de algunos tipos de ASC es mayor de lo esperado, ya que han mostrado en determinadas condiciones capacidad para diferenciarse en células de diferentes linajes (Verfaillie et al., 2002, Korbling y Estrov, 2003, Rosenthal, 2003). Como ya hemos comentado antes, uno de estos ejemplos es el caso de células madre hematopoyéticas, las cuales han sido capaces de diferenciarse en diversos tejidos, entre ellos endotelio, músculo cardíaco, músculo estriado, hepatocitos, neuronas, piel e intestino (Rafii y Lyden, 2003, Orlic et al., 2002, Krause et al., 2001).

Este tipo de células presenta la gran ventaja de ser autólogas, por lo que no existe riesgo de crear rechazo por parte de los pacientes. Además, al proceder del individuo adulto no plantean

un problema ético, siendo capaces de generar gran variedad de tipos celulares en un tejido en concreto.

Dentro de las ASC, existen dos tipos de células:

Células madre hematopoyéticas

El estudio de las células madre hematopoyéticas (HSC) se remonta al año 1908, donde el histólogo ruso A. Maksimow en un congreso de hematología celebrado en Berlín propuso por primera vez la existencia de este tipo de células. Desde entonces, hace ya más de 50 años, se han estado utilizando clínicamente las HSC provenientes de la médula ósea y, más recientemente, las movilizadas a la sangre periférica o las obtenidas de la sangre del cordón umbilical, para el tratamiento de leucemias, linfomas y otros tipos de enfermedades, mediante el trasplante convencional de estas células (Gratwohl et al., 2002).

Recientemente se ha visto que las HSC están conformadas por una población celular más heterogénea de lo que se pensaba, ya que dentro de la misma familia existen diferencias en cuanto al grado de auto-renovación (Ema et al., 2005), diferenciación celular (Muller-Sieburg et al., 2012, Copley et al., 2012) y vida útil (Yang et al., 2005). Técnicas de marcaje han demostrado que estas células se diferencian tanto al linaje linfoide (linfocitos y células natural killer) como al linaje mieloide (eritrocitos, plaquetas, monocitos, etc.) y se han establecido clasificaciones aún más detalladas basándose en sus periodos de diferenciación, clasificándolas como HSC de corto, medio y largo plazo (ST, TI, y LT) (Ema et al., 2014).

Entre los diversos marcadores de superficie celular, el marcador más popular es CD34 el cual se encuentra tanto en células que se van a diferenciar al linaje linfoide como mieloide (Krause et al., 1996). Este marcador fue el primer marcador de diferenciación reconocido en las células hematopoyéticas humanas primitivas y sigue siendo el marcador más utilizado para obtener poblaciones enriquecidas de HSC para la investigación o el uso clínico (Wognum et al., 2003). Algunos ejemplos de marcadores específicos del linaje linfoide son CD45, CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y del linaje mieloide CD14, CD56 y CD33 (Wognum et al., 2003). Otros marcadores de superficie celular evaluados mediante citometría de flujo multiparamétrica son CD44, el cual es un receptor de localización importante, CD90, implicado en el mantenimiento de células madre en reposo, y CD123, implicado en la diferenciación y la supervivencia celular (Garg et al., 2013).

En cuanto a la terapia con este tipo de células, el tratamiento con HSC se utiliza generalmente en infusión endovenosa con la finalidad de restablecer la función medular en

pacientes con médula ósea no funcional o defectuosa. Por lo tanto, es una modalidad de tratamiento basada en la infusión de HSC, las cuales pueden provenir del propio paciente (autólogo) o de un donante de la misma especie (allogénico), relacionados o no relacionados. Se utiliza principalmente para el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas y corrección de alteraciones hereditarias de células derivadas de la médula ósea como son leucemias, mielomas, linfomas, anemias aplásicas, síndromes mielodisplásicos y enfermedades genéticas diversas entre otras (O'Brien y Rizzieri, 2013). Anualmente, se realizan en todo el mundo más de 15.000 trasplantes de células madre hematopoyéticas autólogas y 30.000 alogénicas.

Células madre mesenquimales (MSC)

Las células madre mesenquimales (MSC) son un tipo de células con características multipotenciales, que se pueden obtener a partir de diversos tejidos adultos como médula ósea, placenta (Timmins et al., 2012), cordón umbilical (Yang et al., 2012), músculo esquelético (Jackson et al., 2011), cápsula sinovial (Jones y Pei, 2012), líquido sinovial (Jones et al., 2008) y tejido adiposo entre otros (Black et al., 2008, Yarak y Okamoto, 2010).

Fueron descritas por primera vez en 1974 por Friedenstein y colaboradores (Friedenstein et al., 1974) y desde entonces este tipo de células son una muy buena opción terapéutica para diversas patologías ya que están presentes en gran cantidad de órganos y tejidos conectivos postnatales, y no están sujetas a las mismas restricciones que las células madre embrionarias (Mizuno et al., 2012).

Las CSM se han descrito como una población heterogénea cuyo principal problema para su caracterización inmunofenotípica es la falta de un marcador específico. Por este motivo, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), describe unas características que deben cumplir estas células. Entre ellas se encuentra su morfología fibroblástica y aspecto fusiforme, siendo capaces de adherirse al plástico de cultivo cuando se mantienen en cultivo de tejidos estándar. Además, más del 95 % de estas células, deben expresar los antígenos de superficie CD73, CD90 y CD105, y ser negativas para CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA -II. Por último, bajo condiciones estándar de diferenciación *in vitro* deben tener la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Dominici et al., 2006).

A parte de estos antígenos de superficie, posteriormente se han descrito otros marcadores expresados en estas células entre los que se encuentran CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD 106, CD140b, CD166 y Stro1 (Rojewski et al., 2008).

Debido a su facilidad de obtención, el bajo riesgo de creación de tumores, la ausencia de rechazo por parte del individuo, sus propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias y el hecho de que no planteen problemas éticos son muy buenas candidatas para el tratamiento de diversas patologías (Lisiyani, 2013). En medicina humana, las MSC se utilizan cada vez más para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, donde podrían aumentar la función miocárdica tras un infarto de miocardio (Hare y Chaparro, 2008), en enfermedad inflamatoria intestinal, donde existen datos preliminares de su capacidad para reparar úlceras y fístulas (Garcia-Olmo et al., 2005), en diabetes mellitus, donde podrían mejorar el perfil glucémico por un incremento en el número de islotes pancreáticos (Lee et al., 2006), en enfermedades del aparato locomotor como osteopetrosis, osteogénesis imperfecta, hipofosfatasa infantil, artrosis, etc. (Ma y Mao, 2012, Singh, 2012, Chen y Tuan, 2008), en patologías oculares como traumatismos, quemaduras, sustancias químicas, síndrome de Stevens Johnson o penfigoide ocular, y en enfermedades neurológicas como enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, esclerosis en placas, infartos cerebrales o las lesiones medulares (Prosper et al., 2006).

En medicina veterinaria hay diversos estudios con resultados favorables realizados en perros con osteoartritis (Black et al., 2009, Black et al., 2008, Vilar et al., 2013), perros con osteonecrosis de cabeza femoral (Hang et al., 2012), ratas con problemas neurológicos (Liao et al., 2012), tendinitis y patologías artrósicas en caballos (Fortier y Travis, 2011) y en cabras (Murphy et al., 2003).

Células madre pluripotenciales inducidas (iPS)

Las células iPS o células madre pluripotenciales inducidas son células con características embrionarias que se han obtenido mediante la reprogramación de células adultas. Desde la generación de este tipo de células, el campo de las células madre ha ido creciendo de forma exponencial. Estas células se han convertido en las principales herramientas en el avance de la medicina personalizada, ya que surgieron con el fin de evitar los problemas éticos y técnicos de la generación de células madre embrionarias (Hanna et al., 2010).

Las células iPS se originaron a partir de la idea de Cowan y colaboradores, los cuales consiguieron fusionar células fibroblásticas diferenciadas con células madre embrionarias, con el inconveniente de que estas nuevas células poseían un cariotipo tetraploide, por lo tanto, inadecuado para fines terapéuticos. Con estos resultados, demostraron que los factores de transcripción de las ESC son suficientes para lograr una reprogramación directa de las células adultas diferenciadas (Cowan et al., 2005).

Más tarde Shinya Yamanaka y colaboradores identificaron cuatro factores de transcripción (Oct4, Sox2, y los oncogenes Klf4 y c-Myc), mediante los cuales reprogramaron fibroblastos a un estado similar a células embrionarias, denominando estas células como células iPS o células madre con pluripotencialidad inducida. El método original de Yamanaka se basó en el uso de retrovirus, lo que llevaba a la integración permanente de los genes exógenos en el genoma (Takahashi y Yamanaka, 2006).

Un inconveniente importante de esta técnica es el hecho de que la integración viral se ha asociado con el desarrollo de tumores y la expresión residual de factores de reprogramación en células diferenciadas generadas a partir de células iPS (Yu et al., 2009).

Estos hechos han llevado a los investigadores a buscar diferentes metodologías para mejorar este tipo de células. La primera mejora se obtuvo por el grupo de Hochedlinger, los cuales utilizaron virus que no se integraban para mostrar los factores de reprogramación (Stadtfield et al., 2008).

A partir de aquí Zhou y colaboradores lograron con éxito la reprogramación de las células mediante la administración de estos factores de reprogramación en forma de proteínas recombinantes purificadas (Zhou et al., 2008) o ARNm modificado en el caso de Warren y colaboradores (Warren et al., 2010).

Los últimos estudios han demostrado que es posible aumentar la reprogramación del miARN por medio de la expresión del grupo de genes miR302/367 (Anokye-Danso et al., 2011).

Todos estos resultados están abriendo la puerta a aplicaciones ilimitadas de células madre en el campo de la medicina individualizada, con una rápida sucesión de avances técnicos que permiten la generación de un número indefinido de células específicas del paciente. Las células iPS constituyen herramientas muy valiosas no sólo para estudiar la biología del desarrollo, sino también para capturar y modelar trastornos genéticos, así como para el descubrimiento de fármacos, ingeniería genética y, finalmente, terapias de trasplante celular (Hanna et al., 2007, Cherry y Daley, 2012).

Mecanismo de acción de las ASC

A día de hoy, ya se han demostrado los efectos beneficiosos de las ASC en diversas patologías, pero todavía no se conoce con exactitud los mecanismos mediante los cuales las células trasplantadas podrían mejorar o promover la regeneración de los tejidos. Existen varias hipótesis basadas en las evidencias existentes, que incluyen fenómenos como la

transdiferenciación celular, la fusión de células y un efecto autocrino/paracrino secundario a la liberación por las células de diversas moléculas solubles o citocinas con acciones específicas, que incluyen varios factores de crecimiento. Pudiéndose dar incluso una combinación de varios de estos mecanismos a la vez (Ratajczak et al., 2012, Korbling et al., 2008).

En cuanto al fenómeno de transdiferenciación, se ha sugerido que las señales emitidas por medio de factores liberados por las células residentes, o bien debido al contacto que se produce entre las células residentes y las trasplantadas, se estimulan las células trasplantadas para su transdiferenciación en el tipo de célula residente circundante, lo que permitiría su integración al "nicho" apropiado para su acción regenerativa (Lechner y Habener, 2003).

Por otra parte, también se ha planteado el hecho de que debido a los estímulos que reciben las células implantadas del microambiente en que se sitúan, se induce el fenómeno de fusión de las células externas con las del tejido en que se han asentado, creando nuevas células con características funcionales que les permiten participar en la regeneración del tejido (Lechner y Habener, 2003, Gnecci et al., 2008).

Respecto a el efecto paracrino de las células implantadas, se ha demostrado que estas células actúan liberando factores solubles, los cuales desempeñan una acción esencial en la regeneración de los tejidos mediante un mecanismo paracrino que actúa estimulando en el sitio afectado las células residentes. Estos productos solubles pueden también actuar de manera autocrina, sobre las propias células trasplantadas que los secretan, modulando su biología y favoreciendo la autorrenovación, proliferación y continuidad de sus funciones (Gnecci et al., 2008).

Los efectos paracrinos y autocrinos de las diversas moléculas, se han demostrado en estudios experimentales donde la inyección en el lugar de lesión de un medio de cultivo acondicionado mediante el cultivo de células madre adultas, ha producido efectos beneficiosos comparables al tratamiento efectuado solo con células madre (Gnecci et al., 2008). Estos efectos también se han demostrado mediante el uso de plasma rico en plaquetas o lisado plaquetario, los cuales apoyan el criterio de la importante función paracrina de los elementos solubles (Lubkowska et al., 2012, Lange et al., 2007).

Con todos estos datos, y los obtenidos por diversos estudios, se ha llegado a la conclusión que las ASC pueden contribuir a la regeneración de tejidos mediante diversas acciones, entre las que destacan la diferenciación en células del tejido dañado, lo que podrían realizar mediante los fenómenos de transdiferenciación o fusión celular. La integración en el tejido lesionado con emisión de señales que favorezcan el reclutamiento en ese lugar de otras células

madre o progenitoras que participen en la regeneración de los tejidos, acción que podrían realizar mediante la liberación de moléculas solubles con efectos autocrinos/paracrinos. El mantenimiento de su propia autorrenovación, proliferación y diferenciación para cumplir las funciones fisiológicas del tejido en el que se encuentran. Además de un efecto antiinflamatorio, de inhibición de la apoptosis y de incremento de la vascularización del tejido dañado. Por último poseen también propiedades de citoprotección y estimulan las células sanas presentes en la región lesionada, incluyendo las que pueden estar en un estado quiescente o "dormidas".

Además de estas propiedades, existen algunos datos que sugieren que estos mecanismos de interrelación y comunicación celular podrían ser más complejos aún, presentando estas células un efecto telecrino. Esto se ha demostrado en un estudio realizado en humanos donde se ha observado una mejoría del metabolismo de la glucosa en algunos pacientes diabéticos en los cuales se implantaron en las extremidades inferiores células madre derivadas de la médula ósea para el tratamiento de trastornos isquémicos (Huang et al., 2005).

Efecto inmunomodulador de las MSC

En cuanto a la actividad inmunomoduladora de las MSC, estas participan tanto en la inmunidad innata como en la adquirida (Dorronsoro et al., 2013). Una de las principales maneras que tienen estas células para regular la actividad inmune es mediante la secreción de moléculas solubles y citoquinas que participan en la inmunosupresión. Entre estas moléculas se encuentran indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento hepatocítico (HGF), y la interleucina-10 (IL-10). Además, en los últimos años, la implicación de otras moléculas como el antígeno leucocitario humano-G (HLA-G5) se ha demostrado que se asocia también con estas propiedades inmunomoduladoras (Dorronsoro et al., 2013).

Sobre los linfocitos T, las MSC actúan inhibiendo la proliferación de estos. Los mecanismos por los cuales las MSC son capaces de mediar en la inmunosupresión de las células T son diversos y complejos, y varias moléculas efectoras secretadas se han sido vinculadas a este proceso. Entre estas moléculas destacan las anteriormente mencionadas IDO, PGE2, TGF- β y HGF (Dorronsoro et al., 2013). En diversos estudios, se ha demostrado que las MSC exhiben potentes propiedades inmunomoduladoras y suprimen la proliferación de linfocitos alogénicos activados *in vivo* e *in vivo* lo que permite a las MSC cruzar las barreras de histocompatibilidad (Di Nicola et al., 2002, Le Blanc, 2003).

En las células Natural Killer o células NK, la relación entre estas células y las MSC es ambigua, y los mecanismos por los que las MSC regulan las funciones inflamatorias de las células NK aún no se comprenden del todo. Por un lado, las células NK recién aisladas no pueden atacar las MSC, mientras que en contraste *in vivo* sí que se ha visto que las células NK preactivadas adquieren esta capacidad (Spaggiari et al., 2006). Por otro lado, las MSC pueden inhibir la proliferación, secreción de citoquinas y citotoxicidad de las células NK. La PGE2 y la secreción de TGF- β por las MSC se ha relacionado con efectos antiproliferativos y reducción de la producción de citoquinas. Los datos sugieren que el contacto de célula a célula también está implicada en este tipo de efecto inmunomodulador. También se ha demostrado la capacidad de las MSC para deteriorar la proliferación de células NK activadas por medio de IL-2 y la interleuquina-15 (IL - 15). La secreción de IFN - γ , factor de necrosis tumoral-alfa (TNF - α), e IL-10 por las células NK activadas también se reduce por las MSC *in vivo*. Por otra parte, las MSC son capaces de inhibir la actividad citotóxica de las células NK cuando se dirigen contra el complejo mayor de histocompatibilidad-I positivo (MHC-I) (Spaggiari et al., 2006, Aggarwal y Pittenger, 2005).

El efecto de MSC humanas en las células B depende principalmente de varios factores relacionados con la biología de células B, su estado de diferenciación, y el tipo y la fuerza de estímulo de las células. Algunos estudios demuestran que las MSC inhiben la proliferación de células B, otros afirman que este efecto no es estadísticamente significativa, o incluso que las MSC estimulan la proliferación de células B (Corcione et al., 2006, Rasmusson et al., 2007, Tabera et al., 2008). Lo mismo es cierto pasa con la secreción de inmunoglobulina (Ig), donde se ha visto tanto la inhibición como el aumento de la secreción de IgA, IgG, o IgM por las MSC (Corcione et al., 2006, Rasmusson et al., 2007).

El papel de las MSC en la inmunorregulación de los monocitos actúan tanto en la maduración, como en la función de células presentadoras de antígeno. Por una parte las MSC producen un efecto negativo sobre la maduración y diferenciación de las células dendríticas hacia efectoras. Las MSC reducen la expresión de CD1a, CD40, CD80, CD86, y MHC-II en monocitos a lo largo de diferenciación de los macrófagos y disminuyen la inducción de CD40, CD83, y CD86 durante la maduración (Spaggiari et al., 2009, Zhang et al., 2004a). Además, existen datos donde se ha visto que las MSC interfieren en la función fagocítica y capacidad de activar las células T de las células dendrítica (Nauta et al., 2006). Además se ha visto que citocinas como la interleucina-6 (IL-6), la PGE2 y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), secretados por las MSC pueden a su vez modular las células dendríticas para secretar la citoquina antiinflamatoria IL-10 y para reducir la secreción de interleucina-12

(IL-12) y TNF- α , creando así un ambiente antiinflamatorio, que influye, además en la función de otras células inmunes (Nauta et al., 2006, Aggarwal y Pittenger, 2005, Spaggiari et al., 2009).

Por último, el papel que ejercen las MSC sobre los neutrófilos es el aumento de su vida media y disminuir la actividad infamatoria. Se ha visto que existe una reducción de la tasa de apoptosis tanto en neutrófilos en reposo, como activados, mediante IL-6 secretada por las MSC. La apoptosis de los neutrófilos está positivamente relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo tanto, como MSC disminuyen la apoptosis de los neutrófilos, inhiben la producción de ROS, lo que conduce a disminuir la actividad inflamatoria y reduce de la aparición del estallido respiratorio de neutrófilos que ocasiona la producción de estas ROS (Brandau et al., 2010, Cassatella et al., 2011, Raffaghello et al., 2008).

Fuentes de obtención de MSC

Las MSC se aíslan de múltiples y diversas fuentes del organismo adulto, dentro de las cuales, las más estudiadas son médula ósea, placenta (Timmins et al., 2012), cordón umbilical (Yang et al., 2012), músculo esquelético (Jackson et al., 2011), cápsula sinovial (Jones y Pei, 2012), líquido sinovial (Jones et al., 2008) y tejido adiposo entre otros (Black et al., 2008, Yarak y Okamoto, 2010).

En los últimos años, se han obtenido evidencias de que la potencialidad de este tipo de células es mayor de lo que se pensaba, esto hace que cada vez existan más estudios sobre multitud de fuentes y especies para extraer las MSC y poder utilizarse de esta manera con diversos fines terapéuticos. Entre estas fuentes destacan:

Médula ósea

La médula ósea se considera una de las fuentes principales para el aislamiento de diversos tipos celulares. Esta se considera un tejido complejo compuesto por células hematopoyéticas (precursores y células diferenciadas) y una mezcla heterogénea de células estromales. En el estroma se incluyen adipocitos, reticulocitos, células endoteliales y células fibroblásticas, que están en contacto con los elementos hematopoyéticos. Originalmente se pensaba que el estroma de la médula ósea tenía fundamentalmente una función estructural de soporte para las células hematopoyéticas, pero se ha demostrado que entre las células del estroma, se encuentra también una población celular de MSC (Caplan, 1991, Pittenger et al., 1999, Wan, 2013).

La activación o inhibición de diversos estímulos extracelulares, conjuntos de vías de señalización y factores de transcripción, conduce a la diferenciación de este tipo de células a diversos linajes, tales como los osteoblastos, condrocitos o adipocitos (Wan, 2013).

Las principales ventajas de esta fuente, son la posibilidad de aislar células con alta eficiencia y capacidad de diferenciación. No obstante, la MO como fuente de aislamiento de MSC, presenta dos limitaciones importantes, la primera es que la toma de la muestra es un procedimiento invasivo, y la segunda es la elevada correlación inversa existente entre la edad y el potencial de diferenciación de las MSC, siendo un reto para su aplicación en pacientes de edad avanzada (Wan, 2013).

Cordón umbilical

La obtención de MSC a partir del cordón umbilical es una novedosa fuente para la obtención de células mesenquimales, que cada vez está más en auge, ya que este tipo de células, han mostrado un gran potencial clínico en medicina regenerativa. Este tejido presenta como principales ventajas el hecho de que están fácilmente disponibles para su obtención, la recogida del donante no es invasiva ni dolorosa, no presentan consideraciones éticas, se pueden aislar con mínima contaminación y poseen una alta tasa de proliferación y expansión (Li y Cai, 2012).

Dentro del cordón umbilical, estas células se pueden aislar de diversas regiones como subendotelio de la vena, sangre del cordón umbilical, regiones perivasculares y gelatina de Wharton. Entre estas regiones, se obtienen cantidades mayores de células, y con unas tasas de derivación a MSC más altas, las células aisladas de la gelatina de Wharton (Troyer y Weiss, 2008).

Las MSC obtenidas a partir de esta fuente, además de expresar los marcadores CD anteriormente mencionados, también expresan CD29, CD44, CD49b, CD58, CD166 y HLA –I, y son negativos para CD3, CD7, CD33, CD40, CD49d, CD80, CD86, CD117 Y CD133 (Bieback y Kluter, 2007, Malgieri et al., 2010).

Placenta

Las células mesenquimales derivadas de la placenta, tienen las mismas ventajas que las células mesenquimales derivadas del cordón umbilical en lo se refiere al hecho de que están fácilmente disponibles para su obtención, la recogida del donante no es invasiva ni dolorosa, no presentan consideraciones éticas, se pueden aislar con mínima contaminación, presentan

baja inmunogenicidad y poseen poco riesgo de contaminación viral. Sin embargo, cuando comparamos ambas fuentes de obtención, hay que destacar que las células mesenquimales derivadas del cordón umbilical tienen una mayor capacidad proliferativa, poseen un tiempo de duplicación más corto, una menor tasa de apoptosis, existen mayor cantidad de células en fase mitótica, y tienen más vacuolas autofágicas (Zhu et al., 2013a).

El tejido placentario no sólo incluye la membrana coriónica y amniótica, sino también contiene la membrana decidua basal que se trata de la porción de placenta materna. Entre estos tejidos, la membrana amniótica ha sido muy estudiada. En ella se han aislados dos poblaciones celulares con características de células madre (Insausti et al., 2010, Miki et al., 2005, Bilic et al., 2008, Soncini et al., 2007):

- Las células epiteliales conocidas como “Human Amniotic Epithelial cells”, las cuales poseen características muy parecidas a las células madre embrionarias expresando marcadores antigénicos embrionarios, factores de transcripción propios de células pluripotenciales, y características de diferenciación hacia las tres capas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo).
- Las células mesenquimales, obtenidas del estroma mesodérmico y denominadas “Human Amniotic Mesenchymal Stem or Stromal cells”, las cuales son células con características multipotenciales. Aunque algunos investigadores han demostrado su capacidad de diferenciación a diversos linajes.

Músculo esquelético

El músculo esquelético tiene gran capacidad de regeneración debido a las células madre musculares, entre las que se encuentran las células satélite, y las células mesenquimales derivadas del tejido muscular (Qu-Petersen et al., 2002).

Las células satélite son precursoras miogénicas que son capaces de regenerar el músculo y demuestran propiedades de autorrenovación, sin embargo, están comprometidas únicamente con el linaje miogénico. Las células mesenquimales, en cambio, poseen una capacidad de regeneración más elevada, y se pueden diferenciar en múltiples linajes, pudiendo ser estas, las precursoras de las células satélite (Alessandri et al., 2004).

Se han realizado estudios con MSC derivadas del tejido muscular, observándose regeneración de músculos esqueléticos y cardíacos, hueso, cartílago articular, e incluso reponer médula ósea de ratones irradiados letalmente (Qu-Petersen et al., 2002, Lee et al., 2000, Kuroda et al., 2006, Lavasani et al., 2014). Su potencial terapéutico, es probablemente

debido a su capacidad de supervivencia superior en condiciones de estrés oxidativo y de hipoxia, y a la elevada expresión de antioxidantes característicos de células más diferenciadas, tales como mioblastos (Urish et al., 2009).

Membrana sinovial

Las MSC se obtienen de la membrana sinovial a través de un procedimiento artroscópico relativamente sencillo, de manera que se trata de una técnica poco invasiva con mínimas complicaciones en la zona donante (Fan et al., 2009). La primera extracción exitosa de MSC de tejido de la membrana sinovial humana se realizó en 2001 por el equipo de De Bari y colaboradores (De Bari et al., 2001). Este tejido, posee una elevada capacidad de auto regeneración, como lo demuestra su habilidad para sanar completamente después de una sinovectomía quirúrgica. Debido a esta cualidad, se han aislado con éxito, incluso células mesenquimales derivadas de membranas sinoviales patológicas afectadas por enfermedades como la osteoartritis (Nagase et al., 2008).

Las MSC sinoviales, como ya hemos comentado, poseen una elevada capacidad proliferativa, siendo esta particularmente eficiente cuando se diferencian hacia el linaje condrogénico (Fan et al., 2009, Shirasawa et al., 2006). Además de la regeneración del cartílago, existen estudios en los que se ha utilizado este tipo de MSC en la regeneración de hueso, tendón y músculo esquelético, dando lugar a condrocitos, osteoblastos, adipocitos y miocitos, entre otros (De Bari et al., 2003, Ju et al., 2008).

Se han llevado a cabo estudios en los cuales se han comparado este tipo de células con las procedentes de la médula ósea, y se ha visto que en lo referente a la morfología, fenotipo inmune, la frecuencia de colonias, y la capacidad de diferenciación son similares entre los dos tipos de células mesenquimales. Ambos tipos celulares tienen un fenotipo inmune parecido, incluyendo la expresión negativa de genes como CD14, CD45, CD34, CD117, CD62E, CD20, CD113, HLA-DR, CD68, CD31, y ALP (fosfatasa alcalina), y la expresión positiva de genes como CD10, CD13, CD105, CD166, CD49a, CD90, CD44, CD147, y CD73 (Djouad et al., 2005, Jo et al., 2007, De Bari et al., 2008, Tateishi et al., 2008).

Otras de las cualidades de este tipo de células son que su capacidad multipotente no está influenciada por la edad del donante, pases celulares, o criopreservación (De Bari et al., 2001).

Tejido adiposo

La obtención de MSC a partir del tejido adiposo, presenta una serie de ventajas frente a otras fuentes de obtención, ya que el tejido adiposo es abundante y de muy fácil obtención en el organismo, se puede obtener en grandes cantidades, con anestesia local y causando mínimas molestias en el individuo, además, este tejido posee un elevado rendimiento, ya que con cantidades muy pequeñas de muestra, se pueden obtener un número muy elevado de células (Noth et al., 2008, Mizuno, 2009).

Por otra parte, este tipo de células, posee una elevada capacidad de proliferación *in vitro*, presentan morfología fibroblástica, se adhieren bien a la placa de cultivo y expresan un conjunto específico de marcadores ya conocidos (Huang et al., 2013).

En humana, estas células se obtienen mediante procedimientos de liposucción. Técnica que produce menor grado de molestias para el paciente, y menor morbilidad en la zona donante que otros métodos de obtención celular. A continuación este tejido se digiere con colagenasas, se lava y se filtra para posteriormente cultivarse y obtener las MSC (Fraser et al., 2006, Mizuno, 2009).

En la especie canina, existen diversas zonas para la obtención de tejido adiposo, ya sea mediante un procedimiento quirúrgico abierto o a través de un procedimiento laparoscópico. Entre las principales áreas de recolección del tejido, encontramos el ligamento falciforme (Bigham-Sadegh et al., 2012), la región torácica lateral (Haghighat et al., 2011), la región escapular caudal (Chung et al., 2013), la grasa intra-abdominal o subcutánea obtenida durante cirugía de ovariectomía (Martinello et al., 2011, Reich et al., 2012), la grasa de la zona glútea (Kang et al., 2012) y la región inguinal (Guercio et al., 2012, Oh et al., 2012).

Hay que destacar que se han realizado estudios en ratones, donde los investigadores han observado diferencias en la composición de las MSC derivadas del tejido adiposo, y su capacidad de diferenciación, en base a diversas regiones anatómicas (Prunet-Marcassus et al., 2006). En humana, se ha visto que el tejido adiposo humano muestra diferencias metabólicas de acuerdo con la localización anatómica (Fruhbeck et al., 2001). Además, la edad es otro factor que puede interferir en la composición de las células, ya que se ha demostrado que los individuos más jóvenes tienen un mayor número de MSC derivadas del tejido adiposo en comparación con sujetos de mayor edad (Sharpless y DePinho, 2007).

Cuando comparamos estas células, con las MSC aisladas de médula ósea, las derivadas del tejido adiposo son de menor tamaño, tienen diferente expresión génica, diferentes

marcadores de superficie celular, y pueden someterse a un mayor número de pasajes antes de la senescencia, lo que les proporciona una mejor tasa de proliferación (Peng et al., 2008, Izadpanah et al., 2006).

Potencial terapéutico de las MSC

Trastornos neurológicos

Isquemia cerebral

La isquemia cerebral es el resultado de una falta de flujo de sangre al cerebro que conduce a la hipoxia cerebral, resultando en una lesión neurológica. Esto ocasiona complicaciones mayores como deficiencias en la visión, en el movimiento físico y en el habla. Si no se lleva a cabo un diagnóstico y tratamiento adecuado, los síntomas pueden ser permanentes e incluso puede estar en riesgo la vida del paciente (Hess y Borlongan, 2008).

Existen estudios donde la recuperación neurológica después de un trasplante de células madre en un modelo animal con isquemia ha demostrado ser seguro y eficaz (Hess y Borlongan, 2008). Varios estudios han mostrado que, en general, el trasplante de MSC en la corteza de una arteria cerebral media ocluida puede dar lugar a la recuperación de la función neurológica en un modelo de ratones (Ding et al., 2007). Se ha visto que las MSC migran a la zona isquémica y se diferencian en neuronas, células gliales y otros tipos de células neuronales. Parece haber un aumento del flujo sanguíneo cortical en la zona isquémica debido a la angiogénesis provocada por las MSC, mostrando los pacientes una recuperación de la función neuroconductual y una disminución del volumen de infarto después del trasplante (Koh et al., 2008). Otro estudio realizado por Liao y colaboradores en rata con lesión cerebral isquémica mostró que el trasplante de MSC redujo significativamente la dimensión de la lesión, y la deficiencia de la función neurológica debido a una angiogénesis en la zona de lesión (Liao et al., 2009).

Lesión en médula espinal

Las lesiones de la médula espinal, surgen como consecuencia de un daño o trauma en la médula dando lugar a una reducción en la función motriz. El grupo de investigadores de Yang y colaboradores han publicado recientemente datos impresionantes donde el trasplante de MSC puede ser una posible estrategia para promover la regeneración de la fibra corticoespinal y mejorar la función locomotora tras la transección de la médula espinal en ratas comparándolas

con un grupo control. Los resultados mostraron un aumento del número de axones regenerados en la zona corticoespinal de la zona alrededor de la lesión. Se observó migración de MSC de la zona de implantación a la lesión, por lo que dedujeron que la liberación de citoquinas y factores de crecimiento de las células madre era el mecanismo clave para la progresión de la fibra corticoespinal (Yang et al., 2008).

Este tipo de lesiones son un problema muy común en medicina veterinaria y pueden conducir a graves déficits neurológicos permanentes, que afectan al sistema motor, sensorial y la función autónoma. Las causas más comunes de lesión medular aguda en los perros son hernias intervertebrales de disco, embolia fibrocartilaginosa y trauma (Olby, 2010).

Las células trasplantadas se utilizan para reemplazar el tejido dañado, promover la regeneración axonal en el tejido receptor, o jugar un papel neuroprotector. En un modelo experimental de canino con lesión medular se han trasplantado células mesenquimales derivadas del cordón umbilical, obteniéndose resultados favorables sin evidencia de efectos adversos (Lim et al., 2007).

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo definido por la pérdida progresiva de la función dopaminérgica estriatal (Yasuhara y Date, 2007). El grupo de investigadores de Fu y colaboradores han mostrado en un modelo de rata con enfermedad de Parkinson, a las cuales se les ha realizado una implantación de MSC en el cuerpo estriado, una mejora parcial de la lesión inducida por actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (Yan et al., 2013). En otro estudio, se han encontrado los mismos resultados en un modelo de ratas hemiparkinsonianas (Weiss et al., 2006).

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral, causando demencia y síntomas histopatológicos tales como placas seniles y ovillos neurofibrilares (Zhu et al., 2006). Un depósito de amiloide- β en el cerebro es la causa fundamental de esta enfermedad, además el estrés y los efectos oxidantes inflamatorios pueden tener también un papel patológico, siendo una enfermedad progresiva y hasta la fecha incurable (Madeira et al., 2005, Onyango y Khan, 2006).

Existen evidencias de la eficacia de la terapia celular en esta patología, como por ejemplo el grupo de Lee y colaboradores los cuales demostraron que el uso de MSC en un modelo de ratón con la enfermedad puede reducir y mejorar los síntomas. Este mismo grupo ha informado que el cocultivo de las MSC con las neuronas del hipocampo resultó en una reducción significativa de la apoptosis en comparación con el grupo de control. A la vez, el mismo grupo de investigadores demostró que la inyección de amiloide- β en el cerebro de un modelo de ratón, a los cuales trasplantaron MSC llevó a la disminución del estrés oxidativo y la activación glial en comparación con el grupo control (Lee et al., 2010).

Los grupos de investigación de Stephan y colaboradores, y Tsai y colaboradores reportaron que el trasplante de MSC suprimida astrocitos activados y la activación de la microglía que aumentaron en el grupo control. De acuerdo con estos datos, han sugerido que las MSC pueden tener un papel neuroprotector, mejorando el aprendizaje y la memoria (Stephan et al., 2001, Tsai et al., 2007).

Enfermedades autoinmunes

Los efectos inmunomoduladores de las MSC tienen un papel crítico en el mecanismo de las enfermedades autoinmunes. Las MSC expresan niveles bajos del HLA-I, pero no expresan moléculas coestimuladoras del HLA-II, tales como CD80, CD86 y CD40. Además, estas células suprimen la proliferación de células T activadas y su diferenciación (Kim et al., 2010).

Diabetes mellitus tipo I (DMTI)

La diabetes mellitus tipo I o diabetes juvenil es una enfermedad autoinmune de las células beta productoras de insulina del páncreas (Atkinson y Eisenbarth, 2001). Aunque esta enfermedad puede ocurrir en cualquier grupo de edad, en humana, se diagnostica principalmente en niños y adultos jóvenes. Los métodos comunes para el control de la DMTI son las inyecciones de insulina y el autocontrol de los niveles de glucosa en sangre. El trasplante de islotes es el tratamiento más eficaz para los pacientes diagnosticados con diabetes dependiente de insulina. Algunos estudios han demostrado que la aplicación de células de diversas fuentes (embrionarias, pancreáticas, hepáticas, médula ósea y cordón umbilical) originan la producción de insulina (Ramiya et al., 2000, Lumelsky et al., 2001, Yang et al., 2002, Ende et al., 2004, Oh et al., 2004, Hori et al., 2005).

Un grupo de investigadores, ha producido células de los islotes in vitro a partir de MSC, que luego se infunden en el hígado de las ratas diabéticas. Después del trasplante, estas células

secretan péptido C humano, y en respuesta a los niveles de glucosa fisiológicos liberan insulina humana. Debido a todos los avances que suponen estas técnicas en el tratamiento de la DMT1, el trasplante de MSC se considera uno de los métodos más eficientes hoy en día para tratar la patología (Koblas et al., 2005, Chao et al., 2008).

Lupus sistémico eritematoso (LSE)

El LSE es una enfermedad autoinmune sistémica que puede afectar a cualquier parte del organismo, siendo más frecuente en el sexo femenino que en el masculino. Esta patología es resultado de un ataque por parte del propio sistema inmune, a las células y tejidos del organismo, traduciéndose en la producción de anticuerpos contra sí mismo. Los órganos más afectados suelen ser corazón, articulaciones, piel, pulmones, vasos sanguíneos, hígado, riñones y sistema nervioso (Fernandez-Nebro et al., 2012).

En un estudio de investigación, Sun y colaboradores seleccionaron pacientes con LSE grave resistente a inmunosupresores convencionales o terapia inmunomoduladora (glucocorticoides, ciclofosfamida y micofenolato mofetilo). A estos pacientes se les trasplantó MSC, y posteriormente se evaluaron de acuerdo al índice de actividad lúpica "SLEDAI" que valoró el anticuerpo antinuclear (ANA), anticuerpos anti-ADN de cadena doble (anti- dsDNA), niveles de complemento C3 en suero, C4 y albúmina, y por último, la función renal. Después de un período de un mes, las puntuaciones SLEDAI disminuyeron significativamente en los pacientes. Los resultados indicaron disminuciones adicionales en el SLEDAI después de tres y seis meses. Durante los tres meses siguientes al trasplante de MSC, se midieron los niveles de proteinuria, creatinina sérica y nitrógeno ureico para la evaluación de la función renal. Todos estos parámetros se redujeron y, además, la albúmina en suero volvió a niveles normales. Como indicador de la respuesta del sistema inmune, los investigadores evaluaron las células Treg (células T CD4 + FoxP3 +). Los resultados mostraron un aumento del número de células Treg, y la relación de Th1 y Th2 se restableció tras el trasplante de MSC (Sun et al., 2010).

Artritis reumatoide (AR)

La AR es una enfermedad autoinmune inflamatoria sistémica crónica que afecta al 1% de la población mundial y con mayor frecuencia se presenta en mujeres. Esta enfermedad afecta a numerosos tejidos y órganos, pero las articulaciones sinoviales son las más afectadas, entre ellas las articulaciones pequeñas diartrodiales de las manos y pies. Los efectos adversos más comunes son la destrucción del cartílago articular, y anquilosis de las articulaciones. Las

citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-17 tienen un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Scott et al., 2010).

No existe una cura conocida, y el objetivo de las terapias actuales es lograr el nivel más bajo posible de actividad de la patología. Las etapas iniciales de la AR se pueden dividir en dos fases principales, la inducción de la autoinmunidad a componentes de la articulación ricos en colágeno y, posteriormente, la evolución de un proceso inflamatorio destructivo (Gonzalez et al., 2009).

La progresión de la patología, provoca que debido a la respuesta autoinmune, las células Th1 y Th17 aberrantes entren en los tejidos de las articulaciones, y la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, promuevan la infiltración de neutrófilos y macrófagos, resultando en la destrucción de las articulaciones (Gonzalez et al., 2009). Por este motivo, la AR puede ser una enfermedad candidata para la reparación articular potencialmente a través de las MSC debido a sus propiedades de la antiinflamatorias e inmunosupresoras mediante la modulación de la proliferación de células T y B y la producción de citoquinas en un complejo mayor de histocompatibilidad de manera independiente (Ren et al., 2008).

Liu y colaboradores investigaron los efectos terapéuticos de la infusión sistémica de MSC procedentes de cordón umbilical humano, cultivadas con tejido sinovial de pacientes con AR, demostrando que las MSC inhiben la proliferación de sinoviocitos tipo fibroblasto (FLS), los cuales son células residentes de las articulaciones sinoviales que tienen un papel crucial en la inflamación y la destrucción articular. Las MSC suprimieron el comportamiento invasivo, la expresión de MMP-9 y la respuesta inflamatoria de FLS. Además, las células Treg que juegan un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia autoinmune en la AR se incrementaron significativamente (Liu et al., 2010).

En un estudio realizado en un modelo de ratón, se evaluó el uso de MSC en artritis inducida por colágeno y se vio que estas células previenen daños en los tejidos, reducen las respuestas inflamatorias y restablecen la relación entre células Th1 y Th2, mejorando significativamente la patología (Zarrabi et al., 2014).

Augello y colaboradores informaron que una sola inyección de MSC en un modelo murino impidió daños en el hueso y el cartílago articular a través de una reducción en la proliferación de linfocitos T y una modulación de la expresión de citoquinas inflamatorias, en particular una disminución del factor de necrosis tumoral. Curiosamente, las MSC inyectadas no se encontraron en el órgano diana, lo que sugiere que el efecto es probablemente debido a una interacción inmune sistémica en los órganos linfoides secundarios. Los resultados mostraron

que las MSC pueden prevenir y tratar AR, reduciendo significativamente la incidencia y la severidad de la patología. El tratamiento con MSC inhibió la producción de varios mediadores de la inflamación, disminuyó expansión de células Th1/Th17 específicas de antígeno, e indujo la producción de citoquinas como interleuquina-10 en los ganglios linfáticos y articulaciones (Augello et al., 2007). Por otra parte, las MSC podrían inducir la generación de nuevas células T reguladoras específicas de antígeno (células Treg) con capacidad de suprimir las respuestas de células T específicas de colágeno (Zhou et al., 2011, Gonzalez et al., 2009, Gonzalez-Rey et al., 2010).

De lo que se ha descrito anteriormente, se observaron los mejores beneficios terapéuticos cuando las MSC se inyectaron de forma repetitiva vía sistémica en lugar de inyección local. Con todos estos datos, hay que destacar que se necesitan más estudios clínicos para aclarar la efectividad de este tratamiento, destacando que no hubo eventos adversos en ninguno de los estudios (Liu et al., 2010, Gonzalez et al., 2009, Augello et al., 2007).

Cicatrización de heridas

Retrasos o fallos de cicatrización, infecciones, disminución de la circulación, baja nutrición y baja celularidad son problemas comunes en heridas profundas (Atiyeh et al., 2005).

En un estudio realizado en ratones con un defecto completo de piel, la inyección de MSC en el lugar de la lesión, mostró una mejora significativa de la cicatrización, con una capa de la epidermis recién formada mucho más gruesa en el grupo experimental en comparación con el grupo de control. Se observó un aumento significativo en la cantidad de células en el tejido de la piel de regenerada con una mejora de las crestas dérmicas. Las MSC produjeron una mayor y mejor cicatrización de la herida, dando lugar a una curación más rápida de la herida (Luo et al., 2010).

Patologías cardíacas

A pesar de las mejoras en las terapias médicas y quirúrgicas, las enfermedades del corazón y la insuficiencia cardíaca, siguen teniendo hoy en día una elevada morbilidad y mortalidad.

La terapia con MSC, es una opción atractiva para la reparación cardiovascular debido a sus propiedades regenerativas e inmunomoduladoras. En estudios preclínicos, se vieron que las MSC se insertaron en el corazón y mejoraron la reparación cardíaca después de su administración (Zhang et al., 2006, Jiang et al., 2006, Nagaya et al., 2005).

Ensayos clínicos que utilizan MSC para mejorar la función cardíaca también han obtenido resultados alentadores. En un estudio piloto, 69 pacientes con infarto agudo de miocardio fueron asignados al azar en dos grupos, uno de los cuales recibió una inyección coronaria percutánea de MSC autólogas, y el otro, solución salina normal, siendo este el grupo control. Durante el estudio no hubo efectos adversos graves tras la administración de MSC, y el grupo tratado con las mismas, mostró una mejora significativa en la función cardíaca, en comparación con el grupo control. Este fue también el primer estudio que siguió y detectó la viabilidad de las MSC y la función cardíaca con el mapeo electromecánico cardíaco. Los resultados indicaron que las MSC eran todavía viables 3 meses después del trasplante (Chen et al., 2004).

Después de este estudio, las MSC se han utilizado para tratar a pacientes con infartos agudos y crónicos de miocardio, con mejoras significativas en las funciones cardíacas (Chen et al., 2006a, Katritsis et al., 2005, Yang et al., 2010, Zeinaloo et al., 2011).

Además de las MSC autólogas, también se ha comprobado la eficacia de las MSC alogénicas. Se ha utilizado un producto comercial de MSC derivadas de médula ósea, el cual se administró a pacientes con infarto de miocardio con reperfusión en un ensayo a doble ciego, con un grupo control tratado con placebo. Las MSC alogénicas fueron bien toleradas, con un aumento significativo en la fracción de eyección ventricular izquierda y una menor incidencia de arritmia y dolor en el pecho, en comparación con el grupo placebo (Hare et al., 2009).

Osteogénesis imperfecta

La osteogénesis imperfecta (OI), o enfermedad de los huesos quebradizos, es una patología que se caracteriza por fragilidad del esqueleto y del tejido conjuntivo, alteraciones causadas por mutaciones dominantes en genes COL1A1 y COL1A2 del colágeno tipo I. Se caracteriza por osteopenia, fracturas múltiples, deformidades óseas graves y acortamiento considerable de estatura (Byers et al., 1991, Cabral y Marini, 2004).

Esta patología, se clasifica en dos categorías, según los defectos estructurales, y según los defectos cuantitativos (Byers et al., 1991, Cabral y Marini, 2004). El tipo I pertenece a defectos cuantitativos, mientras que los tipos II, III y IV generalmente resultan de defectos estructurales de las cadenas alfa. El tipo II es la forma más letal, transmitida por vía perinatal. Los tipos III y IV resultan en una deformación progresiva, con deformidades esqueléticas graves en algunos casos (Millington-Ward et al., 2002).

Los defectos cuantitativos son causados generalmente por un alelo nulo COL1A1, que resulta en una menor cantidad de colágeno, estructuralmente se mantienen normales y únicamente tienen síntomas leves (Cabral y Marini, 2004).

Hasta el momento no existe cura para la OI, sólo las células y terapias basadas en genes han mostrado efectos positivos mediante la expresión de los alelos normales para reemplazar tejidos anormales en los que la mutación se expresa (Caplan, 1995).

Los experimentos preclínicos se han llevado a cabo en el modelo murino. Las células estromales de médula ósea de ratones de tipo salvaje fueron infundidas en ratones receptores transgénicos irradiados con un fenotipo de la osteogénesis imperfecta. De acuerdo con los resultados, el 1,5-12% de las células del donante se encontraron en diversos tejidos, incluyendo los huesos, lo que sugirió que las MSC son capaces de incluirse en los huesos, diferenciarse en osteocitos y producir colágeno de tipo I con la restauración parcial del fenotipo OI (Pereira et al., 1998).

Resultados similares se han obtenido después del trasplante intrauterino de MSC fetales humanas en ratones con OI, en los cuales se muestra las MSC fueron capaces de disminuir las tasas de fractura, anomalías esqueléticas y corregir defectos asociados con OI (Guillot et al., 2008).

Un estudio realizado en humana trasplantó médula ósea a pacientes pediátricos que padecían la patología. Estas células dieron lugar a la formación de osteoblastos funcionales, los cuales consiguieron una mejora en la estructura ósea y la función del esqueleto. A pesar de que sólo se logró un bajo nivel de injerto, un estudio de seguimiento demostró mejoras continuas en los pacientes de 18 a 36 meses después del trasplante. Es importante señalar que estos pacientes fueron trasplantados con médula ósea completa en lugar de únicamente MSC aisladas (Horwitz et al., 1999, Horwitz et al., 2001).

Otro estudio más reciente realizado por Gotherstrom y colaboradores, sugiere que el trasplante prenatal de MSC alogénicas, parece ser seguro y produce un beneficio clínico probable, además demuestra que el retrasplante con células del mismo donante es factible. Sin embargo, existe una limitada experiencia hasta la fecha en el tratamiento de esta patología, lo que nos indica que no es posible ser concluyentes, y se necesitan más estudios que profundicen en el tratamiento de la patología (Gotherstrom et al., 2014).

Osteoporosis

La osteoporosis es una enfermedad común del tejido óseo relacionada con la edad y se caracteriza por la pérdida de masa y de fuerza ósea, que resulta de un desequilibrio entre los procesos de formación de hueso y de resorción ósea, dando lugar a fracturas por fragilidad, más comúnmente en vértebras, articulación del carpo y la cadera. Esta patología se acompaña de un aumento en la formación de tejido adiposo (Raisz, 2005).

Hoy en día, debido al aumento de la esperanza de vida, esta patología se está convirtiendo en un problema clínico importante. En medicina humana, aproximadamente el 50 % de las mujeres de 65 años de edad, en última instancia experimentan una fractura osteoporótica durante su vida (Raisz, 2005).

El trastorno puede ser debido a los defectos de las MSC sobre la proliferación y la diferenciación posterior de osteoblastos (Wang et al., 2006). En un estudio realizado por Turgeman y colaboradores, se obtuvieron MSC de ratones con osteoporosis, en los cuales se observó un aumento de la apoptosis en el cultivo. Por otra parte, la reducción de la proliferación se acompañó con aumento de la apoptosis en las MSC de ratones osteopélicos (Turgeman et al., 2002a, Turgeman et al., 2002b).

En 1994, Bruder fue el primero que propuso que las MSC humanas autólogas se pueden utilizar para el tratamiento de muchas enfermedades clínicamente desafiantes, como la osteoporosis, afirmando que la administración sistémica del cultivo expandido de MSC autólogas ayudaría en el tratamiento de estas patologías (Bruder et al., 1994). Además, también se ha visto que la inhibición de la adipogénesis y el aumento de osteoblastogénesis en las MSC de médula podría proporcionar un nuevo enfoque terapéutico para la osteoporosis (Nuttall et al., 1998).

La osteoporosis es más común en las mujeres postmenopáusicas que tienen deficiencia de estrógenos, los cuales son un regulador para aumentar la formación de hueso. Muchos estudios indican que el estrógeno es capaz de aumentar directamente la proliferación de osteoblastos de ratón y la diferenciación de las MSC, y hasta regular la expresión de mRNA de los genes osteogénicos para ALP, colágeno I, TGF-beta 1, BMP-2 (aumenta el número de las MSC y la actividad osteogénica por aumento de la proliferación y la diferenciación osteogénica, así como la reducción de la apoptosis) y Cbfa1, así como la inhibición de la apoptosis y la expresión de ERbeta en las MSC de los ratones con osteoporosis (Turgeman et al., 2002b, Zhou et al., 2001).

Hasta ahora, se ha estudiado varios modelos de osteoporosis en animales, los cuales se han llevado a cabo a través de la ovariectomía de conejo (Wang et al., 2006), ratón (Zhou et al., 2001), rata (Ocarino Nde et al., 2010), ovejas (Egermann et al., 2011) y mono (Jerome et al., 2011). Estos experimentos in vivo indicaron que el trasplante de MSC autólogas o alogénicas fue capaz de fortalecer el hueso osteoporótico en los animales a los cuales se les trasplanto las MSC (Wang et al., 2006, Ocarino Nde et al., 2010). Por otra parte, las MSC son capaces de alojarse en la superficie del hueso trabecular, dirigido por inyección (Ocarino Nde et al., 2010) o la migrar a la médula ósea aliviando los síntomas de la osteoporosis a través de un trasplante intravenoso (Hsiao et al., 2010).

Más recientemente, en humana se aislaron MSC derivadas del tejido adiposo, las cuales se aislaron de paciente con fracturas osteoporóticas. El resultado mostró que las MSC del tejido adiposo, son una de las fuentes de células más prometedoras para el tratamiento de la osteoporosis relacionada con la edad (Chen et al., 2012).

Osteonecrosis de la cabeza femoral

La osteonecrosis de la cabeza femoral (ONFH), o necrosis avascular de la cabeza femoral (ANFH), es una enfermedad degenerativa progresiva que resulta de la interrupción del suministro de sangre al hueso y, si no se trata a tiempo, conduce al colapso total de la cabeza femoral finalmente, y requiere el reemplazo total de cadera en medicina humana o en algunos casos, a la exéresis de la cabeza femoral en medicina veterinaria (Wang et al., 2005, Feitosa et al., 2010).

Es una enfermedad dolorosa multifactorial cuya patogenia es aún desconocido. Algunos de los factores de riesgo conocidos para desarrollar ONFH son trauma, alcohol y el uso a largo plazo de esteroides (Feitosa et al., 2010, Wang et al., 2005).

El injerto de médula ósea autóloga con MSC, se ha usado para el tratamiento de ONFH desde 1991 (Chan et al., 1991), obteniendo buenos resultados a corto plazo (Wassenaar et al., 1996, Gangji et al., 2004, Wang et al., 2010), y a largo plazo, donde los estudios de seguimiento a los 10 años confirmaron el efecto de la implantación (Hernigou et al., 2009, Gangji et al., 2011).

Las MSC de médula ósea implantadas no sólo proliferan y se diferencian a osteoblastos, sino que también secretan citoquinas angiogénicas (Noel et al., 2002, Kuo et al., 2009).

Diversas investigaciones preclínicas se han llevado a cabo usando una variedad de modelos animales para evaluar la eficacia terapéutica de las MSC en ONFH, por ejemplo, en el ratón

(Cui et al., 2006), conejo (Li et al., 2011), perro (Peng et al., 2011) y ovejas (Feitosa et al., 2010), indicando que el trasplante autólogo o alogénico de MSC, es capaz de sobrevivir, proliferar y diferenciarse en osteoblastos directamente en la cabeza femoral necrótica después del trasplante, observándose una mejora en la reparación de la necrosis y una mejora de la regeneración ósea. Además, las MSC intravenosas implantados muestran buen resultado migrando y reparando los tejidos lesionados.

En medicina humana, se han realizado estudios clínicos, los cuales han informado sobre el tratamiento de ONFH con MSC derivadas de médula ósea. Se tratan de estudios clínicos aleatorios de 8 y 100 pacientes que padecían ONFH. Las MSC autólogas se extrajeron, se expandieron y se implantaron en las caderas de los pacientes. Los resultados de seguimiento en diferentes momentos después de operaciones mostraron que los pacientes tratados con MSC mejoraron significativamente la puntuación de cadera de Harris y EVA, el dolor se alivió, así como se produjo una disminución de la zona necrótica en la cabeza femoral. Además, no se observó ninguna reacción adversa, por lo que llegaron a la conclusión que el trasplante de MSC autólogas es un tratamiento seguro y eficaz para evitar el colapso ONFH (Chang et al., 2010, Zhao et al., 2012).

Pak publicó dos estudios sobre la regeneración a corto plazo de tejido similar al hueso medular y la reducción a largo plazo en el dolor de la cadera después de un tratamiento de MSC autólogas derivadas del tejido adiposo en cuatro pacientes con ONFH, sugiriendo que la implantación de MSC es una terapia mínimamente invasiva prometedora para el tratamiento de la ONFH (Pak, 2012, Pak, 2011).

Osteoartrosis

La osteoartrosis (OA) es la patología más frecuente de las enfermedades crónicas. Se caracteriza por la degeneración del cartílago articular, acompañada de esclerosis ósea subcondral e inflamación sinovial (Gharbi et al., 2011). Esta patología afecta sobre todo a personas adultas, la mayoría de la población mayor de 65 años de edad muestra signos radiológicos de OA en al menos una articulación (Aigner et al., 2004). En el caso de la especie canina, se puede dar en perros de distintas edades con una incidencia tan alta que afecta al 20% de la población de perros adultos y al 80 % de los animales geriátricos, siendo la causa más común de cojera en perros mayores de un año (Rialland et al., 2012).

Entre sus manifestaciones clínicas, encontramos dolor en las articulaciones y dificultad al movimiento. Afecta a los tejidos circundantes, con inflamación local y destrucción del cartílago

articular, lo que estimula las células de revestimiento sinoviales y los condrocitos articulares en el cartílago enfermo para sintetizar y secretar enzimas proteolíticas como metaloproteasa de la matriz, agreganasa, citoquinas y mediadores proinflamatorios tales como óxido nítrico y prostaglandinas que degradan la matriz cartilaginosa (Mokbel et al., 2011).

A pesar de la elevada prevalencia y morbilidad de la OA, la restauración del cartílago articular en los pacientes enfermos hoy en día es un reto, además, la naturaleza no vascular del cartílago hace que sea muy difícil la regeneración del mismo. Por este motivo la terapia celular es un candidato esperanzador para la reparación del cartílago. Las MSC se han utilizado para estudiar el tratamiento de la OA tanto en modelos animales como humanos, obteniéndose unos resultados muy esperanzadores.

Un estudio realizado en la especie cunícula por Koga y colaboradores, desarrolló un método de trasplante de células mediante la suspensión de MSC en líquido sinovial, que posteriormente trasplanto en la articulación lesionada. Esta articulación presentaba defectos osteocondrales de espesor completo en la ranura troclear del fémur. El resultado mostró que un gran número de las MSC trasplantadas se adhirieron al defecto a día 1, y a día 24 el defecto de cartílago mejoró de manera significativa. La colocación de las MSC en suspensión en el defecto de cartílago, en sólo 10 minutos, dio lugar a más de 60 % de unión de las MSC al defecto, y promovió la regeneración del mismo (Koga et al., 2008).

Por otra parte, Black y colaboradores realizaron dos ensayos clínicos aleatorizados ciegos, donde evaluaron el efecto de las MSC derivadas del tejido adiposo como terapia para el tratamiento de perros con osteoartrosis crónica de las articulaciones coxofemoral y humeroradial. Las MSC autólogas fueron inyectadas intraarticular, y el seguimiento de la eficacia fue evaluada por los veterinarios, los cuales valoraron la cojera, dolor a la manipulación, rango de movilidad y la discapacidad funcional, utilizando una escala de calificación numérica al inicio del estudio. Se obtuvo una mejora significativa en las articulaciones tratadas con MSC en comparación con el grupo control (Black et al., 2008, Black et al., 2007).

Otro estudio realizado por nuestro equipo de investigadores evaluó de manera objetiva mediante una plataforma de fuerza, el efecto la infiltración intraarticular autóloga de MSC derivadas de tejido adiposo inguinal, en combinación con PRGF en perros con OA, obteniendo una mejora de todos los parámetro valorados (pico de fuerza vertical e impulso vertical) a 1, 3, y 6 meses post-infiltración, sin la obtención de efectos secundarios (Vilar et al., 2013).

El tratamiento de la OA basado en MSC en modelos animales ha demostrado su potencial para estimular la regeneración de cartílago y retardar la destrucción progresiva de la articulación. Sin embargo, la progresión de la OA humana es más lenta y puede ocurrir durante un período de 15 a 30 años (Huang et al., 2011).

El equipo de Wakitani y colaboradores, realizó el primer estudio clínico en 24 pacientes con OA que fueron sometidos a una osteotomía tibial (OT). Se utilizaron MSC, que se combinaron con un gel de colágeno. Estas fueron trasplantadas en el defecto de cartílago articular en el cóndilo femoral medial, y cubiertos con periostio autólogo en el momento de la OT. Cuarenta y dos semanas después del trasplante, los defectos estaban cubiertos con tejido blando blanco, el cual contenía una parte de cartílago hialino. La puntuación de clasificación artroscópica e histológica fue más elevada en el grupo trasplantado con células, que en el grupo de control sin células. El resultado fue alentador, aunque los signos de mejoría clínica no fueron muy claros (Wakitani et al., 2002).

Para evitar una cirugía invasiva, una alternativa prometedora en humana, fue la inyección percutánea de MSC. Pak realizó un estudio clínico en algunos de los pacientes con osteoartrosis de rodilla. Las MSC autólogas derivadas de tejido adiposo de origen abdominal, combinadas con ácido hialurónico, plasma rico en plaquetas, cloruro de calcio y una dosis de nanogramos de dexametasona, se inyectaron en la rodilla de dos mujeres coreanas con OA. A la semana 12, su dolor había mejorado más de 90 %, al igual que el rango de movimiento. La resonancia magnética mostró un aumento significativo en el espesor del cartílago en las rodillas (Pak, 2011).

Otro estudio más reciente de Jo y colaboradores, evaluó la seguridad y eficacia de la inyección intraarticular de MSC autólogas derivadas del tejido adiposo para el tratamiento de la OA de rodilla. Se incluyeron 18 pacientes en el estudio, los cuales padecían enfermedad degenerativa articular en esta articulación y fueron tratados con infiltración intraarticular de MSC, a diversas dosis (baja, media y elevada). Se evaluaron en cada uno de ellos la seguridad y el índice de *“Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index”* (WOMAC), además de evaluaciones clínicas, radiológicas, artroscópicas, e histológicas. No hubo eventos adversos relacionados con el tratamiento. La puntuación WOMAC mejoró a los 6 meses después de la infiltración en el grupo de dosis alta. La artroscopia mostró que el tamaño del defecto de cartílago disminuyó en los cóndilos medial tibial y femoral medial del grupo de dosis alta. Mientras que la histología mostró un aumento del volumen de cartílago con regeneración de cartílago hialino. Estos resultados mostraron que la inyección intraarticular de MSC, mejora de

la funcionalidad de la rodilla con osteoartritis y el dolor de la articulación, sin causar efectos secundarios, a la vez que se da una reducción de los defectos del cartílago con regeneración de cartílago articular hialino (Jo et al., 2014).

Existen investigadores, que opinan que la infiltración intraarticular directa, es posible en las primeras etapas de la enfermedad, cuando defecto se limita a la capa de cartílago, mientras sería necesario un andamio o para apoyar a las MSC en caso de que el defecto de hueso subcondral expuesto afecte a grandes áreas (Noth et al., 2008). Existen diferentes “scaffold” útiles para las MSC, la cuales se unieron y crecieron con éxito en cada uno de ellos, implantándose con éxito en el defecto del cartílago por artrotomía abierta. Estos andamios incluyen matriz extracelular sintética o natural, que consiste en ácido-hialurónico y gelatina (Liu et al., 2006), biocerámica fosfato andamio-beta-tricálcico (Guo et al., 2004), fibrina (Hui et al., 2004), ácido poliláctico (Yan y Yu, 2007), esponja gel de hialurónico (Kayakabe et al., 2006) y gel de colágeno (Kuroda et al., 2007). Con todo esto, hay que destacar que la operación de la implantación de andamio por artrotomía abierta era más invasiva y podría aumentar el riesgo de infección de la articulación a tratar.

Uso intravenoso de las MSC

La terapia se complica cuando nos encontramos con pacientes con múltiples articulaciones afectadas. En estos casos, la realización de varias artrocentesis puede complicar la evolución del paciente por lo invasivo de la técnica, además de requerir una anestesia general para poder realizar todos los procedimientos de manera segura para el paciente. La administración intravenosa supone una ruta menos invasiva que la intraarticular, y con ello se reduce en primer lugar el riesgo que conlleva el procedimiento anestésico, y en segundo lugar, el riesgo de lesión iatrogénica o contaminación directa de la articulación. Estudios in vivo, han demostrado que la administración intravenosa de células mesenquimales derivadas de la médula ósea en conejos con lesiones avasculares de cabeza femoral, son capaces de revertir el daño óseo y revascularizar la lesión diana (Li et al., 2011). Por otro lado, el mismo autor, en 2014 demostró la capacidad de las células mesenquimales para sobrevivir en condiciones de hipoxia hasta 6 semanas, no observándose ningún tipo de efecto secundario por la distribución aleatoria sobre tejidos sanos (Li et al., 2014).

Sobre este hecho existe cierta controversia, ya que Hoogduijn y colaboradores realizaron un estudio en el que demostraron que la infusión intravenosa de células mesenquimales puede inducir de manera inmediata un fenómeno inflamatorio a nivel pulmonar (Hoogduijn et

al., 2013). Otro estudio realizado en 2014 en la especie canina, mostró mediante tomografía computarizada multidetector que la infusión intravenosa de MSC pueden ocasionar como efectos adversos edema y hemorragia pulmonar (Kang y Park, 2014).

Controversia en el uso de las MSC

En cuantos a los efectos adversos observados en el tratamiento con MSC, en la mayoría de la literatura al respecto, se ha visto que debido a su potencial inmunomodulador, antiinflamatorio, y antifibrótico, el uso de MSC autólogas, en infiltración intraarticular para defectos condrales y para otras patologías, no mostraron una antigenicidad potencial y, de hecho, su trasplante no indujo desarrollo de infección, rechazo o reacciones inflamatorias debido sobre todo a la regulación de la respuesta inmune mediante la inhibición de la activación de células T y el bloqueo del ciclo celular, junto a la inhibición de la presentación de antígenos por las células dendríticas. Este efecto inmunosupresor está relacionado principalmente a la liberación de factores solubles por las MSC y por el contacto directo de las MSC con las células inmunes (Veronesi et al., 2013, Hatsushika et al., 2014, Orozco et al., 2013, Jo et al., 2014, Jorgensen, 2013, Koh y Choi, 2012, Roubille et al., 2013).

En cuanto a la capacidad de las MSC para suprimir respuestas inmunes in vivo en un entorno alogénico todavía existe incertidumbre al respecto. Varios son los artículos que no reportan efectos adversos con el tratamiento con este tipo de células, pero existen otros en los que si que se describen. Un artículo publicado por Ryan y colaboradores en 2014, diferenciaron MSC alogénicas a condrocitos, encapsulándolas en alginato e implantándolas vía subcutánea en los pacientes, se vio que las MSC diferenciadas y encapsuladas, inducían memoria sistémica de células T. Por lo que llegaron a la conclusión, que la terapia con MSC alogénicas diferenciadas, podría necesitar tratamiento inmunosupresor previo (Ryan et al., 2014).

Otros autores en diversas disciplinas, también ponen en duda este efecto inmunomodulador, como es el caso de Tatyana y colaboradores, los cuales querían comprobar si las MSC conservan sus propiedades inmunomoduladoras tras un alotrasplante. Estos autores infiltraron MSC de forma intravenosa, observando que las células infiltradas no consiguieron reducir la mortalidad relacionada con la enfermedad huésped contra injerto, llegando a la conclusión que las MSC pierden su potencial inmunosupresor en un organismo ajeno (Prigozhina et al., 2008).

El uso de MSC de forma intravenosa es muy reciente, y aún no se conocen con exactitud las reacciones adversas que se pueden presentar con esta técnica. Un estudio realizado por Kang

y Park en perros de raza Beagle, demostró que tras la aplicación intravenosa de MSC procedentes de médula ósea, se observó mediante tomografía computerizada multidetector, cambios en el parénquima pulmonar. La histopatología mostró en cuatro de los nueve perros edema del parénquima pulmonar junto con hemorragia asociada (Kang y Park, 2014).

Biomarcadores Húmedos

Actualmente no existe ningún biomarcador establecido como herramienta para el diagnóstico de la OA, pero al tratarse de procesos sencillos, de bajo coste, fácil recolección, y tiempo de examen corto, en relación con otros métodos, cada vez son más los estudios que intentan establecer una metodología basada en los biomarcadores que nos ayude al diagnóstico y seguimiento de esta patología (Kaneko et al., 2013, Sasaki et al., 2013).

Como ya hemos mencionado, los biomarcadores están atrayendo la atención como las nuevas herramientas de diagnóstico. En la OA, el uso de los biomarcadores, tiene especial importancia en el diagnóstico y la detección temprana de la patología, ya que el diagnóstico de la misma mediante radiografías no es del todo concluyente debido a la baja sensibilidad de estas para detectar pequeños cambios en fases iniciales de la patología (Bedson y Croft, 2008).

Las limitaciones en el uso de los biomarcadores se deben al hecho de que no hay biomarcadores en la OA que puedan caracterizar el estado de la enfermedad en un paciente de forma individual (Ishijima et al., 2011a). Además, la carga de marcadores de la enfermedad

sólo se puede utilizar para los estudios clínicos porque los valores individuales obtenidos en grupos de pacientes con diferentes grados de OA son muy diversos y se superponen entre sí (Rousseau y Delmas, 2007).

Otro de los inconvenientes más notables del uso de biomarcadores sistémicos, es que se pueden ver afectados por muchos otros factores además de la patología, como por ejemplo la edad, la actividad física, problemas médicos asociados con el envejecimiento, el ritmo circadiano, la ingesta de alimentos y las actividades vigorosas entre otros (Rossler et al., 1998).

Para utilizar un biomarcador como una herramienta diagnóstica, se deben establecer unos intervalos de referencia fiables con los cuales se deben comparar cada uno de los pacientes con el fin de establecer un diagnóstico médico y una buena gestión terapéutica (Kaneko et al., 2013).

Respecto a los biomarcadores utilizados para el diagnóstico de la OA se pueden clasificar como secos o como solubles. Los biomarcadores secos incluyen radiografía, ecografía y resonancia magnética, todos útiles para confirmar el diagnóstico y para evaluar y supervisar la actividad de la enfermedad y la gravedad. Los biomarcadores solubles o mojados pueden ser indicadores específicos de la inflamación de las articulaciones y de la degradación, y también se pueden clasificar en función del medio en el que se detectan: en el suero, orina o líquido sinovial (Ramonda et al., 2013).

En nuestro caso, vamos a prestar especial atención a los biomarcadores que se encuentran en el suero, destacando entre ellos:

Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (CRP) es una proteína de fase aguda (PFA) que fue descubierta en 1930 por William Tillett y Thomas Francis. Se denomina CRP porque se detectó en el plasma de pacientes que padecían neumonía pneumocócica y reaccionaba con el polisacárido C del pneumococo (Tillett y Francis, 1930).

Las PFA son proteínas que son sintetizadas en el hígado, en unos casos incrementando y en otros disminuyendo su concentración plasmática en respuesta a una fase aguda (RFA) (Martínez-Subiela et al., 2001). En el caso de la CRP, se trata de una PFA positiva, ya que sus niveles se ven aumentados cuando se produce la RFA (Kushner et al., 1981).

Es una proteína perteneciente a la familia de las pentraxinas, con un peso molecular de 100 kDa consistente en cinco subunidades polipeptídicas de 20 kDa, unidas por enlaces no

covalentes (Caspi et al., 1987, Yamashita et al., 1991). Se sintetiza predominantemente en el hígado y se regula por citoquinas proinflamatorias, tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleukina seis (IL-6) (Aziz et al., 2003).

El papel central de la CRP es reconocer las células dañadas, microorganismos y sus productos, favoreciendo la quimiotaxis, opsonización y fagocitosis (Mold et al., 1982) y posteriormente, reparar la lesión, mediante la activación de la cascada del complemento (Crisman et al., 2008, Pepys y Baltz, 1983). Sin embargo, ejerce una función antiinflamatoria destacada, modulando la respuesta por parte de los monocitos y macrófagos, e induciendo la liberación de las citocinas pro-inflamatorias (Pue et al., 1996), captación de cromatina (Robey et al., 1984) y previniendo la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales favoreciendo la destrucción de los antígenos nucleares liberados mediante apoptosis o necrosis tisular (Zouki et al., 1997, Crisman et al., 2008).

Su concentración sérica se puede determinar a partir de diversas pruebas, pero en la especie canina, se ha validado para su uso un ensayo inmunoturbidimétrico automático para CRP sérica humana, lo que constituye un método rápido y rutinario en laboratorios diagnósticos (Kjelgaard-Hansen et al., 2003).

Los niveles normales de CRP en suero de perros sanos son <5 g/L según Caspi, o 0-1 mg/dl según Onishi y Nakamura (Caspi et al., 1987, Onishi et al., 2000, Nakamura et al., 2008). En un estudio realizado en 2010 en hembras caninas sanas, se detectaron valores entre 2,2-4,4 mg/L (Crossley et al., 2010), resultado que coincide con otros autores (Yamashita et al., 1994, López et al., 1998, Martínez-Subiela et al., 2003, Goldsack, 2005), quienes describen valores de hasta 7 mg/L en animales sanos. Por tanto, la CRP está en niveles no detectables o muy bajos en animales sanos, aumentando su concentración en respuesta a procesos inflamatorios o infecciosos (Martínez-Subiela et al., 2003).

La presencia de esta proteína ha sido documentada en seres humanos, rumiantes, suidos, perros y équidos (Gabay y Kushner, 1999, Murata et al., 2004). En cerdos y perros se considera como una de las principales PFA. En el perro se producen de forma rápida aumentos muy evidentes de CRP en respuesta a estímulos como cirugía, inyección de agentes inertes (caseína, turpentina) o infecciones bacterianas (leptospirosis), pudiendo ser esta respuesta incluso más rápida que en humana (Caspi et al., 1987). También se han observado aumentos de esta proteína en Erlichiosis (Rikihisa et al., 1994), enteritis bacteriana y hemorrágica, tumores, parvovirus (Yamamoto et al., 1993) y en infecciones experimentales con *Bordetella bronchiseptica* (Yamamoto et al., 1994).

Estudios recientes realizados en humanos sugieren a la CRP como potencial biomarcador de un mayor riesgo de cáncer (Allin et al., 2009).

CRP en OA

Aunque la OA se describe generalmente como una enfermedad no inflamatoria, diversos estudios han indicado que la presencia de inflamación intraarticular leve contribuye al desarrollo y progresión de la OA (Ramonda et al., 2013). La CRP es, probablemente, el marcador de fase aguda de laboratorio más popular utilizado para evaluar la actividad de la EDA, ya que se ha encontrado aumentada en diversos estudios, en pacientes que padecen la patología (Conrozier et al., 2000, Conrozier et al., 1998).

Existen autores que dicen que el análisis en suero de la CRP parece ser más útil en la evaluación de la actividad de la patología, que en su diagnóstico (Punzi et al., 2004).

Es ampliamente conocido que casi la totalidad de las concentraciones séricas de CRP se derivan de la producción hepática y que las citoquinas inflamatorias, en particular, la IL-6, son los principales responsables de su síntesis. Por otra parte, se ha demostrado que, incluso en los niveles más leves de OA, las principales citoquinas proinflamatorias tales como IL1b, IL6, IL8, y factor de necrosis tumoral están aumentando en el líquido sinovial. Por este motivo existen autores que opinan que la IL6 circulante, puede estimular la síntesis de CRP, derivada de la articulación, principalmente del líquido sinovial (Punzi et al., 2002).

Las correlaciones entre los niveles de CRP, y el número de articulaciones afectadas, diagnosticadas tanto clínicamente como por gammagrafía ósea se han demostrado en un estudio realizado por Punzi y colaboradores, apoyando la idea de la CRP como indicador de la actividad de patología (Punzi et al., 2005c).

Otro estudio realizado por Chen y colaboradores, en pacientes con síntomas de OA en las articulaciones de la mano, demostró que aunque en estos pacientes no existían evidencias clínicas de OA, la CRP apareció aumentada en el suero, por lo que los investigadores llegaron a la hipótesis que la CRP puede ser un biomarcador útil en etapas subclínicas de la patología (Chen et al., 2008).

Por otra parte, también se han descrito hallazgos contradictorios en otros estudios. En la especie canina, existe un estudio realizado por Bennett y colaboradores, los cuales evaluaron la CRP en suero y en líquido sinovial pre y post tratamiento con robenacoxib, un inhibidor selectivo de la COX2. En el estudio se vio una mejora clínica significativa de los animales 28 días después del tratamiento, disminuyendo también de manera significativa la CRP en el

líquido sinovial después del tratamiento, pero no así en el suero de los pacientes. Por este motivo llegaron a la conclusión que la CRP en líquido sinovial es un biomarcador útil respecto a la inflamación articular y monitorización de la respuesta al tratamiento, pero no para su uso como biomarcador de la OA en suero (Bennett et al., 2013).

Estos resultados concuerdan con los publicados por Hurter y colaboradores en un estudio realizado en humana, los cuales publicaron que los valores de la CRP en suero no permiten la detección de la OA en pacientes con clínica, por lo que no es un marcador fiable de la patología (Hurter et al., 2005).

Un estudio reciente publicado en 2014 por Sieburh y colaboradores, especula sobre la posibilidad de utilizar un fragmento de la degradación de la CRP el cual denomina CRPM como marcador de inflamación crónica, en contraste con la medición de la CRP circulante o proteína nativa, ya que estos autores dicen que la CRP cuantifica la inflamación sistémica, y por lo tanto no puede parecerse a la enfermedad relacionada con la inflamación crónica del tejido en la OA (Siebuhr et al., 2014).

Productos de degradación del colágeno

Las alteraciones en el cartílago articular dependen del equilibrio entre la síntesis y degradación de la matriz del cartílago. Estas variaciones se pueden controlar mediante la medición de las moléculas derivadas de esta síntesis y degradación, las cuales se liberan en fluidos biológicos, tales como el líquido sinovial, suero y orina (Ramonda et al., 2013).

Dado que el colágeno tipo II es la principal proteína estructural del cartílago, que representa aproximadamente el 50% de la matriz de cartílago extracelular, los fragmentos derivados de la degradación de este colágeno, se han investigado extensamente como potenciales marcadores de remodelación del cartílago en patologías como la OA (Garnero y Delmas, 2003).

Dentro de los biomarcadores, los primeros en ser identificados fueron los 'neo-epítomos' creados por la degradación enzimática de colágeno tipo II por las metaloproteasas de la matriz (Lohmander, 2004).

Entre los productos de la degradación del colágeno tipo II, los más conocidos son (Poole et al., 2004):

- Telopéptido carboxilo terminal del colágeno tipo II (CTX-II).
- Neo-epítomo C2C.
- Epítomo desnaturalizado Coll2-1.

- Forma nitrada del epítipo desnaturalizado Coll2-1NO2.

Entre estos productos, el Coll2-1NO2 se puede considerar como un indicador de la degradación oxidativa de la red de colágeno de tipo II (Henrotin et al., 2007).

PDC en OA

El desarrollo de inmunoensayos específicos para medir fragmentos de Coll-2-1 y su forma nitrada, Coll 2-1NO2, han sido validados para su medición en suero de pacientes sanos y de pacientes con OA. En estos estudios se han encontrado concentraciones de Coll 2-1 significativamente mayores en el suero de pacientes con OA en comparación con los de los controles sanos, lo que indica que la tasa de degradación Coll 2-1 es mayor en la OA. Estos hallazgos inmunohistoquímicos son consistentes con la teoría de que la principal fuente de Coll 2-1 en el suero, es el cartílago articular dañado (Ameje et al., 2007).

Coll 2-1 y Coll 2-1NO2 parecen ser útiles, siendo herramientas para la detección de procesos de degradación oxidativa del cartílago. En un estudio realizado por Punzi y colaboradores, los niveles séricos de Coll 2-1NO2/Coll 2-1 resultaron mayores en OA erosiva con respecto a los pacientes con OA no erosiva (Punzi et al., 2012).

Otro estudio realizado por Deberg y colaboradores, informaron que un aumento de Coll 2-1 y Coll 2-1NO, en orina durante un período de un año fue predictivo de progresión radiológica de OA (Deberg et al., 2005).

En la misma línea, existen estudios en los que el análisis de los biomarcadores Coll 2-1 y Coll 2-1NO se han estudiado para valorar la evolución de la patología con diversos tratamientos.

En un estudio realizado por Roemer y colaboradores, en pacientes con EDA, existió una disminución de Coll2-1 concomitante con una mejora de la evaluación global de la enfermedad en los pacientes (Roemer et al., 2011b).

De acuerdo con estos resultados, otro estudio realizado por Herontin y colaboradores midió la evolución durante 3 meses de los niveles séricos de Coll 2-1 y Coll 2-1NO en 51 pacientes con OA de rodilla, los cuales fueron tratados con tres inyecciones intraarticulares de 2 ml de ácido hialurónico. Las concentraciones séricas de Coll2-1 y Coll2-1NO fueron significativamente más elevadas en pacientes con un grado de artrosis KL III / IV, en comparación con pacientes con un grado KL I / II. Por otra parte se analizaron los sueros en basal, comparándolos con los extraídos post tratamiento. En estos sueros se observó una disminución sistemática, con el tiempo, tras el tratamiento con ácido hialurónico. Este efecto fue aún más pronunciado en

pacientes con KL III / IV. Este estudio sugiere un rápido descenso de Coll2-1 y Coll2-1NO y de la inflamación de las articulaciones después del tratamiento con HA, por lo que nivel sérico de Coll2-1 parece ser un factor predictivo para la respuesta al tratamiento (Henrotin et al., 2013).

En cuanto al biomarcador C2C, en un estudio llevado a cabo en la especie canina por Chu y colaboradores, se realizó un modelo de OA mediante una transección del LCA. En estos animales se midió la concentración de C2C en el líquido sinovial a tiempo cero antes del tratamiento, 4 semanas después del tratamiento con radiofrecuencia monopolar para producir la rotura del LCA, y a las 4, 8, y 16 semanas después de la rotura. Los resultados obtenidos, mostraron que el nivel de C2C del líquido sinovial es significativamente mayor después de la inestabilidad articular con la consecuente OA (Chu et al., 2002).

Estos resultados son similares a los obtenidos por el grupo de investigadores de Lu y colaboradores, los cuales provocaron una lesión de espesor parcial del cartílago en un modelo de ovino. En el análisis del líquido sinovial se observó un aumento de la concentración de C2C conforme iba progresando la degeneración articular (Lu et al., 2006).

En otro estudio realizado en conejillos de indias se midieron las concentraciones en el líquido sinovial de diversos biomarcadores. Los resultados mostraron una elevación de los biomarcadores derivados de líquido sinovial, mostrándose como un reflejo de la gravedad histológica en el modelo espontáneo de la OA (Huebner y Kraus, 2006).

En un estudio realizado por Ameye y colaboradores, se evaluaron los biomarcadores procedentes de la degradación del colágeno tipo II en ratones sanos y ratones con OA. En este estudio, se llegó a la conclusión que las concentraciones séricas de C2C y Coll2-1, pero no Coll2-1NO₂, son biomarcadores útiles de la degradación del colágeno en ratones con OA. Además comparando estos dos biomarcadores, C2C es un biomarcador más sensible que Coll2-1 para evaluar el aumento del catabolismo de colágeno de tipo II (Ameje et al., 2007). En este mismo estudio, también se llegó a la conclusión que las concentraciones de C2C pueden representar primeras etapas de la degradación del colágeno de tipo II, mientras que Coll2-1 puede ser un producto de degradación tardía del cartílago (Ameje et al., 2007).

Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (HA), como ya hemos comentado anteriormente, es un glicosaminoglicano sintetizado por los condrocitos y fibroblastos sinoviales, con un peso molecular elevado, entre 300 y 2,000 kDa (Archer y Francis-West, 2003). El HA es una

macromolécula lineal, compuesta por repeticiones de unidades de disacáridos: β -1,4-ácido glucurónico- β -1,3-N-acetil-D-glucosamina (DeAngelis, 1999). Se produce principalmente por los fibroblastos y otras células especializadas del tejido conectivo. Aunque se distribuye ampliamente en todo el organismo (cordón umbilical, cartílago nasal, vítreo, cutis o la linfa del tórax), la mayor concentración se encuentra en el líquido sinovial y también el tejido conectivo, así como en la membrana sinovial (Knudson, 1998).

En la articulación, el HA es un componente principal del líquido sinovial y la matriz extracelular del cartílago (Fraser et al., 1997). Entre otros fines, sirve como lubricante y juega un papel importante en la absorción y distribución de fuerzas mecánicas que afectan a la articulación. Además, inhibe la migración de células inflamatorias (Partsch et al., 1989), la producción de metaloproteasas de la matriz y otros mediadores pro-inflamatorios (Santangelo et al., 2007) y tiene efectos analgésicos, influyendo en los receptores del dolor intraarticulares (Waddell et al., 2007).

A nivel sistémico, se ha demostrado que los niveles de HA aumentan en individuos con enfermedad hepática en los que se utiliza como marcador de fibrosis, en insuficiencia renal, en tumores, en hipotiroidismo, en artropatía amiloide, y en psoriasis con o sin artropatía asociada (Ramonda et al., 2013).

HA en OA

Generalmente, los niveles de HA en suero aumentan en pacientes con OA, por lo que se considera un buen marcador biológico que refleja el daño del cartílago y la sinovitis en estos pacientes (Garnero et al., 2001, Sasaki et al., 2013). Estudios previos han demostrado su asociación con la presencia, severidad radiográfica, grado de dolor y progresión de la patología, aunque hoy en día, la asociación entre la gravedad de la enfermedad y la elevación de los niveles séricos de HA no está clara del todo (Sasaki et al., 2013, Garnero et al., 2001, Hosogane et al., 2012, Inoue et al., 2011, Golightly et al., 2011).

Según Laurent y colaboradores, la severidad de la OA se puede cuantificar por los valores de HA séricos, los cuales aumentan cuando la patología es más severa, pudiendo utilizarse no solo como un marcador de la inflamación sinovial, sino también un indicador del pronóstico de la patología (Laurent et al., 1996).

Cuando existe una inflamación sinovial se produce HA a nivel local, secretándose al líquido sinovial. Este aumento de HA intraarticular hace que pase a sangre y a linfa debido al aumento de la presión intraarticular, por estos motivos observamos un aumento de HA a nivel sistémico

en la EDA (Garnero et al., 2001, Fraser et al., 1997). Además, como ya hemos mencionado, el HA es un componente del cartílago articular, por lo que éste se ha visto aumentado en suero, en casos de artrosis donde radiográficamente se ha observado una disminución del espacio articular debido al daño del cartílago, de manera que, según algunos autores existe una correlación directa con este parámetro (Pavelka et al., 2004).

En un estudio realizado por Kaneko y colaboradores en 2013, se pretendía establecer un rango de referencia en cuanto a los niveles de HA en suero, correlacionándolos con la severidad de los signos radiológicos de OA presente en los pacientes. Para ello seleccionó a 372 pacientes con OA de rodilla de grado 1 a 4 en la escala de Kellgren y Lawrence (K/L). El mismo día que se les realizaron las radiografías para determinar el grado de OA, se les extrajo sangre para obtener la muestra de suero donde medir el HA. Los resultados revelaron que los intervalos de referencia en pacientes con OA de rodilla severa (K/L grado 4) se pueden estimar sin solapamiento, sin embargo los datos obtenidos de los pacientes con OA primaria (K/L de grado 1 a 3) se superponen de manera considerable. Estos hallazgos indicaron que la valoración del HA se puede utilizar como un biomarcador en EDA avanzada (K/L de grado 4), mientras que no es útil en pacientes con OA de rodilla temprana o moderada (K/L de grado 1, 2 y 3) (Kaneko et al., 2013).

En otro estudio realizado por Sasaki y colaboradores se seleccionaron 710 pacientes con OA de grado 2 o superior en la escala de K/L en las articulaciones de la rodilla, cadera, columna lumbar, dedos y muñeca. A todos los pacientes se les extrajo sangre el mismo día de la determinación radiográfica del grado de OA. La prevalencia de la OA de rodilla fue de 30.7 %, 16.8 % de la cadera, la columna vertebral lumbar 65,1 %, la muñeca 9,0 % y el dedo índice del 22,0%. Aunque este biomarcador refleja una condición sistémica, los niveles séricos de HA más altos se asociaron con el número total de las articulaciones afectadas, viéndose los valores más aumentados en los pacientes que padecían OA en rodillas y dedos. Los autores llegaron a la conclusión que esto es debido a que la rodilla es la articulación más grande entre las articulaciones que soportan peso y tiene un gran volumen de cartílago y membrana sinovial. Y, aunque el tamaño individual de las articulaciones interfalángicas es muy pequeño, su número es grande, lo que da lugar a gran volumen de cartílago y líquido sinovial (Sasaki et al., 2013). Esto coincide con la mayoría de la literatura, donde hay un mayor enfoque en la relación entre la OA de la rodilla y los niveles séricos de HA (Ishijima et al., 2011b, Garnero et al., 2001, Turan et al., 2007, Inoue et al., 2011, Golightly et al., 2011). La presencia de OA de la rodilla indica niveles de HA en suero más alto, incluso en una fase temprana de OA (Golightly et al., 2011). Inouen y colaboradores, en un estudio realizado en 2011 con 616 pacientes, llegaron a la

conclusión que la gravedad radiológica de la OA de rodilla y el dolor de la misma, se correlacionan con los niveles de HA en suero, lo que sugiere que los niveles de HA suero reflejan la actividad de OA (Inoue et al., 2011).

En un estudio realizado por Thonar y colaboradores en la especie canina, se evaluó el HA de manera sistémica, en el suero de pacientes a los cuales se les realizó un modelo de OA traumático. Los resultados mostraron que los niveles séricos de HA aumentaron el plazo de 1-2 semanas después de la lesión y permanecieron elevados durante al menos 13 semanas. Estos cambios, que precedían a la aparición de lesiones de OA, son consistentes con la idea de que una lesión traumática en una sola articulación sinovial da lugar a un estado de hipermetabolismo que es local al principio, pero se vuelve sistémico con el tiempo (Thonar et al., 1995).

Otro estudio realizado por Manicourt y colaboradores, obtuvo los mismo resultados que los citados anteriormente. En este estudio se realizó una OA experimental mediante transección del ligamento cruzado anterior, y se comparó los niveles de HA en suero con un grupo control al cual se le realizó también cirugía pero manteniendo el ligamento, y por lo tanto no provocando OA. Los resultados mostraron un aumento marcado y sostenido del HA en el suero de los pacientes con OA, y se correlacionó con el nivel de HA en el líquido sinovial. Además, en los perros con OA, la tasa de síntesis de HA por la membrana sinovial fue elevada tanto en la rodilla operada con OA, como en la rodilla no operada (Manicourt et al., 1995).

En contraposición con estos resultados, Nganvongpanit y colaboradores, evaluaron en la especie canina suero de animales sanos, que compararon con suero de animales que padecían displasia de cadera y consecuente OA, ya que el 80% de los animales que padecen displasia tiene EDA asociada (Smith et al., 2001). En estos animales se realizó un Elisa del suero de cada uno de los pacientes, obteniendo niveles de HA significativamente más elevados (45%) en el suero de los pacientes sanos en comparación con los que padecían la patología (Nganvongpanit et al., 2008).

Haptoglobina

La haptoglobina (Hp) es una glicoproteína plasmática que presenta una estructura tetramérica integrada por dos subunidades α combinadas con dos subunidades β . El peso molecular de la molécula completa es de 125 kDa, aproximadamente. Presenta características electroforéticas de una α_2 globulina, y es similar fenotípicamente a la Hp

humana (Allen y Archer, 1971). Esta proteína está presente en la mayoría de los fluidos corporales, como suero, orina, saliva y ascitis (Dobryszcka, 1997).

Entre las múltiples funciones destacadas de la Hp, destaca la prevención de la pérdida de hierro. Esta propiedad se deriva de la formación de complejos estables al unirse específicamente a la hemoglobina (HB) (Makimura y Suzuki, 1982, Petersen et al., 2004, Crisman et al., 2008).

Asimismo, la Hp ejerce un efecto bacteriostático, ya que la formación de complejos Hp-HB limita la disponibilidad de hierro, compuesto esencial para el crecimiento bacteriano. También posee acciones antiinflamatorias, ya que protege contra compuestos reactivos de oxígeno e inhibe la quimiotaxis y fagocitosis (Murata et al., 2004). Esta proteína también favorece la diferenciación de las células endoteliales y la angiogénesis a nivel de los tejidos lesionados (Cid et al., 1993, Crisman et al., 2008). Además, la Hp se relaciona con funciones antioxidantes, inmunomoduladoras y antigénicas (Cho et al., 2009).

La función inmunomoduladora se produce como consecuencia de la unión de la Hp a los receptores de los leucocitos CD11b (Murata y Miyamoto, 1993, Dobryszcka, 1997), así como de la inhibición de la actividad de los neutrófilos respiratorios (Oh et al., 1990). También se han descrito propiedades inmunosupresoras por bloqueo de la respuesta neutrofílica a varios estímulos (Oh et al., 1990), inhibición de la transformación de la lectinas inducida por linfocitos (Kudo, 1982) y disminución de la producción de anticuerpos (Oh et al., 1990). La Hp también actúa sobre el metabolismo lipídico, favoreciendo la cristalización del colesterol (Kato y Nakagawa, 1999).

De forma genérica, la medición de las concentraciones de Hp en suero ha sido empleada para identificar enfermedades clínicas y subclínicas de diversos orígenes (Hulten et al., 2002, Jacobsen et al., 2005).

La Hp se considera una PFA de incremento moderado, ya que incrementa 1-10 veces los valores basales durante la RFA (Crisman et al., 2008), pero las concentraciones séricas de Hp pueden verse influidas por otros factores independientes de la RFA, como sucede en la anemia hemolítica y enfermedades hepáticas (Kent y Goodall, 1991).

Hp en OA

La Hp es una proteína que podría ser de interés en la OA para el seguimiento de la evolución de la patología. Esta proteína desempeña un papel antiinflamatorio en condiciones normales mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, por lo que su disminución en el suero

de los pacientes, podría favorecer el estado inflamatorio que existe en la OA (Jue et al., 1983, Gharbi et al., 2013).

En un estudio realizado por Gharbi y colaboradores en la especie canina, se indujo la OA experimentalmente mediante la transección quirúrgica del ligamento cruzado anterior en la rodilla de ocho perros mestizos. Los sueros de estos perros se obtuvieron antes de la inducción de la OA y 12 semanas después de la cirugía, observándose una disminución de la Hp en el suero de los animales que padecían la patología, en comparación con el grupo control, pudiendo favorecer de esta manera el estado inflamatorio de la articulación (Gharbi et al., 2013).

El precursor de la haptoglobina es una glicoproteína que se escinde en dos cadenas, alfa y beta, que se combinan con la hemoglobina plasmática libre y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis celular del hierro. En un estudio realizado por Fernández-Costa y colaboradores, se analizaron los sueros de pacientes que padecían OA. En estos sueros se detectaron cambios en las cadenas de Hp con una alta significación estadística, observándose un aumento notable de la cadena beta de HPT (detectado con un peso molecular de alrededor de 35-40 kDa) (Fernandez-Costa et al., 2012).

Material y métodos

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.

Material

Esta Tesis Doctoral se centra en la línea de investigación sobre la aplicación de factores de crecimiento y células mesenquimales derivadas de la grasa en la OA, una de las patologías con mayor incidencia, siendo tremendamente atractiva en el contexto de la investigación tanto en medicina humana como veterinaria, estableciendo una metodología de trabajo de la que pueden surgir numerosos estudios.

Todos los propietarios de los animales incluidos en el estudio firmaron un consentimiento por escrito tras haber sido notificados de la información relevante del proyecto así como del método de randomización de los grupos de estudio. Al tratarse de un estudio clínico, el protocolo fue aprobado por la directiva del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU Cardenal Herrera y las instalaciones y las condiciones de hospitalización, así como el protocolo de trabajo y manipulación de los animales fueron aceptados por el Comité de Ético y de Bienestar Animal de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, siguiendo las normas referentes a bienestar y experimentación animal (Real Decreto 1201/2005 sobre protección de

animales utilizados para experimentación y otros Fines Científicos -Boletín Oficial del Estado del 21 de Octubre- que adecúa la directiva Comunitaria 86/609/CEE).

Una vez incluidos los pacientes en el estudio, la experiencia se planteó en cuatro fases, una primera fase a tiempo cero, cuando se realizó el tratamiento a cada uno de los animales, a la vez que una primera evaluación del paciente. Y las tres fases posteriores, a uno, tres y seis meses posteriores al tratamiento, para realizar un seguimiento de los mismos.

Para este trabajo se incluyeron un total de 49 animales de diferentes edades, con EDA en cadera, codo o rodilla, divididos aleatoriamente en unos de los tres grupos de estudio, grupo CMG, grupo CMG+PRGF y grupo PRGF, con el fin de poder comparar estos grupos entre sí.

Modelo animal

La presente Tesis doctoral se realizó con animales de la especie canina (*Canis familiaris*) de diversas razas, tanto machos como hembras, que presentaran EDA en una o más articulaciones. El estudio se diseñó como un estudio aleatorio, multicéntrico, ciego, de grupos paralelos, realizado en 6 hospitales veterinarios.

Criterios de Inclusión

Se utilizaron los siguientes criterios para la selección de los pacientes. Perros clínicamente afectados por EDA en una o varias de las articulaciones del codo, cadera y rodilla, con un peso superior a 15 kg, para facilitar la obtención de volúmenes sanguíneos y del paquete graso necesarios en la extracción de las células mesenquimales.

Exceptuando la EDA, los animales no debían presentar ninguna otra patología, de manera que se les realizó a cada uno de ellos un examen clínico completo, además de analíticas sanguíneas (Tabla 2):

- Exploración física general.
- Exploración neurológica.
- Valoración de constantes vitales.
- Hemograma sanguíneo.
- Panel bioquímico básico.
- Serología para descartar parásitos hemáticos.
- Panel endocrino para evaluar la glándula tiroides.

Tabla 2: Parámetros hematológicos, bioquímicos, serológicos, y endocrinos medidos en el paciente para valorar su estado de salud

Hematología	Bioquímica	Serologías	Parámetros endocrinos
Leucocitos (mil/ μ l)	Creatinina (mg/dl)	<i>Leishmania</i>	T4 total
Eritrocitos (mill/ μ l)	Albúmina (mg/dl)	<i>Ehrlichia</i>	TSH canina
Hemoglobina (g/dl)	Calcio (mg/dl)	<i>Rickettsia</i>	
Hematocrito (%)	Amilasa (U/l)		
MCV (fl)	CK (U/l)		
MCH (pg)	Colesterol (mg/dl)		
MCHC (g/dl)	ALP (U/l)		
Plaquetas (mil/ μ l)	Fósforo (mg/dl)		
Linfocitos (%)	GGT (U/l)		
Monocitos (%)	Glucosa (mg/dl)		
Eosinófilos (%)	AST (U/l)		
Granulocitos (%)	ALT (U/l)		
	Proteínas Totales (g/dl)		
	Triglicéridos (mg/dl)		
	Urea (mg/dl)		
	Bilirrubina total (mg/dl)		

MCV: volumen corpuscular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media; CK: creatinina-quinasa; ALP: fosfatasa alcalina; GGT: gama glutamil transpeptidasa; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanino aminotransferasa;

Para caracterizar el grado de artrosis de cada animal se realizó un examen ortopédico completo con realización de radiografías bajo sedación. Las radiografías se evaluaron utilizando la escala de Bioarth para cada una de las articulaciones afectadas. Donde se evidenció la presencia de OA con esclerosis del hueso subcondral, remodelación ósea y la presencia de osteofitos o entesofitos.

No quedaron incluidos en el estudio pacientes con un deterioro importante de su estado físico o condición funcional. Al igual que animales afectados de parasitosis hemáticas, tales como *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia ssp.*, enfermedades endocrinas como hipotiroidismo, o patologías neurológicas que pudiesen afectar a la funcionalidad articular. Los animales que hubiesen sufrido alguna intervención quirúrgica o infiltración en la articulación afectada durante el último año, no se incluyeron en el estudio.

Una vez que los pacientes cumplían estos criterios, no debían recibir ningún tipo de tratamiento (medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos, analgésicos, nutracéuticos o terapias adyuvantes) durante un periodo de 2 meses antes de iniciar el estudio.

Criterios de exclusión

Si durante el estudio algunos de los animales presentó un empeoramiento drástico de su condición física y/o funcional, ya fuese como consecuencia del tratamiento, o por causas ajenas al mismo, se excluyó del estudio. Al igual que si se vio afectado por las patologías anteriormente nombradas en los criterios de inclusión, o por otras patologías que pudiesen poder en riesgo la vida del animal o la evaluación del protocolo administrado.

Equipo

A continuación se detallan todos los equipos que se han empleado a lo largo del estudio.



Centrífuga PRGF (Centrífuga BTI PRGF SYSTEM®, Vitoria, España).



Centrífuga (Centrífuga P Selecta®, JP Selecta S.A, Barcelona, España).



Analizador de hematología sanguínea (Celltac α hematology analyzer® 6318 J/K NIHON KOHDEN, Japan).



Analizador de bioquímica sanguínea (Metrolab 2300®, Random Access Clinical Analyzer, Buenos Aires, Argentina).



Cabina de flujo laminar vertical con seguridad biológica clase II (Telsar Bio II A, Telsar Life Science Solutions, Barcelona, España).



Plataforma de fuerza (Force Platform PS-2141, Pasco, California, EE.UU.).



Citómetro de flujo (FC500, Cytex, Madrid, España)



Termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)



Microscopio de campo claro (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza)



Trans-iluminador ultravioleta (BioRad, California, EE.UU.)

Material fungible



Tubo de EDTA 0,5 ml (AQUISEL[®] K3E/EDTA 3K, AQUISEL, Barcelona, España).



Tubos heparina sódica 1 ml (AQUISEL[®], LH/Li HEPARIN, AQUISEL, Barcelona, España).



Tubos eppendorf de 1,5 ml (Eppendorf[®], Alvet Plus, S.L, Valencia, España).



Tubos citrato sódico 4,5ml (PRGF. Collection tube. Sodium citrate 3,8%. BTI[®], Vitoria, España).



Tubos sin anticoagulante de 5 ml (BD. Vacutainer®, Plymouth, UK).



Tubos estériles (PRGF Fractionation tube no aditive®, BTI, Vitoria, España).



Palomilla vacutainer con camisa y alargadera (BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blood Collection Set, Ermbodegem, Bélgica).



Agujas de 20,21,23 y 25G (Sterican®, B-Braun, Melsungen, Alemania).



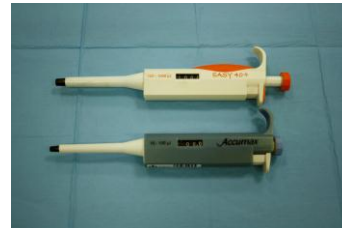
Jeringuillas de 1, 2, 5 y 10 ml (Jeringas hipodérmicas Injekt®, B-Braun, Melsungen, Alemania).



Catéter intravenoso periférico (VasoVet®20G 1,1x33mm, B-Braun, Melsungen, Alemania).



Puntas estériles con filtro (BiosphereR Filter Tips®, SARSTEDT, USA)



Micropipetas de 200 y de 1000 µL (Exacta®, Madrid, España).



Agujas espinales de 20 y de 22 G (Spinocan®, B-Braun, Melsungen, Alemania).



Kit recogida muestras para CMG (Dog-Stem®, Laboratorios Fat-Stem, Aalst, Bélgica).

kit CellTiter 96® (Promega Co., Madison, WI, EE.UU.)

RNeasy Mini-kit (Qiagen, Hilden, Alemania)

Collagen Type II Cleavage (C2C) ELISA Kit
(Mybiosource Inc®, San Diego, California, EE.UU.)

Hyaluronic Acid (HA) ELISA Kit (Teco Medical®, Sissach, Suiza)

Soluciones y fármacos



Clorhexidina en solución (Desinclor®, Clorhexidina Digluconato 5%, AGB, Madrid, España).

Clorhexidina jabonosa (Desinclor®, Clorhexidina Digluconato 4%, AGB, Madrid, España).



Alcohol etílico 96° (Alcohol 96° Cidas®, Murcia, España).

Cloruro cálcico (CaCl₂®, B-Braun, Melsungen, Alemania).



Medetomidina (Domtor®, EsteveVeterinaria, Madrid, España).

Morfina (Cloruro mórfico 2%®, B-Braun, Melsungen, Alemania).



Midazolam (Midazolam Hospira 1mg/ml®, Roche, Madrid, España).

Propofol (Propofol Lipuro® 10 mg/mL, B-Braun, Melsungen, Alemania).



Sevoflurano 100% (Sevoflo®, EsteveVeterinaria, Barcelona, España).



Meloxicam inyectable (Metacam® 20 mg/ml, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania).



Meloxicam oral (Metacam® 1,5mg/ml, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania).



Cefazolina inyectable (Cefazolina Normon EFG® Polvo para sol. iny. 1 g IV, Normon, Madrid, España).



Cefadroxilo (Cefa-cure 200mg, Laboratorios Intervet, Salamanca, España).

Solución Giemsa (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.)

Anticuerpo CD90-PE (BD Pharmingen, Nueva Jersey, EE.UU.)

Anticuerpo CD29-APC (BD Pharmingen, Nueva Jersey, EE.UU.)

Anticuerpo CD44-FITC (BD Pharmingen, Nueva Jersey, EE.UU.)

Anticuerpo CD34-PE (BD Pharmingen, Nueva Jersey, EE.UU.)

Anticuerpo CD45—FITC (BD Pharmingen, Nueva Jersey, EE.UU.)

Anticuerpo CD117-APC (BD Pharmingen, Nueva Jersey, EE.UU.)

Medio de Crecimiento Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM) (Life Technologies SA, Madrid, España)

Heparina sódica (Hospira Prod. Farma y Hosp. S.L., España)

Instalaciones

El presente estudio se realizó con animales que procedían de varias facultades y centros veterinarios de España, entre los que se encuentran el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU Cardenal Herrera (Valencia), Hospital Veterinario Global Veterinaria (Valencia), Clínica Veterinaria Sagrada Familia (Barcelona), Clínica Veterinaria Santa Coloma (Barcelona), Hospital Clínico Veterinario Santiesteban de la Universidad de Córdoba (Córdoba), Belén Cuervo Serrato

y el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Las Palmas de Gran Canaria).

Veinticuatro horas antes del procedimiento de extracción del tejido adiposo, todos los animales se estabularon en cada centro veterinario, con un ayuno sólido de doce horas y líquido de dos horas. Se les administró fluidoterapia de forma intravenosa con un tratamiento antibiótico de cobertura (Cefazolina 20mg/kg/8horas) a partir del momento que ingresaron en el centro.

La realización de todas las pruebas necesarias para el estudio se llevó a cabo en cada centro veterinario correspondiente, al igual que la aplicación de los diversos tratamientos.

Métodos

Diseño experimental

Grupos de estudio

Se trata de un estudio clínico prospectivo multicéntrico, realizado para evaluar la aplicación de PRGF, CMG y CMG combinado con PRGF en el tratamiento de la OA en el perro. El estudio se planteó en 3 grupos diferentes:

- **Grupo CMG:** Infiltración intraarticular de Células Mesenquimales de Grasa (CMG) obtenidas por método estandarizado de Dog-Stem® (Soluciones Bioregenerativas S.L).
- **Grupo CMG+PRGF:** Infiltración intraarticular de CMG obtenidas por método estandarizado de Dog-Stem® combinadas con PRGF® obtenido mediante la metodología BTI®.

- **Grupo PRGF:** Infiltración intraarticular de PRGF® obtenido mediante la metodología de BTI®.

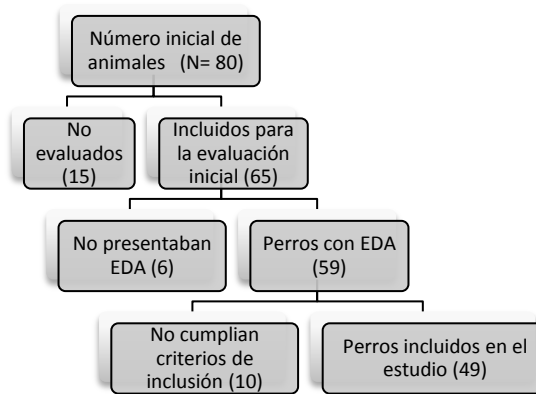
Randomización

Durante la visita de entrega de resultados e inclusión en el estudio del paciente, y una vez firmados los consentimientos por parte de los propietarios, se realizó la asignación a uno de los tres grupos de estudio. Para ello se empleó una randomización en bloque al azar por un coordinador independiente, que no era responsable de determinar la elegibilidad de los animales y que no tenía información sobre los mismos, para no influir en la secuencia de asignación. La comunicación de esta asignación se realizó siempre vía telefónica.

Del grupo inicial de 80 pacientes que presentaban cojera en alguna de las articulaciones incluidas en el estudio, 65 se escogieron para su evaluación. De este número de animales sólo 59 presentaban EDA, de los cuales 10 no fueron incluidos ya que no cumplían con los criterios de inclusión. Finalmente 49 animales quedaron incluidos en el estudio asignándose al azar a uno de los tres grupos de estudio, quedando 26 animales en el grupo de CMG, 24 en el de CMG+PRGF, y 22 en el grupo de PRGF (Figura 1).

El sumatorio del número de animales por grupo es mayor que el número total de animales incluidos en el estudio, ya que un mismo animal afectado de EDA en varias extremidades, ya fuesen anteriores o posteriores, podía ser incluido a la vez en el grupo de CMG y en el de CMG+PRGF, por lo que en los animales con lesiones bilaterales o múltiples se evaluó cada articulación de manera independiente.

Una vez comenzado el estudio 4 animales quedaron excluidos del estudio, 1 que pertenecía al grupo de CMG y CMG+PRGF, y 3 del grupo de PRGF.

Figura 1: Discriminación del número inicial de animales.

A continuación podemos ver la descripción por grupos de la edad, peso, sexo, estado reproductivo y articulación afectada de los animales incluidos al inicio del estudio distribuidos por grupos en las tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3: Datos iniciales de los animales incluidos en el grupo CMG del estudio

	♀/♂	EDAD INICIO ESTUDIO(MESES)	PESO (KG)	ESTERILIZADO	ARTICULACIÓN AFECTADA	GRUPO
1	♂	11	18,30	no	cadera	CMG
2	♂	52	22,50	no	rodilla	CMG
3	♂	125	31,30	no	cadera	CMG
4	♂	135	39,10	si	cadera	CMG
6	♂	8	35,00	no	cadera	CMG
7	♀	88	26,00	si	cadera	CMG
8	♂	69	26,60	si	rodilla	CMG
9	♂	93	18,00	si	rodilla	CMG
10	♂	24	18,30	no	cadera	CMG
11	♂	13	52,00	no	cadera	CMG
12	♀	31	24,00	si	cadera	CMG
13	♀	15	31,00	no	cadera	CMG
14	♀	22	48,00	si	cadera	CMG
15	♀	102	23,00	si	codo	CMG
16	♂	60	51,00	no	cadera	CMG
17	♂	84	23,00	no	cadera	CMG
18	♀	108	48,60	no	cadera	CMG
19	♀	60	42,60	no	cadera	CMG
20	♂	36	57,40	no	codo	CMG
21	♂	26	45,00	no	codo	CMG
22	♂	34	66,20	no	cadera	CMG
23	♂	50	56,20	no	codo	CMG
24	♀	23	29,20	no	cadera	CMG
25	♂	125	43,20	no	codo	CMG
46	♀	85	32,40	si	cadera	CMG
47	♀	16	22,00	si	cadera	CMG

♂: Macho. ♀: Hembra

Tabla 4: Datos iniciales de los animales incluidos en el grupo CMG+PRGF del estudio

	♀/♂	EDAD INICIO ESTUDIO(MESES)	PESO (KG)	ESTERILIZADO	ARTICULACIÓN AFECTADA	GRUPO
1	♂	11	18,30	no	cadera	CMG+PRGF
3	♂	125	31,30	no	cadera	CMG+PRGF
4	♂	135	39,10	si	cadera	CMG+PRGF
5	♀	76	24,00	si	rodilla	CMG+PRGF
6	♂	8	35,00	no	cadera	CMG+PRGF
7	♀	88	26,00	si	cadera	CMG+PRGF
10	♂	24	18,30	no	cadera	CMG+PRGF
11	♂	13	52,00	no	cadera	CMG+PRGF
12	♀	31	24,00	si	cadera	CMG+PRGF
13	♀	15	31,00	no	cadera	CMG+PRGF
14	♀	22	48,00	si	cadera	CMG+PRGF
15	♀	102	23,00	si	codo	CMG+PRGF
16	♂	60	51,00	no	cadera	CMG+PRGF
17	♂	84	23,00	no	cadera	CMG+PRGF
18	♀	108	48,60	no	cadera	CMG+PRGF
19	♀	60	42,60	no	cadera	CMG+PRGF
20	♂	36	57,40	no	codo	CMG+PRGF
21	♂	26	45,00	no	codo	CMG+PRGF
22	♂	34	66,20	no	cadera	CMG+PRGF
23	♂	50	56,20	no	codo	CMG+PRGF
24	♀	23	29,20	no	cadera	CMG+PRGF
25	♂	125	43,20	no	codo	CMG+PRGF
46	♀	85	32,40	si	cadera	CMG+PRGF
47	♀	16	22,00	si	cadera	CMG+PRGF

♂: Macho. ♀: Hembra

Tabla 5: Datos iniciales de los animales incluidos en el grupo PRGF del estudio

	♀/♂	EDAD INICIO ESTUDIO(MESES)	PESO (KG)	ESTERILIZADO	ARTICULACIÓN AFECTADA	GRUPO
26	♂	132	35,80	no	cadera	PRGF
27	♂	60	33,30	si	cadera	PRGF
28	♂	36	24,50	no	cadera	PRGF
29	♂	60	37,00	si	cadera	PRGF
30	♀	96	32,50	si	cadera	PRGF
31	♀	71	32,15	si	cadera	PRGF
32	♂	87	36,50	si	cadera	PRGF
33	♂	94	30,10	no	cadera; rodilla	PRGF
34	♂	120	31,50	si	cadera	PRGF
35	♂	72	43,80	si	cadera; rodilla	PRGF
36	♂	120	55,00	no	cadera; rodilla	PRGF
37	♂	43	29,30	no	codo; rodilla	PRGF
38	♂	108	36,50	si	cadera	PRGF
39	♀	106	44,20	si	cadera	PRGF
40	♂	56	31,40	si	cadera	PRGF
41	♂	13	37,80	no	cadera	PRGF
42	♂	139	20,05	no	cadera	PRGF
43	♀	99	62,75	si	cadera; rodilla	PRGF
44	♀	120	33,00	no	cadera	PRGF
45	♂	120	28,50	no	cadera	PRGF
48	♂	15	36,00	si	cadera	PRGF
49	♂	108	32,30	no	cadera	PRGF

♂: Macho. ♀: Hembra

Del grupo inicial de pacientes, una vez eliminados aquellos que se dieron de baja durante el estudio, la media de edad fue de $70,40 \pm 41,90$ (rango=8-139), y la media del peso $35,40 \pm 12,38$ (rango=18-66,20). Se incluyeron un total de 32 machos (23 enteros y 9 esterilizados) y 13 hembras (3 enteras y 10 esterilizadas). La distribución definitiva por grupos podemos verla en la tabla 6.

Tabla 6: Distribución por grupos de las variables sexo, edad, peso y estado reproductivo

GRUPO	Edad	Peso	♂ Enteros	♂ Esterilizados	♀ Enteras	♀ Esterilizadas
CMG	$57,40 \pm 40,79$ (rango=8-135)	$35,49 \pm 14,15$ (rango=18-66,20)	14	3	2	6
CMG+PRGF	$56,39 \pm 40,00$ (rango=8-135)	$36,70 \pm 14,05$ (rango=18,30-66,20)	13	1	2	7
PRGF	$87,81 \pm 36,22$ (rango=13-139)	$37,80 \pm 11,28$ (rango=20,05-62,75)	9	6	1	3

Controles y evaluaciones

Previo al inicio del tratamiento y sus evaluaciones, se realizaron unas visitas en cada paciente.

- **1ª Visita:** Cumplimiento a priori de los criterios de inclusión en el estudio y solicitud de las pruebas previas. Suspensión de cualquier tratamiento incompatible con la inclusión del paciente en el estudio.
- **2ª Visita:** Valoración de pruebas e inclusión definitiva en el estudio. En este momento, los propietarios firmaron el consentimiento informado de la inclusión de su paciente en el estudio. Se asignó a cada paciente a un grupo de estudio siguiendo los criterios de randomización descritos anteriormente y, en los animales que pertenecían al grupo CMG y CMG+PRGF, se realizó el procedimiento de extracción del tejido adiposo.

Una vez se valoró que el animal pudiese entrar a formar parte del estudio, y con las muestras de CMG preparadas para la infiltración de las mismas, se procedió al inicio del tratamiento con las consiguientes valoraciones del mismo, llevándose a cabo un total de 4 evaluaciones.

- **1ª Evaluación:** Esta valoración fue a tiempo basal, antes de la aplicación del tratamiento. En esta primera fase, una vez evaluado el animal, se realizó la infiltración intraarticular del tratamiento dependiendo de cada grupo.
- **2ª Evaluación:** Se llevó a cabo 1 mes posterior tratamiento, evaluándose las mismas constantes que a tiempo basal.
- **3ª Evaluación:** Valoración realizada a los 3 meses del tratamiento, valorando los mismos parámetro que en la primera revisión.
- **4ª Evaluación:** Esta valoración se realizó 6 meses después de la aplicación del tratamiento, llevándose a cabo el mismo seguimiento que en las anteriores revisiones.

Tratamientos aplicados

Células madre

Preparación del paciente para la obtención de las CMG

Veinticuatro horas antes del procedimiento de obtención del tejido adiposo en los animales del grupo CMG y CMG+PRGF (2ª visita), se procedió al ingreso de los mismos en cada centro veterinario correspondiente, con un periodo de ayuno sólido de 12 horas y líquido de 2 horas.

El día de la intervención, se realizó una sedación a cada uno de los animales, previamente pesados, ajustando el protocolo a su estado de salud y edad, intentando asegurar siempre la mejor estabilidad cardiovascular durante el proceso, mediante punción intramuscular de medetomidina, morfina y midazolam a las dosis de 0,01 mg/kg, 0,2 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente.

A continuación se realizó un rasurado con limpieza y desinfección aséptica del antebrazo, de la zona yugular, y de la zona inguinal de cada animal, para la colocación de un catéter cefálico, extracción de sangre para preparar el suero para el cultivo celular y obtención del tejido adiposo de la zona inguinal, respectivamente. Una vez preparado el animal de forma aséptica, se trasladó al quirófano, y se procedió a la inducción a la anestesia del mismo mediante propofol intravenoso a dosis efecto hasta permitir la intubación endotraqueal una vez perdidos los reflejos deglutor y palpebral.

El mantenimiento anestésico se realizó con sevoflurano vaporizado en oxígeno al 100% a través de una máquina anestésica con un circuito circular semicerrado y tubos corrugados adaptados al tamaño de cada paciente.

Obtención de las CMG

Para la realización de este trabajo se siguió la metodología descrita por el kit de recogida de muestras biológicas Dog Stem® (Fat Stem Laboratorios, Buggenhout, Bélgica), que consta de (Figura 2):

- 1 Caja térmica de transporte de polietileno expandido.
- 15 Tubos de vacío con anticoagulante (muestra sangre).
- 1 Bolsa protectora de material biológico.
- 1 Tubo contenedor con medio para mantenimiento celular.

- Formularios identificación animal y consentimiento informado del propietario.
- Instrucciones de uso y protocolo.
- 2 Toallitas desinfectantes.
- 2 Secantes anti humedad.
- 2 Bolsas gel termorregulador.

Figura 2: Kit de recogida de muestras Dog Stem®



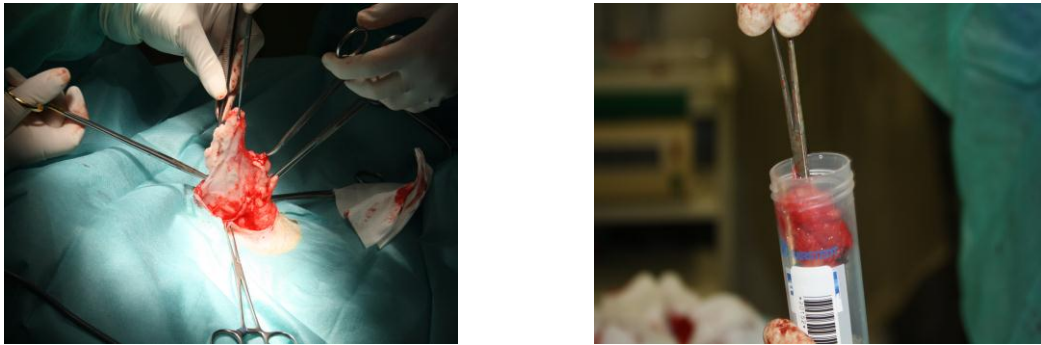
Una vez anestesiado el animal, se procedió a la recolección aséptica de un volumen de sangre de entre 80 y 120 mililitros, que se depositó en tubos estériles de 8 ml con gel anticoagulante, para la posterior obtención de suero autólogo para el cultivo celular (Figura 3).

Figura 3: Extracción de sangre intraquirúrgica para el cultivo celular



A continuación se realizó una biopsia del tejido adiposo subcutáneo de la zona inguinal mediante una incisión de unos cinco centímetros para la obtención de una cantidad aproximada de unos veinte gramos, los cuales se introdujeron dentro del tubo contenedor que incluyó un medio para el mantenimiento celular (Figura 4).

Figura 4: Biopsia tejido adiposo inguinal (a); Colocación de muestra en tubo contenedor (b)



Estas muestras correctamente identificadas, y tras la autorización firmada por el propietario, fueron enviadas para su procesamiento y cultivo en los laboratorios Fat-stem de Bélgica (Figura 5).

Figura 5: Muestras identificadas para cultivo celular



Una vez recibidas las muestras en los Laboratorios Fat Stem, se procesaron para el aislamiento y cultivo de las células madre adultas. Este proceso tuvo una duración de 15 días.

Para el aislamiento de la población de células madre adultas, el tejido adiposo se manipuló de acuerdo con la normativa del propio laboratorio, homologado para la técnica de separación y expansión celular de las CMG. El tejido adiposo se procesó enzimáticamente (colagenasa), con lavado y centrifugado varias veces hasta la obtención de un concentrado de células. Posteriormente, estas células se cultivaron en un biorreactor con entorno controlado de temperatura, oxígeno y control de CO₂, según los procedimientos de Laboratorio. La población celular obtenida contenía una mezcla de varios tipos de células incluyendo células madre mesenquimales adultas y sus derivados. Las células preparadas para su aplicación pasaron un control de calidad basado en marcadores celulares (CD73, CD90 y CD105), prueba de esterilidad y cuentas de viabilidad.

El método Dog-Stem® empleado, garantiza la obtención estéril de 2 ml de solución líquida y autóloga, incorporando un mínimo de 30.000.000 de células troncales viables, certificadas por el laboratorio (Figura 6).

Figura 6: Certificado calidad de las CMG



Caracterización de las CMG

Adicionalmente a la certificación recibida por parte del laboratorio Fat Stem de Bélgica, el cual nos aseguraba un mínimo de 30 millones de células troncales viables por cada animal, y con el objetivo de valorar la calidad de las células recibidas, realizamos una caracterización de la población celular en el laboratorio de Regeneración Neuronal y Tisular del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia. Se analizaron un total de 5 muestras seleccionadas de forma aleatoria. A parte de esta caracterización y puesto que las células madre obtenidas iban a ser aplicadas junto con factores de crecimiento se decidió realizar también un estudio de la viabilidad de los cultivos empleando el PRGF como aditivo del cultivo. Para todo ello se realizaron los siguientes análisis:

Estudio fenotípico de las poblaciones celulares obtenidas por Fat Stem

El mismo día de la recepción de la suspensión celular, 10^5 células/ml se destinaron al análisis poblacional por marcaje con marcadores celulares de superficie por citometría de flujo y 10^6 células/ml se mantuvieron en cultivo para su posterior análisis en los sucesivos pasajes (P1, 3, y 5).

En todos los casos, el día de la recepción o tras amplificación y mantenimiento en cultivo de la suspensión celular, 10^5 células/ml se centrifugaron a 1200 rpm/5 min para eliminar el medio de suspensión, y se lavaron dos veces con solución de fosfatos tamponada (PBS). Se incubó la suspensión celular con una batería de anticuerpos conjugados con diferentes fluoróforos a una dilución 1:50 en PBS (CD90-PE; CD29-APC; CD44-FITC; CD34-PE; CD45—FITC; CD117-APC). La

incubación se realizó en oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS. La suspensión celular, en 300 μ l de PBS, se analizó en el citómetro de flujo.

Mantenimiento y expansión de la suspensión celular en cultivo

Una cantidad de 10^6 células/ml de la suspensión celular, tras varios lavados con PBS, se puso en cultivo, en presencia de un medio de crecimiento [DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y estreptomicina 100 mg/ml (P/S)] a 37°C, 20% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. El sembrado el día de la recepción de la muestra se consideró pase 0 y el cultivo se desdobló al alcanzar la confluencia hasta el pase 8.

Estudio del desdoblamiento de la población

Las curvas de proliferación y posterior cálculo del desdoblamiento de población ($PD=T/\log_2N$; donde T es el tiempo de cultivo entre pases (3 días); donde N es el número de células resultante del conteo tras los 3 días de cultivo), se ensayaron en medio de crecimiento (en presencia de 10 % de FBS). Un total de 5×10^5 CMG se sembraron en placas Petri de 100 cm² y cada tercer día se realizó un recuento de células en una cámara de Neubauer®. Este proceso se llevó a cabo hasta el pase 5.

Estudios de viabilidad/proliferación celular en respuesta a PRGF

Los estudios de viabilidad/proliferación celular se realizaron empleando las CMG expandidas en cultivo entre los pases 3 a 5. Las células adheridas a la superficie de las placas de cultivo se tripsinizaron empleando una solución al 0.025% de tripsina-EDTA (Gibco), por incubación durante 3 minutos a 37°C. La actividad de la tripsina se neutralizó con medio completo (conteniendo 10% de SBF). La suspensión celular, tras eliminar la tripsina por sucesivos lavados con medio completo, se distribuyó en placas de 96 pocillos, 10.000 células/pocillo, en medio completo. El conteo de células vivas para su distribución en la placa de cultivo se realizó en una cámara de Neubauer®, en presencia de azul tripán, colorante vital para discriminar aquellas células muertas. Las células se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo (5% CO₂, 37°C) durante 24h. Al día siguiente del sembrado celular se cambió el medio de cultivo completo por medio sin SBF (DMEM, P/S, L-Glutamina) y se estimularon las células con 0%, 1% o 5% de PRGF, previamente congelado y procedente de un pool de sangre canina recogida sobre tubos con citrato sódico como anticoagulante. El PRGF, se preparó siguiendo la metodología descrita por BTI® de Anitua y colaboradores (Anitua et al., 2012a). Para evitar la

coagulación del PRGF por incubación a 37°C, añadimos en todos los casos 40 U/ml de heparina sódica. Además como control positivo se incluyeron células tratadas con medio de crecimiento completo con 10% de SBF. Se incubó de nuevo las células durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo (5% CO₂, 37°C). Para el estudio de la viabilidad celular, se empleó el kit CellTiter 96® siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada condición se ensayó por cuadruplicado en tres experimentos diferentes. La viabilidad de las células en cada condición ensayada se expresó como la relación de porcentaje de la media ± la desviación estándar (SD) de señal colorimétrica de las células tratadas en presencia o no del PRGF.

Aislamiento del ARN y PCR-RT semicuantitativa

El ARN se extrajo utilizando el RNeasy Mini-kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un µg del ARN total se transcribió de forma reversa en un volumen de reacción de 50 µL a 42°C durante 30 minutos, utilizando cebadores hexámeros aleatorios. Para la amplificación semicuantitativa de PCR se emplearon 40 ng de ARN retrotranscrito, y en presencia de TaqPolimerasa (0.25 U; Promega) se realizó la reacción de amplificación en un termociclador utilizando el siguiente programa:

3 minutos de desnaturalización a 95°C seguido de 30 ciclos de:

- 30 segundos a 95°C.
- 15 segundos a 60 ° C.
- 60 segundos a 72 ° C.

Y una fase de extensión final a 72° C durante 4 minutos.

Para los estudios de transcripción génica se emplearon las siguientes secuencias de primers:

- Sox2 - Fw_5 ' AGTCTCCAAGCGACGAAA AA.
- Sox2 - Rv_5 ' : GCAAGAAGCCTCTCC TTGAA.
- Nanog - Fw_5 ' : GAATAACCCGAATTGGAGCAG.
- Nanog - Rv_5 ' : AGC GAT TCC TCT TCA CAG TTG.
- Oct4 - Fw_5 ' : GAGTGAGAGGCAACCTGGAG.
- Oct4 - Rv_5 : GTGAAGTGAGGG CTCCCATA.
- GAPDH - Fw_5 ' : CCATCTCCAGGAGCGAGAT.
- GAPDH - Rv_5 ' : TTCTCCATGGTG GTGAAGAC.

El valor del gen diana se normalizó respecto a la expresión del gen de referencia, por ser de expresión constitutiva, GAPDH. Como control negativo incluimos para todos los pares de primers ensayados la misma reacción pero conteniendo ARN no retrotranscrito. Después de la amplificación, 25 µL de cada mezcla de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% (w/v) con bromuro de etidio (0,1mg/ml), y las bandas resultantes de la amplificación se visualizaron bajo un trans-iluminador ultravioleta. Las bandas específicas se analizaron mediante densitometría, determinándose la relación con la expresión de GAPDH (todas las amplificaciones de PCR se realizaron a partir de 5 muestras diferentes).

Tinción de Giemsa

Las CMG fueron fijadas con metanol frío durante 10 min y se tiñeron con solución Giemsa durante 30 min. El exceso de colorante se eliminó mediante lavados posteriores con agua destilada. Las células se dejaron secar al aire y después se visualizaron bajo el microscopio de campo claro.

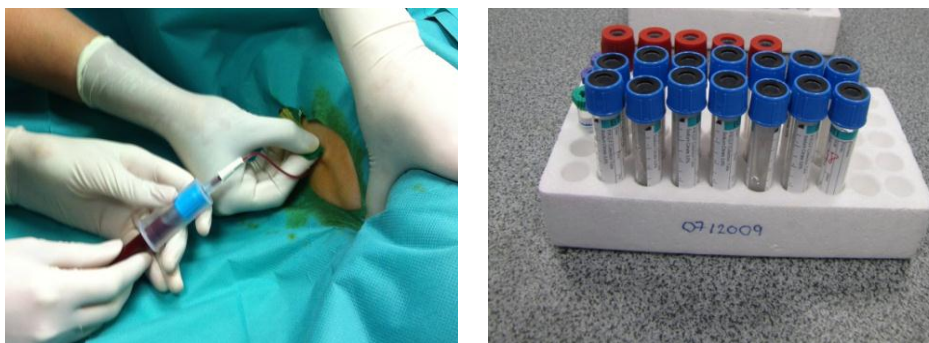
PRGF

OBTENCIÓN DEL PRGF

La metodología empleada para la obtención y preparación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento ha sido el método publicado por Anitua y colaboradores para su uso en medicina humana, empleando el material de PRGF®-Endoret®, que se describe a continuación (Anitua et al., 2012a):

- **Extracción:** de cada uno de los perros se extrajo a través de un sistema vacutainer de la vena yugular (Figura 7a), la cantidad de sangre necesaria para la obtención del PRGF necesario en cada grupo. Estas muestras se depositaron en tubos de citrato sódico de cristal de 4,5 ml (Figura 7b).

Figura 7: Extracción sanguínea para la preparación de PRGF (a); Colocación en tubos de citrato sódico (b)



- **Centrifugación:** se llevó a cabo una única centrifugación de las muestras sanguíneas a 460g durante 8 minutos (Figura 8a), ya que se emplearon tubos de 4,5 ml, obteniendo 2 fracciones diferentes (Anitua et al., 2007b) (Figura 8b):
 - **1ª fracción.** Plasma Pobre en Factores de Crecimiento (PPGF): los 60 μ L superiores por cada 100 μ L de plasma.
 - **2ª fracción.** Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF): los 40 μ L inferiores por cada 100 μ L de plasma, sin incluir el “buffy-coat.”

Figura 8: Centrifugación muestras sanguíneas (a); Aspecto del plasma postcentrifugado (b)



- **Pipeteado:** el procedimiento de extracción de las fracciones plasmáticas se realizó bajo las máximas condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar y siempre por el mismo individuo (Figura 9). Se obtuvieron 2 tubos estériles de cada tubo recolectado, en el primero se introdujo la primera fracción, correspondiente al PPGF, y en el segundo el PRGF. Se recomienda no tocar nunca la “buffy-coat” (fracción blanca), para ello, se empleó la micropipeta de 1000 μ L para la primera fracción y la de 200 μ L para la segunda, con puntas estériles con filtro.

Figura 9: Extracción de PRGF en cabina de flujo laminar

- **Activación:** Una vez obtenido el PRGF (fracción más rica en densidad plaquetaria) e inmediatamente antes de la inoculación, se activó con el 5% del volumen de Cloruro Cálcico (Figura 10) con el fin de lograr la degranulación de las plaquetas que permite la liberación de los Factores de Crecimiento (Anitua et al., 2004, Sanchez et al., 2003).

Figura 10: Material necesario para la activación del PRGF

Aplicación del tratamiento

Preparación del paciente para obtención del PRGF, y para la infiltración intraarticular de cada tratamiento.

El día de la infiltración, se realizó una sedación a cada uno de los animales, siguiendo el mismo protocolo que para la obtención del tejido adiposo (punción intramuscular de medetomidina, morfina y midazolam a las dosis de 0,01 mg/kg, 0,2 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente).

A continuación se realizó un rasurado con limpieza y desinfección aséptica de la zona yugular en los animales que se quería obtener PRGF (grupo CMG+PRGF y grupo PRGF), así como de la zona o zonas a infiltrar intraarticularmente en todos los animales del estudio.

Infiltración articular

Todas las infiltraciones se llevaron a cabo por el traumatólogo especialista de cada centro.

Una vez sedado el animal, y preparada de forma aséptica la articulación a infiltrar, se realizó la infiltración articular mediante artrocentesis convencional de cada una de las articulaciones afectadas (codo, cadera y/o rodilla), según el tratamiento que correspondía en cada grupo (Figura 11):

- **Grupo CMG:** Infiltración intraarticular de 2ml que contienen 15 millones de CMG.
- **Grupo CMG+PRGF:** Infiltración intraarticular de 1ml con 15 millones de CMG + 1ml de PRGF.
- **Grupo PRGF:** Infiltración intraarticular de 2ml de PRGF.

Figura 11: Infiltración intraarticular a nivel de la rodilla en uno de los pacientes



Variables a evaluar

Escala Bioarth®

La escala Bioarth es una escala mediante la cual se valoró el grado de OA presente en las articulaciones del codo, cadera y rodilla. Esta escala consta de dos apartados, una primera parte que evaluó las diferentes evidencias radiológicas de OA que puedan observarse en estas articulaciones, mediante un sistema ordenado y sistematizado de puntuación. Y otro apartado que evaluó la funcionalidad articular.

Escala radiológica:

Esta escala, es una herramienta práctica para valorar las diferentes evidencias radiológicas de osteoartrosis. A nivel clínico es importante poder cuantificar el grado de osteoartrosis de una articulación para establecer el tratamiento más adecuado según la fase de la enfermedad

en la que se encuentre y para poder anticipar un pronóstico al propietario. Al tratarse de una patología crónica y degenerativa, mediante esta escala se determinó la evolución radiológica de la patología.

El sistema de puntuación de esta escala se basa en la progresión de los signos radiológicos de la osteoartrosis, valorándose los siguientes parámetros:

1. **Esclerosis subcondral:** Se manifiesta como un aumento de la densidad ósea del hueso subyacente al cartílago articular y es consecuencia de una respuesta reactiva del hueso.
2. **Osteofitos:** Es quizás la característica más específica de la artrosis, consiste en una neoformación de hueso en forma de concreciones en los márgenes articulares. Cuando este tejido óseo se localiza en el origen o inserción de ligamentos o tendones se denomina entesiofita.
3. **Pérdida del espacio articular:** Consecuencia de la disminución del grosor del cartílago (no siempre apreciable radiológicamente a menos que se realicen en posición de carga).
4. **Quistes subcondrales:** Suelen aparecer en osteoartrosis muy evolucionadas. También se denominan Geodas, son generalmente múltiples, de forma piriforme y de tamaño variable que oscila entre 2 y 20 mm de diámetro.

Para el estudio radiológico del grado de osteoartrosis en la articulación de la cadera utilizamos la proyección que se utiliza de manera clásica para el diagnóstico de displasia de cadera, es decir, una única proyección estándar ventro-dorsal de la pelvis con ligera rotación interna de las extremidades posteriores.

En la articulación de codo se evaluaron dos vistas, primero una proyección medio lateral en flexión forzada en 45°, y a continuación una vista cráneo-caudal estándar de la articulación. Estas proyecciones permitieron valorar mejor el grado de esclerosis del cúbito proximal así como el tamaño de las diferentes exóstosis.

Para el estudio radiológico de la rodilla las proyecciones realizadas fueron la lateral y la cráneo-caudal estándar, prestando atención en la vista lateral para obtener la superposición de los dos cóndilos femorales.

Cada articulación se examinó por separado, y en cada una de ellas se valoró las diferentes áreas anatómicas delimitadas en el gráfico de la escala bioarth (cada una con un color diferente y un número asignado), tras examinar la radiografía y valorar la progresión de las

lesiones siempre por el mismo especialista y sin conocer ni el tiempo ni el paciente al que pertenecían, se puntuaron según la escala siguiente:

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

Para determinar el grado de osteoartrosis final, en función de los signos observados, se sumó la puntuación asignada a cada una de las diferentes áreas anatómicas señaladas, obteniendo una puntuación final la cual nos indicó si no había suficientes evidencias radiológicas de osteoartrosis o si por el contrario la osteoartrosis era de grado leve, moderado o severo.

Escala funcional

Debido a que la valoración radiológica de la OA no siempre tiene relación directa con la gravedad de los síntomas clínicos, para una evaluación más completa del estado de la articulación, la escala Bioarth incluye un apartado de evaluación de la limitación funcional, movilidad articular y atrofia muscular de la articulación afectada.

En esta escala se establece un sistema de puntuación (de 0 a 3 ó de 0 a 2 según los casos) para cada uno de los 12 parámetros a examinar. Tras esta evaluación, podremos conocer el estado de los 3 parámetros funcionales básicos (limitación funcional, movilidad articular y atrofia muscular).

Limitación Funcional

En este primer bloque se valora la limitación funcional de la articulación afectada mediante unas preguntas que se realizan a propietario mediante las cuales valoramos la carga de peso o apoyo de la extremidad afectada, cambios de postura o posturas antiálgicas al levantarse, signos de cojera en frío y al caminar, resistencia al caminar y jugar, resistencia al subir las escaleras y limitaciones a la hora de realiza pequeños saltos (escala de medición: 0 a 23 puntos).

Movilidad articular

En este segundo apartado se pretende valorar las limitaciones del movimiento de la articulación afectada en base a la determinación del grado de movilización pasiva de la extremidad junto con el rango de movilidad de la articulación (escala de medición: 0 a 7 puntos).

El goniómetro es el instrumento básico para realizar el examen del rango de movimiento de las articulaciones. Se debe hacer coincidir el centro del goniómetro con el centro de la articulación que se desee valorar, y el centro de los brazos del goniómetro con la línea media de la diáfisis de los huesos subyacentes a la articulación. El valor se nos da en grados, se entiende por 0° cuando los dos brazos coinciden entre sí y 180° en el momento de máxima separación. En goniometría siempre buscamos valores máximos de flexión y extensión dentro del arco libre de dolor, los extremos pueden conllevar cierta molestia (a veces por tensión de los tejidos blandos: músculos, tendones, ligamentos y cápsula articular) pero nunca un dolor agudo. La exploración goniométrica se realizó siempre por el mismo investigador, ajeno al tratamiento aplicado a cada paciente.

Atrofia muscular

Para poder realizar una buena valoración de la evolución de la atrofia muscular es necesario usar una cinta métrica. Para medir el perímetro muscular de un miembro, debemos situar al perro en estación, con apoyo del miembro si es posible o en su defecto en completa extensión. Para llevar a cabo la valoración siempre desde el mismo punto, debemos tomar como referencia una prominencia ósea: polo superior de la rótula o trocánter mayor para miembros pelvianos, el olécranon si hacemos miembros torácicos. Tomaremos la medida exacta desde la prominencia ósea hasta el punto de medición, aproximadamente entre el tercio superior y el tercio medio de la diáfisis humeral o femoral. Debemos anotar esta medida y realizar las futuras mediciones en el mismo punto exacto. En cada evaluación se anotó el diámetro en centímetros del perímetro muscular y posteriormente y siguiendo los valores de la escala bioarth, se categorizó en 3 valores (0: sin atrofia, 1: atrofia leve, 2: atrofia severa).

Finalmente se realizó un sumatorio de todos los valores obtenidos en estos 3 parámetros funcionales (limitación funcional, movilidad articular y atrofia muscular), de manera que según el resultado obtenido, se categorizó el grado general de artrosis de cada una de las articulaciones siguiendo los valores que aparecen a continuación:

- **0 a 2:** Sin signos de artrosis
- **3 a 9:** Artrosis leve
- **10 a 18:** Artrosis moderada
- **> 18:** Artrosis severa

En las figuras 12, 13 y 14 podemos ver un ejemplo de la escala funcional del codo, rodilla y cadera, respectivamente.

Figura 12: Escala Bioarth. Escala funcional del Codo

ESCALA FUNCIONAL DEL CODO

LIMITACIÓN FUNCIONAL

1. **CAMBIOS EN LOS APOYOS EN LA ESTACIÓN (extremidad anterior):** _____
 0= El perro apoya normal en la estación / 1= Desplaza la carga a un lado / 2= Apoya sólo los dedos /
 3= No apoya
2. **CAMBIO DE POSTURA AL LEVANTARSE:** _____
 0= El perro se levanta correctamente / 1= Modifica la posición al levantarse /
 2= Presenta muchas dificultades al levantarse / 3= No se levanta
3. **COJERA EN FRÍO:** _____
 0= No cojea al iniciar el andar / 1= Cojea inicialmente pero desaparece al moverse (durante los primeros 10 minutos) /
 2= La cojera no desaparece
4. **GRADO DE COJERA DURANTE LA MARCHA (tras más de 10 minutos de marcha):** _____
 0= No cojea / 1= Cojera leve / 2= Cojera intensa / 3= No apoya la extremidad afectada
5. **RESISTENCIA A ANDAR DURANTE EL PASEO:** _____
 0= Puede caminar largas distancias sin problemas / 1= Durante el paseo se detiene a menudo /
 2= Puede dar sólo paseos muy breves (menos de 10 minutos) / 3= No quiere ir de paseo
6. **RESISTENCIA A LA CARRERA Y AL JUEGO:** _____
 0= Puede correr y jugar sin dificultad / 1= Corre y juega con ligeras dificultades /
 2= Corre y juega con mucha dificultad y se cansa rápidamente / 3= No corre ni juega bajo ningún estímulo
7. **BAJAR ESCALERAS:** _____
 0= Baja largos tramos de escaleras sin problemas /
 1= Baja bien tramos cortos pero muestra dificultad en tramos de 16 escalones o más /
 2= Baja con dificultad tramos de 1 a 3 escalones o incluso bordillos / 3= Se resiste a bajar cualquier escalón
8. **LIMITACIONES EN PEQUEÑOS SALTOS (40-50 cm):** _____
 0= Baja sin problemas del sofá o del coche / 1= Baja con dificultad del sofá o del coche /
 2= No baja del sofá o del coche

subtotal de puntuación de limitación funcional
(suma de las valoraciones 1 a 8)

MOVILIDAD ARTICULAR

9. **LA MOVILIZACIÓN ARTICULAR MANUAL PASIVA EN EL CODO ES:** _____
 0= Libre de dolor y crepitación / 1= Se produce dolor leve en los últimos grados de flexión y extensión /
 2= Se produce dolor y/o crepitación durante el recorrido /
 3= No se puede realizar debido al elevado dolor y/o crepitación
10. **ROM (Range of movement) EN FLEXIÓN, EL GRADO DE FLEXIÓN DEL CODO ES:** _____
 0= Flexión total 20-40° / 1= Ligera limitación <60° / 2= Limitación severa >60°
11. **ROM EN EXTENSIÓN, EL GRADO DE EXTENSIÓN DEL CODO ES:** _____
 0= Extensión total 160-170° / 1= Ligera limitación >150° / 2= Limitación severa <150°

subtotal de puntuación de movilidad articular
(suma de las valoraciones 9, 10 y 11)

12. ATROFIA MUSCULAR

- 0= No hay signos de atrofia muscular / 1= Atrofia leve / 2= Atrofia severa

Figura 13: Escala Bioarth. Escala funcional de la Rodilla

ESCALA FUNCIONAL DEL RODILLA

LIMITACIÓN FUNCIONAL

1. **CAMBIOS EN LOS APOYOS EN LA ESTACIÓN (extremidad posterior):** _____
 0= El perro apoya normal en la estación / 1= Desplaza la carga a un lado / 2= Apoya sólo los dedos /
 3= No apoya
2. **CAMBIO DE POSTURA AL LEVANTARSE:** _____
 0= El perro se levanta correctamente / 1= Modifica la posición al levantarse /
 2= Presenta muchas dificultades al levantarse / 3= No se levanta
3. **COJERA EN FRÍO:** _____
 0= No cojea al iniciar el andar / 1= Cojea inicialmente pero desaparece al moverse (durante los primeros 10 minutos) /
 2= La cojera no desaparece
4. **GRADO DE COJERA DURANTE LA MARCHA (tras más de 10 minutos de marcha):** _____
 0= No cojea / 1= Cojera leve / 2= Cojera intensa / 3= No apoya la extremidad afectada
5. **RESISTENCIA A ANDAR DURANTE EL PASEO:** _____
 0= Puede caminar largas distancias sin problemas / 1= Durante el paseo se detiene a menudo /
 2= Puede dar sólo paseos muy breves (menos de 10 minutos) / 3= No quiere ir de paseo
6. **RESISTENCIA A LA CARRERA Y AL JUEGO:** _____
 0= Puede correr y jugar sin dificultad / 1= Corre y juega con ligeras dificultades /
 2= Corre y juega con mucha dificultad y se cansa rápidamente / 3= No corre ni juega bajo ningún estímulo
7. **SUBIR ESCALERAS:** _____
 0= Sube largos tramos de escaleras sin problemas /
 1= Sube bien tramos cortos pero muestra dificultad en tramos de 16 escalones o más /
 2= Sube con dificultad tramos de 1 a 3 escalones o incluso bordillos / 3= Se resiste a subir cualquier escalón
8. **LIMITACIONES EN PEQUEÑOS SALTOS (40-50 cm):** _____
 0= Sube sin problemas al sofá o al coche / 1= Sube con dificultad al sofá o al coche /
 2= No sube al sofá o al coche

_____ **subtotal de puntuación de limitación funcional**
 (suma de las valoraciones 1 a 8)

MOVILIDAD ARTICULAR

9. **LA MOVILIZACIÓN ARTICULAR MANUAL PASIVA EN LA RODILLA ES:** _____
 0= Libre de dolor y crepitación / 1= Se produce dolor leve en los últimos grados de flexión y extensión /
 2= Se produce dolor y/o crepitación durante el recorrido /
 3= No se puede realizar debido al elevado dolor y/o crepitación
10. **ROM (Range of movement) EN FLEXIÓN, EL GRADO DE FLEXIÓN DE LA RODILLA ES:** _____
 0= Flexión total 40-50° / 1= Ligera limitación <70° / 2= Limitación severa >70°
11. **ROM EN EXTENSIÓN, EL GRADO DE EXTENSIÓN DE LA RODILLA ES:** _____
 0= Extensión total 160-170° / 1= Ligera limitación >150° / 2= Limitación severa <150°

_____ **subtotal de puntuación de movilidad articular**
 (suma de las valoraciones 9, 10 y 11)

12. ATROFIA MUSCULAR

- _____
 0= No hay signos de atrofia muscular / 1= Atrofia leve / 2= Atrofia severa

Figura 14: Escala Bioarth. Escala funcional de la Cadera

ESCALA FUNCIONAL DE LA CADERA

LIMITACIÓN FUNCIONAL

1. CAMBIOS EN LOS APOYOS EN LA ESTACIÓN (extremidad posterior): _____
 0= El perro apoya normal en la estación / 1= Desplaza la carga a un lado / 2= Apoya sólo los dedos /
 3= No apoya

2. CAMBIO DE POSTURA AL LEVANTARSE: _____
 0= El perro se levanta correctamente / 1= Modifica la posición al levantarse /
 2= Presenta muchas dificultades al levantarse / 3= No se levanta

3. COJERA EN FRÍO: _____
 0= No cojea al iniciar el andar / 1= Cojea inicialmente pero desaparece durante los primeros 10 minutos de marcha/
 2= Cojea inicialmente pero desaparece tras 10-20 minutos de marcha / 3= La cojera no desaparece

4. GRADO DE COJERA DURANTE LA MARCHA (tras más de 10 minutos de marcha): _____
 0= No cojea / 1= Cojera leve / 2= Cojera intensa / 3= No apoya la extremidad afectada

5. RESISTENCIA A ANDAR DURANTE EL PASEO: _____
 0= Puede caminar largas distancias sin problemas / 1= Durante el paseo se detiene a menudo /
 2= Puede dar sólo paseos muy breves (menos de 10 minutos) / 3= No quiere ir de paseo

6. RESISTENCIA A LA CARRERA Y AL JUEGO: _____
 0= Puede correr y jugar sin dificultad / 1= Corre y juega con ligeras dificultades /
 2= Corre y juega con mucha dificultad y se cansa rápidamente / 3= No corre ni juega bajo ningún estímulo

7. SUBIR ESCALERAS: _____
 0= Sube largos tramos de escaleras sin problemas /
 1= Sube bien tramos cortos pero muestra dificultad en tramos de 16 escalones o más /
 2= Sube con dificultad tramos de 1 a 3 escalones o incluso bordillos / 3= Se resiste a subir cualquier escalón

8. LIMITACIONES EN PEQUEÑOS SALTOS (40-50 cm): _____
 0= Sube sin problemas al sofá o al coche / 1= Sube con dificultad al sofá o al coche /
 2= No sube al sofá o al coche

subtotal de puntuación de limitación funcional
 (suma de las valoraciones 1 a 8)

MOVILIDAD ARTICULAR

9. LA MOVILIZACIÓN ARTICULAR MANUAL PASIVA EN LA CADERA ES: _____
 0= Libre de dolor y crepitación / 1= Se produce dolor leve en los últimos grados de flexión y extensión /
 2= Se produce dolor y/o crepitación durante el recorrido /
 3= No se puede realizar debido al elevado dolor y/o crepitación

10. ROM (Range of movement)-LIMITACIÓN DE MOVIMIENTO EN FLEXIÓN, EL GRADO DE FLEXIÓN DE LA CADERA ES: _____
 0= Flexión total 50-60° / 1= Ligera limitación <80° / 2= Limitación severa >80°

11. ROM-LIMITACIÓN DE MOVIMIENTO EN EXTENSIÓN, EL GRADO DE EXTENSIÓN DE LA CADERA ES: _____
 0= Extensión total 160-170° / 1= Ligera limitación 150-160° / 2= Limitación severa <150°

subtotal de puntuación de movilidad articular
 (suma de las valoraciones 9, 10 y 11)

12. ATROFIA MUSCULAR _____
 0= No hay signos de atrofia muscular / 1= Atrofia leve / 2= Atrofia severa

Cuestionario de satisfacción del propietario ante el tratamiento

Cuando los pacientes fueron incluidos en el estudio, se les realizó una encuesta a los propietarios sobre los tratamientos y resultados que habían obtenido con anterioridad, además de una valoración del estado actual del animal y su calidad de vida, medida por la limitación funcional que apreciaban en ellos.

Durante las revisiones realizadas a los pacientes (basal, 1, 3 y 6 meses) se procedió a la consulta de las siguientes cuestiones para poder valorar la evolución de los animales tras la administración de los tratamientos. El cuestionario constaba de un total de seis preguntas de tipo Likert con 5 respuestas (Tabla 7), cuyas respuestas están determinadas por una escala numérica donde 1 es la puntuación más baja y 5 la mejor puntuación:

- 1: Muy pobre
- 2: Pobre
- 3: Normal
- 4: Buena
- 5: Excelente

A tiempo basal, antes de la aplicación del tratamiento, se realizan las tres últimas cuestiones únicamente (cuestión 4, 5 y 6), realizando el total de las seis cuestiones en las siguientes valoraciones (1, 3 y 6 meses post tratamiento), para poder determinar el grado de satisfacción, y comparar de esta manera su evolución.

Tabla 7: Cuestionario sobre satisfacción ante el tratamiento.

Cuestión 1:	¿Cómo cree usted que ha evolucionado la cojera de <i>nombre mascota</i> ?
Cuestión 2:	¿Cree usted que ha sido eficaz el tratamiento que <i>nombre mascota</i> recibe?
Cuestión 3:	¿Cómo cree usted que <i>nombre mascota</i> ha respondido al tratamiento?
Cuestión 4:	¿Cómo cree usted que ES EL GRADO de la cojera de <i>nombre mascota</i> ?
Cuestión 5:	¿Cree usted que ha sido eficaz el tratamiento que HASTA AHORA ha recibido <i>nombre mascota</i> ?
Cuestión 6:	¿Cómo cree usted que es la calidad de vida de su mascota?

Escala Analógica Visual (VAS)

El dolor global que presentaban los pacientes se evaluó tanto por parte del propietario como por parte del veterinario utilizando una escala VAS de 0-100 mm, donde 0 mm significaban "sin dolor", y 100 mm marcaban el "dolor extremo".

Para llevar a cabo la evaluación del dolor que presentaba el animal por parte del propietario, este tenía que responder a la pregunta:

"Considerando la patología que sufre su mascota, por favor indique la cantidad de dolor que usted piensa que su mascota padece actualmente marcando con una (X) en la línea de la escala VAS (0-100 mm) donde el extremo de la izquierda se corresponde a la "ausencia de dolor" y el de la derecha al "dolor extremo".

Sin dolor

Dolor extremo

La evaluación del dolor general que presentaba el paciente por parte del veterinario, se realizó con la pregunta:

"Teniendo en cuenta una evaluación global del estado de la enfermedad en el paciente, marque con una (X) en la siguiente línea de la escala VAS (0-100 mm) donde el extremo de la izquierda se corresponde a la "ausencia de dolor" y el de la derecha al "dolor extremo".

Sin dolor

Dolor extremo

Para una mejor cuantificación del resultado, estos valores se pasaron a porcentaje, obteniéndose de esta manera un seguimiento del porcentaje de dolor que padecía el animal a lo largo del estudio.

Valoración de la seguridad de los tratamientos

La naturaleza, el comienzo, la duración, la gravedad y los resultados de todos los efectos secundarios fueron evaluados y documentados en cada visita. Para evaluar el perfil de seguridad de los tres tratamientos, todas las complicaciones y los eventos adversos fueron registrados con una escala de rendición de cuentas.

Necesidad de Analgesia de Rescate

A lo largo del estudio, los propietarios pudieron usar meloxicam (0,1 mg / kg) como analgésico de rescate si pensaban que sus mascotas lo requerían. De manera que el propietario anotó el uso de esta medicación en el registro diario del animal.

Plataforma de fuerza

A ocho pacientes de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria se les pudo realizar una evaluación objetiva de la cojera mediante plataforma de fuerza. Con este método se cuantificó la fuerza que ejercen las extremidades afectadas por la patología a lo largo de cada una de las revisiones (basal y 1, 3 y 6 meses).

Para ello además de valorar a los pacientes incluidos en el estudio con sus dos extremidades (la más y la menos afectada), se realizó el estudio en 5 pacientes sanos que sirvieron como grupo control.

Esta plataforma está montada en el centro de una pista de caucho de 7 metros de largo por donde tienen que caminar los animales. El peso de la pista se taró ajustándolo como fuerza 0. Los perros fueron guiados con correa siempre por el mismo controlador. La velocidad de paseo se midió mediante el uso de un sensor de movimiento colocado a un metro de la plataforma.

Se realizaron cinco ensayos válidos para cada perro, con una frecuencia de muestreo de 250 hercios. Una medición se consideró válida cuando la extremidad estaba plenamente en contacto con la plataforma de fuerza, y el perro caminaba junto al guía sin tirar de la correa. La medida se descartó si el perro se distrajo durante la medición, si la extremidad golpeaba el borde de la plataforma, o si alguna parte de la pata contralateral golpeaba la plataforma de fuerza.

Esta plataforma fue sincronizada con un ordenador utilizando DataStudio, un software especialmente diseñado para la adquisición, conversión numérica, y almacenamiento de los datos.

Con esta plataforma se evaluaron dos parámetros diferentes:

- **Pico de fuerza vertical (PVF):** fuerza máxima que ejerce la extremidad cuando se produce el apoyo de la misma durante la marcha
- **Impulso vertical (VI):** distribución de fuerzas de la extremidad afectada a través del tiempo

Los resultados de ambas variables se normalizaron con respecto al peso corporal (%) para caracterizar la posible mejora de la cojera durante el tratamiento.

Obtención de suero para el estudio de biomarcadores

La obtención de las muestras sanguíneas de los animales incluidos en el estudio, se realizó en las instalaciones de cada uno de los centros veterinarios colaboradores.

Para la obtención de las muestras utilizadas en la valoración de los biomarcadores, se realizó una extracción sanguínea de un volumen de 3ml a tiempo basal (justo antes de la aplicación del tratamiento), uno, tres y seis meses posteriores al tratamiento.

Las extracciones se realizaron por punción directa de la vena yugular con agujas de 20G y jeringuillas de 5 ml. Para ello se rasuró la zona yugular con máquina eléctrica, se desinfectó con clorhexidina jabonosa, alcohol etílico 96° y clorhexidina en solución.

La sangre se depositó en tubos sin anticoagulante con un volumen de 5 ml. El suero se obtuvo mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos, y posteriormente se pipeteó y almacenó en tubos eppendorf.

Todas las muestras se conservaron en congelación a -20°C en tubos eppendorf y posteriormente se enviaron al laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, donde fueron analizadas.

Análisis de biomarcadores

Todas las muestras de los participantes para el estudio bioquímico y de biomarcadores se obtuvieron a primera hora de la mañana y en ayunas. Se tomaron muestras en basal y a los 1, 3 y 6 meses posteriores al tratamiento. La muestra de sangre se obtuvo por venopunción directa de la vena yugular de forma aséptica.

Los sueros se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 rpm para realizar las medidas evaluadas.

Para medir tanto el C2C como el HA, se emplearon kits de ELISA, el Mybiosource Inc® para la evaluación del C2C, y el Teco Medical® para el HA. Ambos kits han demostrado su utilidad para la valoración de estos parámetros en el perro.

Estudio estadístico

Una vez seleccionados los pacientes e introducidos en el ensayo clínico, se les asignó uno de los 3 grupos (CMG, CMG+PRGF, PRGF) mediante un proceso aleatorizado, siguiendo el orden indicado anteriormente.

Al término del estudio, y una vez recogidos todos los datos, estos han sido analizados con el programa informático SPSS para Mac, versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), tomando como diferencia estadísticamente significativa un valor de $p < 0,05$, en todos los casos.

En primer lugar se realizó un estudio descriptivo simple utilizando tablas de frecuencias y gráficos de barras para las variables cualitativas y un estudio descriptivo de la media, desviación estándar, intervalos de confianza, máximo y mínimo y representación con gráficas de caja de las variables cuantitativas.

En todas las variables cuantitativas 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, comprobando las diferencias que existieron dentro de un mismo animal a lo largo del tiempo y observando así su evolución, y el factor tratamiento, comparando los resultados de cada uno de los grupos en los diferentes tiempos de estudio. Para ello se emplearon diferentes técnicas estadísticas:

Factor tiempo

Para valorar la evolución de cada uno de los tratamiento se compararon los resultados obtenidos en cada uno de los tiempos de forma independiente en cada uno de los grupos de estudio.

En las variables cualitativas se emplearon un test de medidas repetidas de ANOVA con el test posthoc de Tukey test o el test de Wilcoxon Signed Rank Test según fuese necesario en cada una de las variables, una vez comprobada la normalidad y esfericidad de las variables. En las variables categóricas se emplearon las tablas de contingencia y el coeficiente de contingencia o test exacto de Fisher según fuese necesario.

En las variables cuantitativas, una vez comprobada la normalidad y homogeneidad de las varianzas, en el caso de que las variables no cumplieran con la normalidad se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis o el test U de Mann-Whitney para comparar estas variables en cada uno de los tiempos. En caso de variables normales se realizó un test de ANOVA con el posterior test posthoc de Tukey.

Factor Tratamiento

Se comparó cada una de las variables de estudio en los diferentes tiempos de estudio, basal, 1, 3 y 6 meses, los resultados obtenidos en cada uno de los grupos.

Para comparar las variables cualitativas se empleó el test de X^2 , coeficiente de contingencia o el test exacto de Fisher según la necesidad de cada una de las variables.

Para las variables cuantitativas se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis o el test U de Mann-Whitney.

Análisis estadístico del estudio in vitro de las células madre

Las comparaciones estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student. Todos los valores de p se derivaron de una prueba estadística de dos factores.

Análisis estadístico de la plataforma de fuerza

Para la realización de estos datos, se utilizó un modelo lineal mixto de medidas repetidas. Se utilizaron como factores fijos el tiempo y el estatus del animal (cojera o no cojera), mientras que el factor de estudio fue el paciente.

Las diferencias entre PVF e IV entre los tiempos de estudio se valoraron con un análisis de varianza ANOVA seguido de un test posthoc de Tukey, previa evaluación de la normalidad del modelo con el test de Shapiro-Wilk.

Para valorar la relación de carga de peso entre la extremidad más afectada y la menos afectada y con el IV en ambas extremidades se utilizó un modelo de regresión lineal.

Resultados

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.

Resultados

Descripción de los pacientes

Exclusión de los pacientes

Durante el proceso de inclusión en el estudio, se evaluaron un total de 65 animales que cumplían presumiblemente con los requisitos solicitados, de los cuales sólo cumplieron 49 con todos los criterios de inclusión.

De estos 49 animales, durante la realización del estudio, 4 fueron eliminados del mismo por los motivos que se detallan a continuación:

- **Número 19:** Perra hembra de 42,60 kg de peso, que por problemas personales del propietario sólo acudió a las revisiones iniciales y a la realización de la aplicación del tratamiento, pero no pudo acudir a las evaluaciones posteriores.
- **Número 27:** Perro macho de 33,30 kg de peso. Este animal sufrió un atropello en el que tuvo una fractura múltiple de cadera, a los 2 meses del tratamiento por lo que se eliminó del estudio.
- **Número 31:** Perra hembra de 32,15 kg de peso que padeció una dilatación torsión gástrica a los 3 meses de la infiltración con el tratamiento.
- **Número 32:** Perro macho de 36,50 kg al que se le diagnosticó una hernia discal a los 2 meses del tratamiento.

De manera que, teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado respecto a que un mismo animal podía pertenecer a dos grupos de estudio diferentes, los animales totales con los que hemos trabajado en el estudio estadístico han sido 45, distribuidos aleatoriamente en 3 grupos:

- **Grupo 1, CMG:** 25 animales.
- **Grupo 2, CMG+PRGF:** 23 animales.
- **Grupo 3, PRGF:** 19 animales.

Al presentar algunos animales varias articulaciones afectadas, el número total de articulaciones evaluadas por grupo quedó distribuida de la manera siguiente:

- **Grupo 1, CMG:** 25 articulaciones.
- **Grupo 2, CMG+PRGF:** 23 articulaciones.
- **Grupo 3, PRGF:** 47 articulaciones.

Edad de los animales

En cuanto a la edad de los pacientes al inicio del estudio, los resultados descriptivos aparecen en la tabla 8. Tras la realización de la prueba de Kruskal-Wallis se ha visto que no existen diferencias entre el grupo CMG y el grupo CMG+PRGF ($p=0,877$), pero sí que existen diferencias entre estos dos grupos y el grupo PRGF, cuya edad media es superior a los otros dos ($p=0,005$).

Tabla 8: Edad al inicio del estudio de los pacientes medida en meses para los 3 grupos de estudio.

GRUPO	N	MEDIA	DESV. TÍP.	MÍNIMO	MÁXIMO
CMG	25	57,40	40,79	8	135
CMG-PRGF	23	56,39	42,00	8	135
PRGF	19	87,21	39,24	13	139
TOTAL	67	65,51	42,46	8	139

Estudio de viabilidad de las células madre

Resultados de la caracterización de las CMG

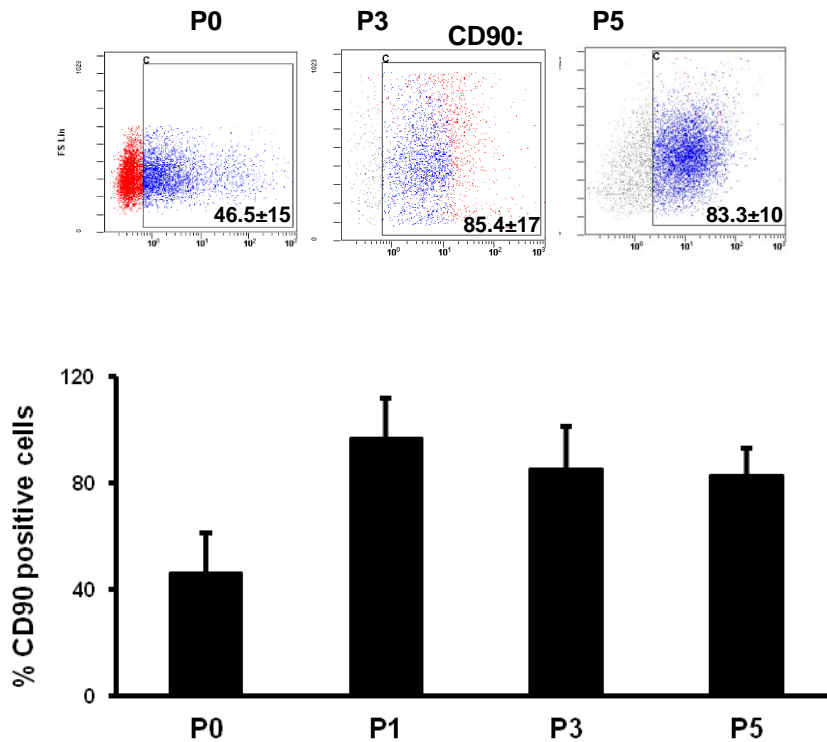
En este estudio se pretendió valorar la calidad de las células madre recibidas de los laboratorios Fat Stem para poder evaluar si las características y naturaleza de estas células era adecuada para su utilización en la OA de los perros.

Para ello, se analizaron las CMG de cinco perros recibidas después de la biopsia y procesamiento enzimático que se realizó en el Laboratorio Fat Stem como ya se ha visto anteriormente en la sección de material y métodos.

Una vez recibida la suspensión celular concentrada, se caracterizó mediante el uso de CD90 como marcador de células madre. El análisis de citometría de flujo mostró que la mitad de la población en el pase 0 reaccionaba positivamente a la hibridación CD90 (Gráfica 1). También se utilizó el marcador CD34 (marcador de células hematopoyéticas), el cual se hibridó con casi el

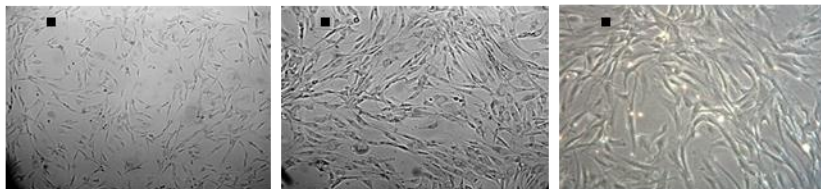
40% de la población de células restantes. Los posteriores pasajes de CMG, en condiciones adherentes enriquecidas, reaccionaron significativamente de manera positiva frente a CD90 hasta el pasaje 5 (Gráfica 1).

Gráfica 1. Células caninas mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMG). Citometría de flujo con análisis de la población de CMG positiva a CD90 en los pasajes 0 (antes de las condiciones de cultivo de células adherentes), y los pasajes 3 y 5 (en las condiciones adherentes). * P <0,05;



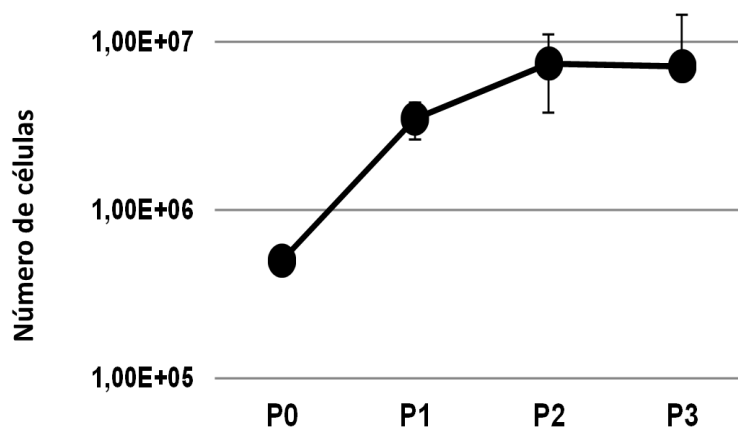
A su vez, el análisis morfológico de las CMG después de tres pases consecutivos, mostró una correlación característica y similar con las células madre mesenquimales (Figura 15).

Figura 15: Paneles superiores: microscopía de contraste de fase imágenes representativas de CMG cultivadas en condiciones adherentes en P1-3.



Las CMG obtenidas de cada uno de estos perros se sembraron y se contaron después de tres pases consecutivos. Los resultados mostraron una curva proliferativa consistente y, se encontró un crecimiento exponencial para todas las muestras analizadas en el medio que contenía suero bovino fetal al 10% (Gráfica 2).

Gráfica 2: Curva de crecimiento de las CMG cuantificada a partir de cinco muestras independientes en P1-3 y los valores se expresaron como media \pm DE * P <0,05.

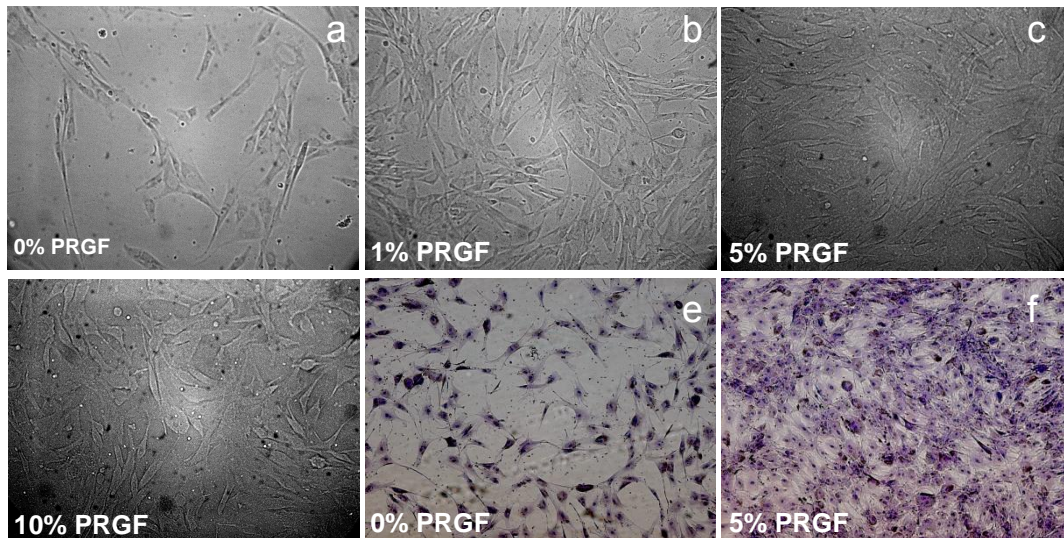


Influencia del PRGF en el crecimiento de las CMG

El uso de PRGF constituye una fuente de moléculas de señalización celular y puede contribuir a la regeneración de los tejidos (Anitua et al., 2004, Kasten et al., 2008a). El PRGF representa una fuente de factores de crecimiento y supervivencia que favorece la adherencia y proliferación de las MSC (Kasten et al., 2008b). Existe una controversia en cuanto a los beneficios del PRGF, la cual puede ser causada por la variación individual en la concentración de los diversos factores de crecimiento contenidos en el PRGF (Cho et al., 2011).

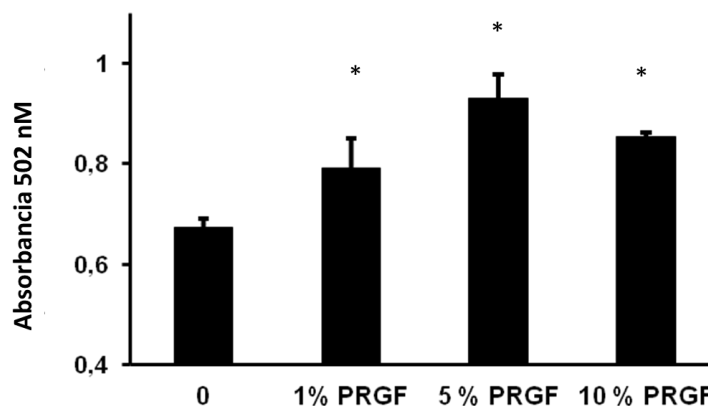
En nuestro estudio, se determinó los efectos de concentraciones crecientes de PRGF (1%, 5% y 10%), en la proliferación de las CMG. Se llegó a cultivos confluentes cuando las CMG fueron tratadas con 5% PRGF durante 24 horas como podemos ver en la figura 16 (a-d). Las células no tratadas y las tratadas con PRGF (5%) se tiñeron con Giemsa para mejorar la visualización, como se aprecia en la figura 16 (e-f).

Figura 16: PRGF utilizado inducir la proliferación de las CMG. (a) Microscopía de contraste de fases de las CMG con evidencia de un aumento de la densidad de las células en presencia del PRGF (1%, 5% o 10%) a dosis dependiente de PRGF (a-e: células no fijadas y no teñidas; e -f: células fijadas y teñidas con Giemsa).



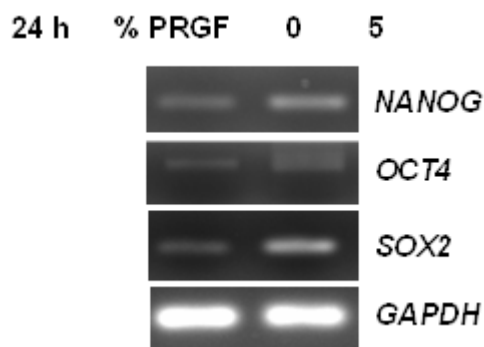
Se produjo un aumento significativo de la proliferación ($p < 0,05$) de CMG después del tratamiento con 1%, 5% y 10% PRGF, cuantificado por el ensayo de MTS (Promega, EE.UU.) (Gráfica 3).

Gráfica 3: Cuantificación de la actividad proliferativa de las CMG en presencia o ausencia del PRGF (0, 1, 5 o 10%) durante 24 horas, * $P < 0,05$ vs 0% PRGF. Se representa la media \pm S.D. de tres experimentos diferentes.



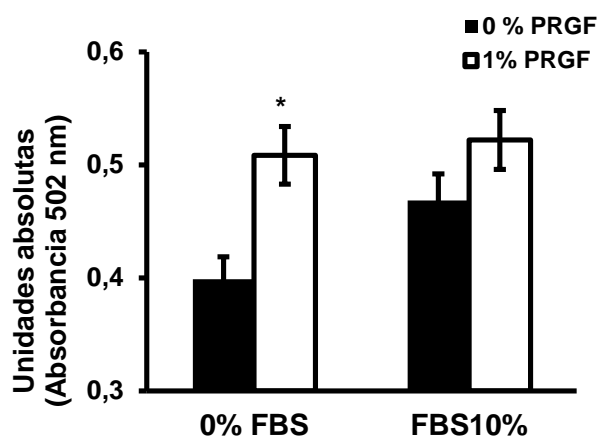
La expresión transcripcional de los marcadores pluripotentes Nanog, Sox2 y Oct4 se evaluó por PCR semicuantitativa. Detectándose mayor presencia de transcripciones de los tres marcadores pluripotentes cuando las CMG se trataron con PRGF al 5% durante 24 horas, lo que sugiere una mayor auto-renovación de las CMG (Gráfica 4).

Gráfica 4: PCR semicuantitativa de la expresión de genes relacionados con la autorrenovación de CMG tratadas o no con PRGF (5%).



Se observó que el tratamiento de CMG con una combinación de FBS con PRGF, no cambia las tasas de viabilidad de las células en comparación con los resultados obtenidos solo con PRGF (Gráfica 5). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los factores de crecimiento contenidos en PRGF podrían ser suficientes para mejorar el rendimiento de las CMG.

Gráfica 5: Cuantificación de la actividad proliferativa de las CMG en presencia o ausencia del 1% PRGF durante 24 horas, con o sin FBS (10%) en el medio de crecimiento. * P < 0.05 vs 0% SCLP. Se representa la media \pm S.D. de tres experimentos diferentes.



Estudio Descriptivo y Comparativo del Factor Tiempo Grupo CMG

A continuación se exponen de manera independiente los datos obtenidos en el grupo CMG, así como el análisis estadístico que compara su evolución en cada uno de los tiempos de estudio (Basal, 1, 3 y 6 meses).

Peso

En la tabla 9 aparece el peso de cada uno de los pacientes del grupo tratado con CMG y su evolución en el tiempo.

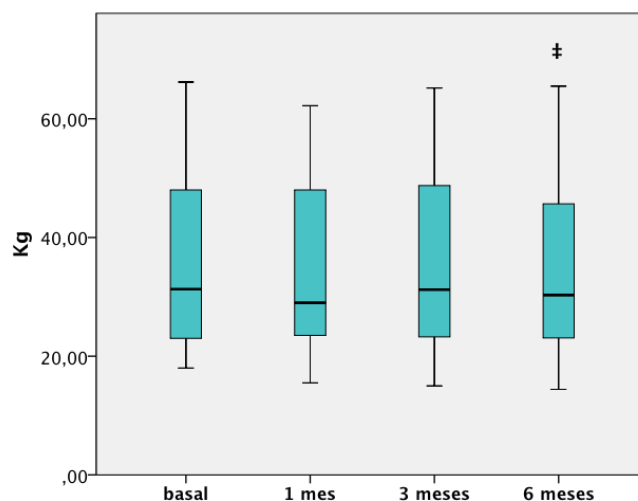
Tabla 9: Evaluación del peso en los pacientes del grupo CMG

GRUPO CMG	BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
1	18,30	19,00	20,00	20,00	19,33	0,83
2	22,50	22,50	22,00	22,00	22,25	0,29
3	31,30	31,40	31,20	30,00	30,98	0,66
4	39,10	39,10	43,00	42,50	40,93	2,12
6	35,00	36,00	37,00	40,00	37,00	2,16
7	26,00	27,15	26,80	27,00	26,74	0,51
8	26,60	26,80	26,40	26,00	26,45	0,34
9	18,00	15,50	15,00	14,40	15,73	1,58
10	18,30	18,40	18,10	18,10	18,23	0,15
11	52,00	50,60	52,00	54,00	52,15	1,40
12	24,00	22,60	23,50	22,60	23,18	0,69
13	31,00	29,00	29,50	30,30	29,95	0,88
14	48,00	48,10	48,30	48,85	48,31	0,38
15	23,00	25,15	25,15	23,30	24,15	1,16
16	51,00	40,50	50,00	51,00	48,13	5,11
17	23,00	23,50	23,00	30,00	24,88	3,42
18	48,60	52,80	49,20	-	50,20	2,27
20	57,40	54,00	54,20	-	55,20	1,91
21	45,00	48,00	51,00	55,60	49,90	4,52
22	66,20	62,20	65,20	65,50	64,78	1,77
23	56,20	53,80	-	54,80	54,93	1,21
24	29,20	29,00	31,20	31,00	30,10	1,16
25	43,20	43,80	41,00	42,00	42,50	1,25
46	32,40	28,00	31,50	34,40	31,58	2,67
47	22,00	22,20	21,60	22,85	22,16	0,52
TOTAL	35,49	34,76	34,83	35,05	35,04	13,70

Una vez realizada la exposición de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los tiempos de estudio que podemos observar en la tabla 10 y en la gráfica 6.

Tabla 10: Estudio comparativo entre tiempos del factor peso en el grupo CMG

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	,73	2,88	,58	-,46	1,92	1,27	24	0,218
BASAL-3MESES	-,20	2,05	,42	-1,06	,67	-,47	23	0,641
BASAL-6MESES	-1,08	3,08	,64	-2,42	,25	-1,68	22	0,106
1MES-3MESES	-,86	2,56	,52	-1,94	,22	-1,64	23	0,115
1MES-6MESES	-1,91	3,28	,68	-3,33	-,49	-2,79	22	0,11
3MESES-6MESES	-,86	2,03	,43	-1,76	,04	-1,99	21	0,06

Gráfica 6: Evolución del peso de los pacientes del grupo CMG en el tiempo

Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. # Diferencias con 3 meses

Como se puede apreciar, en el grupo CMG únicamente existieron diferencias significativas entre los 3 y los 6 meses de estudio, donde se produjo una disminución significativa del peso que presentaban los pacientes a los 6 meses de estudio.

Estudio del grado de artrosis mediante la escala de Bioarth

La evaluación del grado de artrosis se realizó con la valoración de la escala de Bioarth para cada una de las articulaciones estudiadas. Esta escala está basada en los resultados de 4 apartados diferentes, que examinan diversos parámetros de cada paciente (evaluación radiológica, limitación funcional, movilidad articular y atrofia muscular). A continuación se describen los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

Evaluación Radiológica

En cuanto a la valoración de los cambios radiológicos los resultados aparecen a continuación en la tabla 11, donde se describen los valores obtenidos en cada uno de los tiempos de estudio, en frecuencia de datos y en porcentaje dentro del grupo.

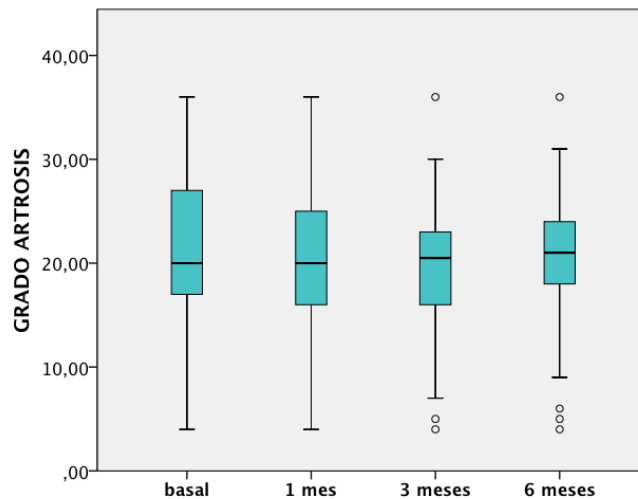
Tabla 11: Evaluación radiológica en los pacientes del grupo CMG

		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
ARTROSIS LEVE	Nº ANIMALES	3	3	3	3	12
	PORCENTAJE	12,0%	12,0%	12,5%	13,0%	12,4%
ARTROSIS MODERADA	Nº ANIMALES	3	2	2	2	9
	PORCENTAJE	12,0%	8,0%	8,3%	8,7%	9,3%
ARTROSIS SEVERA	Nº ANIMALES	19	20	19	18	76
	PORCENTAJE	76,0%	80,0%	79,2%	78,3%	78,4%
TOTAL	Nº ANIMALES	25	25	24	23	97
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Una vez descritos los resultados obtenidos se valoró mediante la aplicación del coeficiente de contingencia las diferencias entre los distintos tiempos de estudio, apareciendo expuestos en la tabla 12 y la gráfica 7.

Tabla 12: Estudio comparativo entre tiempos del grado de artrosis en el grupo CMG

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	0,12	0,83	0,17	-0,22	0,46	0,72	24	0,478
BASAL-3MESES	0,08	1,32	0,27	-0,47	0,64	0,31	23	0,759
BASAL-6MESES	-0,09	1,20	0,25	-0,61	0,43	-0,35	22	0,732
1MES-3MESES	0,00	0,72	0,15	-0,31	0,31	0,00	23	1,000
1MES-6MESES	-0,22	0,74	0,15	-0,54	0,10	-1,42	22	0,171
3MESES-6MESES	-0,23	0,69	0,15	-0,53	0,08	-1,56	21	0,135

Gráfica 7: Evolución del grado de artrosis de los pacientes del grupo CMG en el tiempo

* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Como podemos observar no existieron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo respecto a la valoración radiológica de los signos de artrosis que presentaba el grupo

tratado con CMG, es decir, el grado de artrosis radiológica de estos animales se mantuvo constante a lo largo de todo el estudio.

Limitación funcional

Los datos obtenidos en esta variable son el resultado de someter al propietario a una serie de cuestiones sobre las limitaciones de movimiento que tiene la mascota ante determinadas circunstancias. La suma de todos los parámetros nos da un número que oscila entre 0 y 23 puntos, siendo los mejores resultados los más próximos al cero.

En la tabla 13 se describen como la media \pm DE (IC 95%) los resultados obtenidos sobre la limitación funcional en los pacientes del grupo CMG.

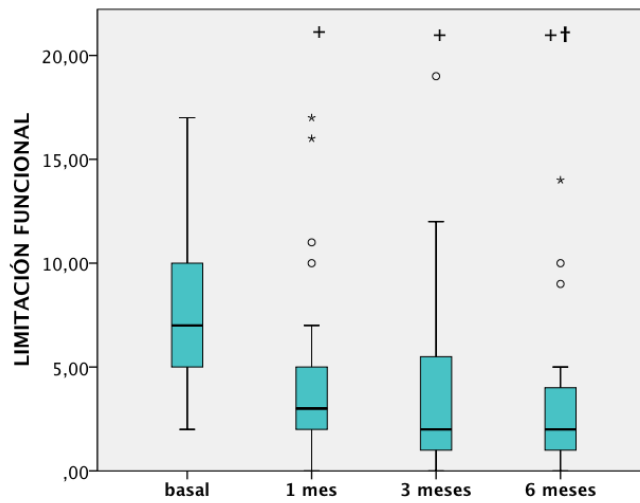
Tabla 13: Evaluación de la limitación funcional en los pacientes del grupo CMG

	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
BASAL	25	7,76	4,26	6,00	9,52
1 MES	25	4,52	4,54	2,65	6,39
3 MESES	24	3,92	4,63	1,96	5,87
6 MESES	22	3,09	3,62	1,48	4,70
TOTAL	96	4,89	4,59	3,95	5,82

En la tabla 14, se exponen los resultados obtenidos de comparar los valores de cada uno de los tiempos de estudio para poder evaluar la evolución de este parámetro en el tiempo.

Tabla 14: Estudio comparativo entre tiempos de la limitación funcional en el grupo CMG

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	3,24	3,74	0,75	1,69	4,79	4,33	24	<0,0001
BASAL-3MESES	3,92	3,89	0,79	2,27	5,56	4,93	23	<0,0001
BASAL-6MESES	4,41	4,00	0,85	2,64	6,18	5,18	21	<0,0001
1MES-3MESES	0,75	2,01	0,41	-0,10	1,60	1,83	23	0,080
1MES-6MESES	1,09	1,90	0,41	0,25	1,93	2,69	21	0,014
3MESES-6MESES	0,38	1,60	0,35	-0,35	1,11	1,09	20	0,287

Gráfica 8: Evolución de la limitación funcional de los pacientes del grupo CMG en el tiempo

* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Como se aprecia tanto en la tabla 14 como en la gráfica 8, se puede ver la mejoría en cuanto a la limitación funcional de los pacientes desde el primer mes de tratamiento, mejorando a lo largo de todo el estudio. Finalmente, a los 6 meses de estudio, los pacientes presentaban una clara mejoría sobre los valores obtenidos en basal, antes de la aplicación intraarticular de las CMG ($p < 0,0001$), al igual que después de un mes del tratamiento ($p = 0,014$).

Movilidad articular

Este parámetro valora la limitación en los movimientos de las articulaciones a través de la evaluación del rango de movimiento articular (extensión y flexión) y la presencia de molestias o dolor durante la realización del estudio. Los valores que aporta oscilan entre 0 y 7 puntos siendo mejores resultados los más cercanos al 0 ya que se limita en menor grado la movilidad de la articulación. A continuación, en la tabla 15 aparecen descritos los valores obtenidos.

Tabla 15: Evaluación de la movilidad articular en los pacientes del grupo CMG

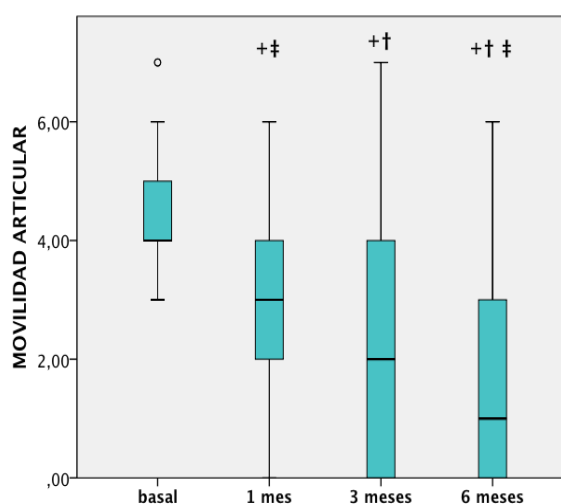
VARIABLE	TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
					LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
MOVILIDAD ARTICULAR	BASAL	25	4,60	1,12	4,14	5,06
	1 MES	25	3,00	1,29	2,47	3,53
	3 MESES	24	2,13	2,11	1,23	3,02
	6 MESES	23	1,74	1,86	0,93	2,55
	TOTAL	97	2,90	1,96	2,50	3,29
GRADO FLEXIÓN	BASAL	24	62,58	10,70	58,06	67,10
	1 MES	24	55,79	7,22	52,74	58,84
	3 MESES	23	55,30	6,15	52,64	57,97
	6 MESES	22	51,55	5,13	49,27	53,82
	TOTAL	93	56,42	8,53	54,66	58,18
GRADO EXTENSIÓN	BASAL	25	130,36	17,58	123,10	137,62
	1 MES	25	151,48	12,13	146,47	156,49
	3 MESES	24	158,42	10,74	153,88	162,95
	6 MESES	23	159,65	9,80	155,41	163,89
	TOTAL	97	149,69	17,45	146,17	153,21

En relación a la comparación entre los valores obtenidos en cada uno de los tiempos para la movilidad articular general, los resultados se muestran en la tabla 16 y la gráfica 9, donde podemos apreciar las diferencias existentes.

Tabla 16: Estudio comparativo entre tiempos de la movilidad articular en el grupo CMG

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	1,60	1,22	0,24	1,09	2,11	6,53	24	<0,0001
BASAL-3MESES	2,42	1,53	0,31	1,77	3,06	7,74	23	<0,0001
BASAL-6MESES	2,78	1,31	0,27	2,21	3,35	10,17	22	<0,0001
1MES-3MESES	0,88	1,30	0,26	0,33	1,42	3,31	23	<0,0001
1MES-6MESES	1,22	1,24	0,26	0,68	1,75	4,70	22	<0,0001
3MESES-6MESES	0,32	0,57	0,12	0,07	0,57	2,63	21	0,016

Gráfica 9: Evolución de la movilidad articular de los pacientes del grupo CMG en el tiempo



+ Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. # Diferencias con 3 meses

Con los resultados obtenidos, observamos que los pacientes que pertenecieron al grupo CMG presentaron una mejora claramente significativa entre cada uno de los tiempos evaluados alcanzando una mejor movilidad articular a los 6 meses de estudio en comparación con los otros tiempos valorados.

Atrofia muscular

La atrofia muscular se midió en centímetros, valorando la circunferencia de los músculos en los puntos anatómicos referenciados para cada una de las articulaciones. A continuación aparecen expuestos los datos medios obtenidos de las mediciones en cada uno de los tiempos de control (Tabla 17). Finalmente y en relación a los valores obtenidos, esta variable se categoriza en 3 medidas: 0: sin atrofia muscular, 1: atrofia muscular media y 2: atrofia muscular severa (Tabla 18).

Tabla 17: Evaluación del perímetro de la masa muscular en centímetros en los pacientes del grupo CMG

TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	25	30,28	5,67	27,94	32,62
1 MES	25	31,28	5,32	29,09	33,47
3 MESES	24	31,40	5,05	29,26	33,53
6 MESES	23	31,63	5,22	29,37	33,89
TOTAL	97	31,13	5,26	30,07	32,20

Tabla 18: Valoración de la atrofia muscular de forma categórica en los pacientes del grupo CMG en todos los tiempos de evaluación

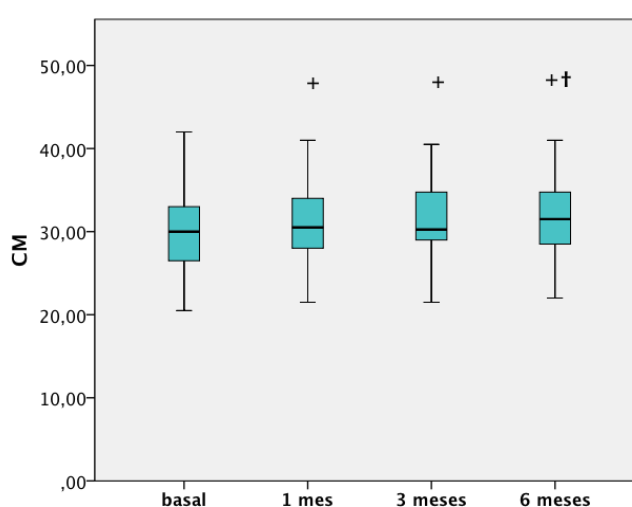
		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
SIN ATROFIA	Nº ANIMALES	2	3	4	10	19
	PORCENTAJE	8,0%	12,0%	16,7%	43,5%	19,6%
ATROFIA LEVE	Nº ANIMALES	16	18	16	11	61
	PORCENTAJE	64,0%	72,0%	66,7%	47,8%	62,9%
ATROFIA SEVERA	Nº ANIMALES	7	4	4	2	17
	PORCENTAJE	28,0%	16,0%	16,7%	8,7%	17,5%
TOTAL	Nº ANIMALES	25	25	24	23	97
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Una vez obtenidos los resultados descriptivos se procedió a la comparación de estos valores entre los tiempos de estudio obteniendo los resultados que aparecen a continuación en la tabla 19 y en la gráfica 10.

Tabla 19: Estudio comparativo entre tiempos de la evolución del perímetro de masa muscular en centímetros en los pacientes del grupo CMG.

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	-1,00	1,60	0,32	-1,66	-0,34	-3,12	24	0,005
BASAL-3MESES	-1,06	2,05	0,42	-1,93	-0,20	-2,55	23	0,018
BASAL-6MESES	-1,67	1,85	0,39	-2,47	-0,87	-4,33	22	<0,0001
1MES-3MESES	-0,02	1,15	0,23	-0,51	0,46	-0,09	23	0,930
1MES-6MESES	-0,63	1,19	0,25	-1,14	-0,12	-2,54	22	0,019
3MESES-6MESES	-0,57	1,29	0,28	-1,14	0,01	-2,06	21	0,052

Gráfica 10: Evolución del perímetro de la masa muscular en centímetros de los pacientes del grupo CMG en el tiempo



+ Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

En el diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio perímetro muscular existieron diferencias significativas desde el primer mes de estudio hasta los 6 meses post tratamiento, aumentando la masa muscular en los pacientes del grupo CMG.

Rango de movilidad

El rango de movilidad es una variable calculada para poder estandarizar la mejoría obtenida en todas las articulaciones, ya que el grado de flexión y extensión de cada una de las articulaciones incluidas en el estudio es diferente. Así se convirtió en un parámetro que valora el % del rango de movimiento sobre el 100% de cada articulación. En la tabla 20 podemos ver los datos obtenidos de esta variable en cada una de las revisiones.

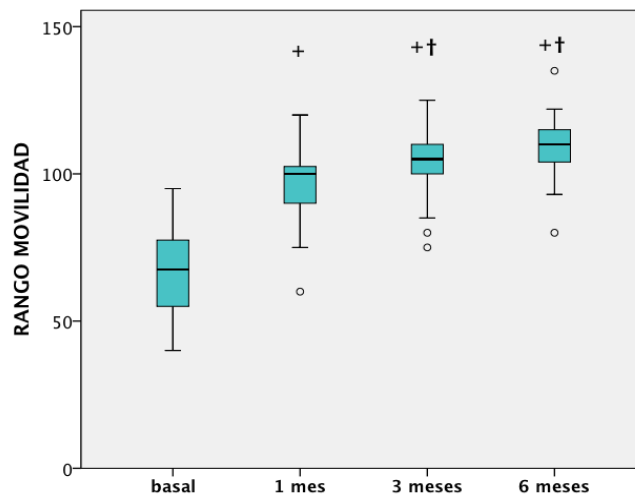
Tabla 20: Evaluación del rango de movilidad articular en los pacientes del grupo CMG

VARIABLE	TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
					LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
RANGO MOVILIDAD	BASAL	24	66,75	14,82	60,49	73,01
	1 MES	24	95,54	12,21	90,39	100,70
	3 MESES	23	103,26	12,34	97,92	108,60
	6 MESES	22	108,32	11,58	103,19	113,45
	TOTAL	93	93,04	20,57	88,81	97,28

En la tabla 21 se observan los resultados de comparar esta variable en cada uno de los tiempos de estudio, pudiendo observar la evolución de este parámetro en la gráfica 11.

Tabla 21: Estudio comparativo entre tiempos del rango de movilidad en los pacientes del grupo CMG

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	-16,41	13,73	1,45	-19,23	-13,53	-11,34	89	<0,0001
BASAL-3MESES	-20,24	14,37	1,53	-23,28	-17,20	-13,22	87	<0,0001
BASAL-6MESES	-21,99	16,20	1,77	-25,50	-18,47	-12,43	83	<0,0001
1MES-3MESES	-4,02	7,76	0,83	-5,66	-2,38	-4,86	87	<0,0001
1MES-6MESES	-5,38	9,78	1,07	-7,51	-3,26	-5,05	83	<0,0001
3MESES-6MESES	-1,02	8,68	,96	-2,93	,88	-1,07	81	0,289

Gráfica 11: Evolución del rango de movilidad de los pacientes del grupo CMG en el tiempo

* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Como vemos tanto en la tabla 21 como en la gráfica 11, el rango de movilidad de las articulaciones estudiadas en el grupo CMG, aumentó ya desde el primer mes de estudio, alcanzando los valores más elevados de movimiento articular a los 3 meses, manteniéndose hasta los 6.

Evaluación del dolor

Tanto el propietario como el veterinario evaluaron el dolor de la mascota mediante una escala analógica visual (VAS) en cada una de las visitas, de forma independiente y contestando a las preguntas que ya hemos expuesto en la metodología.

En las tablas 22 e 23 podemos ver los valores obtenidos para estas variables por parte del propietario y veterinario, respectivamente.

Propietario

Tabla 22: Evaluación de la VAS por parte del propietario en los pacientes del grupo CMG

TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	25	33,98	16,04	27,36	40,60
1 MES	25	17,77	16,42	10,99	24,55
3 MESES	24	22,74	22,51	13,23	32,24
6 MESES	22	20,10	15,98	13,01	27,18
TOTAL	96	23,77	18,77	19,96	27,57

Veterinario

Tabla 23: Evaluación de la VAS por parte del veterinario en los pacientes del grupo CMG

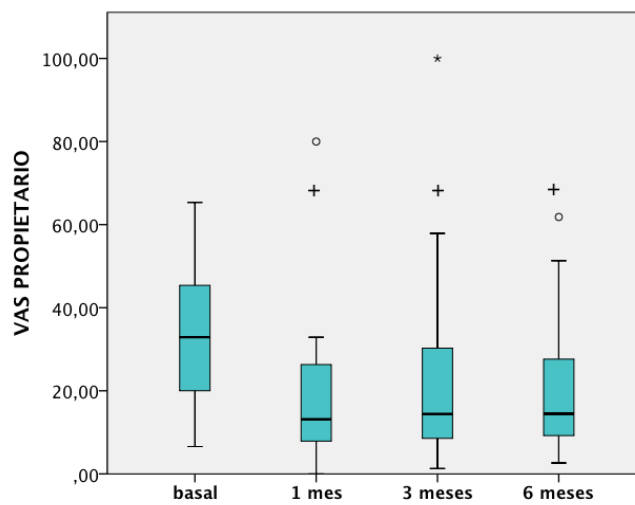
TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	25	27,57	16,02	20,95	34,18
1 MES	25	15,87	7,51	12,77	18,97
3 MESES	24	12,67	8,70	9,00	16,34
6 MESES	23	10,87	5,96	8,29	13,45
TOTAL	97	16,91	12,15	14,46	19,36

VAS propietario

A continuación, podemos ver los resultados comparativos expuestos en forma de tabla y gráfica de la valoración de la sensación de dolor entre los diversos tiempos de estudio por parte del propietario (Tabla 24 y Gráfica 12).

Tabla 24: Estudio comparativo entre tiempos de la VAS evaluada por parte del propietario en el grupo CMG

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	16,21	19,00	3,80	8,36	24,05	4,27	24	<0,0001
BASAL-3MESES	10,88	21,32	4,35	1,88	19,88	2,50	23	0,020
BASAL-6MESES	13,18	21,17	4,51	3,80	22,57	2,92	21	0,008
1MES-3MESES	-4,50	16,52	3,37	-11,48	2,48	-1,33	23	0,195
1MES-6MESES	-5,63	16,93	3,61	-13,14	1,88	-1,56	21	0,134
3MESES-6MESES	0,36	14,79	3,23	-6,37	7,10	0,11	20	0,911

Gráfica 12: Evolución de la evaluación del dolor (VAS) por parte del propietario de los pacientes del grupo CMG en el tiempo

* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

En la valoración de dolor que presentaban los pacientes por parte de sus respectivos propietarios, se observaron diferencias significativas entre el tiempo basal y el resto de evaluaciones (1,3 y 6 meses), observando una clara mejoría en la sensación del dolor del paciente ya desde el primer mes post tratamiento.

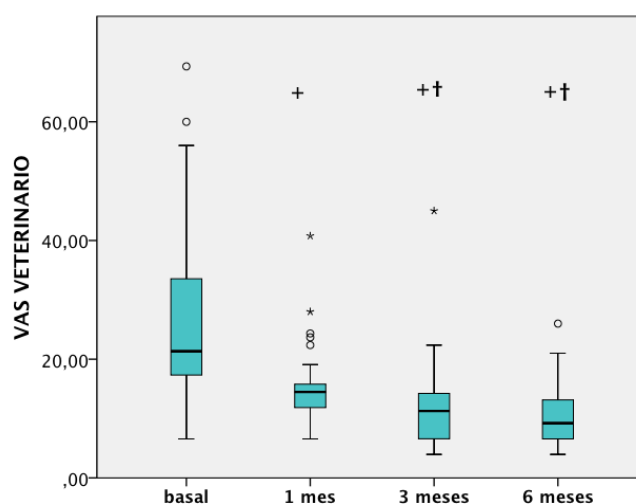
VAS veterinario

En la valoración del dolor del animal por parte del investigador, las diferencias significativas se observaron igual que en el caso anterior entre todos los tiempos de estudio, viendo una mejoría mayor que en la valoración del propietario ya que también hubo diferencias entre 1 mes y el resto de revisiones (Tabla 25 y Gráfica 13). Es decir, según el veterinario las mascotas tenían menos dolor conforme pasaba el tiempo.

Tabla 25: Estudio comparativo entre tiempos de la VAS evaluada por parte del veterinario en el grupo CMG

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	11,70	11,95	2,39	6,77	16,63	4,90	24	<0,0001
BASAL-3MESES	14,55	11,48	2,34	9,70	19,39	6,21	23	<0,0001
BASAL-6MESES	15,33	11,75	2,45	10,25	20,41	6,26	22	<0,0001
1MES-3MESES	2,84	3,50	0,71	1,37	4,32	3,98	23	0,001
1MES-6MESES	3,98	4,99	1,04	1,82	6,13	3,82	22	0,001
3MESES-6MESES	0,95	2,96	0,63	-0,36	2,26	1,50	21	0,148

Gráfica 13: Evolución de la evaluación del dolor (VAS) por parte del veterinario de los pacientes del grupo CMG en el tiempo



+ Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Valoración de la satisfacción del propietario

La satisfacción del propietario se ha valorado con la realización de 6 preguntas de escala de Likert de 5 valores, donde 1 corresponde al valor más bajo (muy pobre) y 5 al más alto (excelente).

Las preguntas han sido las siguientes:

- **Primera:** ¿Cómo cree usted que ha evolucionado la cojera de *nombre mascota*?
- **Segunda:** ¿Cree usted que ha sido eficaz el tratamiento que *nombre mascota* recibe?
- **Tercera:** ¿Como cree usted que *nombre mascota* ha respondido al tratamiento?
- **Cuarta:** ¿Cómo cree usted que ES EL GRADO de la cojera de *nombre mascota*?

- **Quinta:** ¿Cree usted que ha sido eficaz el tratamiento que HASTA AHORA ha recibido *nombre mascota*?
- **Sexta:** ¿Cómo cree usted que es la calidad de vida de su mascota?

Primera pregunta

La evolución de la cojera según el criterio del propietario aparece reflejado en la tabla 26. En la tabla 27 y gráfica 14, podemos observar los resultados del estudio estadístico en la comparación entre los tiempos de evolución.

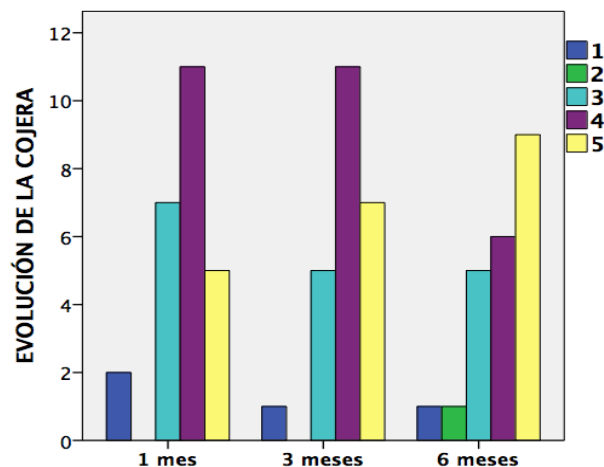
Tabla 26: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la evolución de la cojera en los pacientes del grupo CMG

SATISFACCIÓN		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	2	1	1	4
	PORCENTAJE	8,0%	4,2%	4,5%	5,6%
2	Nº ANIMALES	0	0	1	1
	PORCENTAJE	0,0%	0,0%	4,5%	1,4%
3	Nº ANIMALES	7	5	5	17
	PORCENTAJE	28,0%	20,8%	22,7%	23,9%
4	Nº ANIMALES	11	11	6	28
	PORCENTAJE	44,0%	45,8%	27,3%	39,4%
5	Nº ANIMALES	5	7	9	21
	PORCENTAJE	20,0%	29,2%	40,9%	29,6%
TOTAL	Nº ANIMALES	25	24	22	71
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 27: Estudio comparativo sobre la evolución de la cojera en los pacientes del grupo CMG

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	5,83a	8	0,67
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	6,01	8	0,65
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	0,84	1	0,36
N DE CASOS VÁLIDOS	71		

Gráfica 14: Evolución de la cojera en los pacientes del grupo CMG



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [#] Diferencias con 3 meses

Como podemos ver en los resultados obtenidos en la pregunta sobre la evolución de la cojera de la mascota, desde el primer mes observamos un mayor porcentaje de animales en las puntuaciones más elevadas, alcanzando a los 6 meses de estudio un número de animales mayor en la puntuación 5, es decir que las mascotas evolucionaron muy favorablemente según sus propietarios.

Segunda pregunta

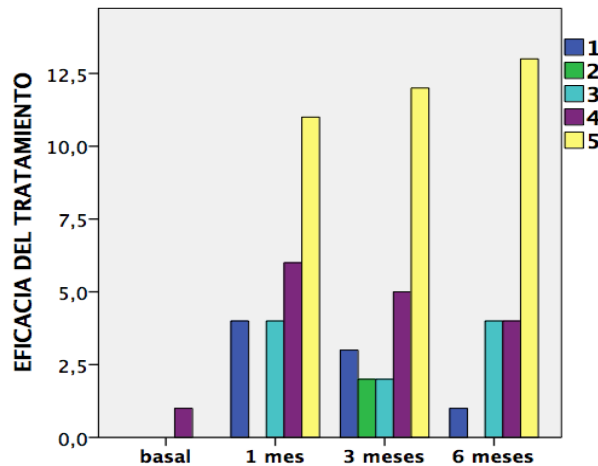
En cuanto a la eficacia del tratamiento, los resultados de cada uno de los tiempos de evolución se encuentran reflejados en la tabla 28, mientras que la comparación entre los tiempos de estudio aparecen en la tabla 29 y en la gráfica 15.

Tabla 28: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la eficacia al tratamiento en los pacientes del grupo CMG

SATISFACCIÓN		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	4	3	1	8
	PORCENTAJE	16,0%	12,5%	4,5%	11,3%
2	Nº ANIMALES	0	2	0	2
	PORCENTAJE	0,0%	8,3%	0,0%	2,8%
3	Nº ANIMALES	4	2	4	10
	PORCENTAJE	16,0%	8,3%	18,2%	14,1%
4	Nº ANIMALES	6	5	4	15
	PORCENTAJE	24,0%	20,8%	18,2%	21,1%
5	Nº ANIMALES	11	12	13	36
	PORCENTAJE	44,0%	50,0%	59,1%	50,7%
TOTAL	Nº ANIMALES	25	24	22	71
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 29: Estudio comparativo sobre la eficacia al tratamiento en los pacientes del grupo CMG

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	10,57a	12	0,57
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	10,69	12	0,56
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	1,31	1	0,25
N DE CASOS VÁLIDOS	72		

Gráfica 15: Eficacia al tratamiento en los pacientes del grupo CMG

* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

En cuanto a la eficacia del tratamiento, observamos, al igual que en la pregunta anterior, unos resultados muy favorables ya desde el primer mes post tratamiento, que se mantuvieron hasta el final del estudio, mostrando una elevada eficacia del tratamiento ya desde las fases iniciales del estudio.

Tercera pregunta

En cuanto a la valoración de la respuesta al tratamiento en las mascotas, los resultados obtenidos en los distintos tiempos aparecen en la tabla 30. La comparación entre ellos en la tabla 31 y en la gráfica 16.

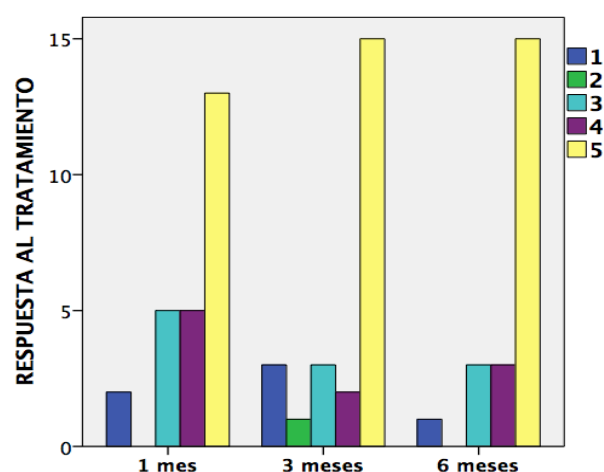
Tabla 30: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre respuesta al tratamiento en los pacientes del grupo CMG

SATISFACCIÓN		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	2	3	1	6
	PORCENTAJE	8,0%	12,5%	4,5%	8,5%
2	Nº ANIMALES	0	1	0	1
	PORCENTAJE	0,0%	4,2%	0,0%	1,4%
3	Nº ANIMALES	5	3	3	11
	PORCENTAJE	20,0%	12,5%	13,6%	15,5%
4	Nº ANIMALES	5	2	3	10
	PORCENTAJE	20,0%	8,3%	13,6%	14,1%
5	Nº ANIMALES	13	15	15	43
	PORCENTAJE	52,0%	62,5%	68,2%	60,6%
TOTAL	Nº ANIMALES	25	24	22	71
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 31: Estudio comparativo sobre la respuesta al tratamiento en los pacientes del grupo CMG

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	5,06a	8	0,75
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	5,31	8	0,72
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	0,76	1	0,38
N DE CASOS VÁLIDOS	71		

Gráfica 16: Respuesta al tratamiento en los pacientes del grupo CMG



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

Respecto a la respuesta de los animales frente al tratamiento, podemos observar, que ya desde fases iniciales del estudio los animales presentaban una respuesta muy favorable, alcanzando el mayor porcentaje de respuestas beneficiosas ya desde el primer mes de estudio y manteniéndose hasta los 6 meses.

Cuarta pregunta

En cuanto al grado que presentaba cada paciente en el momento de la revisión, los resultados se encuentran en la tabla 32. En la tabla 33 y en la gráfica 17 observamos los obtenidos de la comparación entre los tiempos.

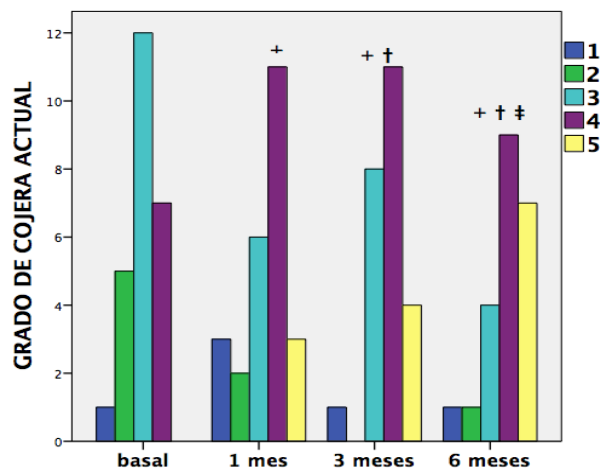
Tabla 32: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre grado de cojera actual de los pacientes del grupo CMG

SATISFACCIÓN		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	1	3	1	1	6
	PORCENTAJE	4,0%	12,0%	4,2%	4,5%	6,2%
2	Nº ANIMALES	5	2	0	1	8
	PORCENTAJE	20,0%	8,0%	0,0%	4,5%	8,3%
3	Nº ANIMALES	12	6	8	4	30
	PORCENTAJE	48,0%	24,0%	33,3%	18,2%	31,2%
4	Nº ANIMALES	7	11	11	9	38
	PORCENTAJE	28,0%	44,0%	45,8%	40,9%	39,6%
5	Nº ANIMALES	0	3	4	7	14
	PORCENTAJE	0,0%	12,0%	16,7%	31,8%	14,6%
TOTAL	Nº ANIMALES	25	25	24	22	96
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 33: Estudio comparativo sobre grado de cojera actual de los pacientes del grupo CMG

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	21,69	12	0,04
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	24,90	12	0,01
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	10,28	1	0,00
N DE CASOS VÁLIDOS	96		

Gráfica 17: Grado de cojera actual en los pacientes del grupo CMG



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

En la pregunta referente al grado de cojera de los animales, observamos que en basal, antes de la aplicación de las CMG la mayoría de animales se encuentra en la puntuación número 3, pero conforme avanza el estudio el grado de cojera de los animales va mejorando, alcanzando los mejores valores (puntuación 4 y 5) a los 6 meses de estudio donde observamos diferencias significativas con el resto de tiempos evaluados.

Quinta pregunta

En relación a la eficacia de los tratamiento empleados hasta el momento, los resultados se encuentran expresados en la tabla 34. La comparación entre los tiempos aparecen en la tabla 35 y en la gráfica 18.

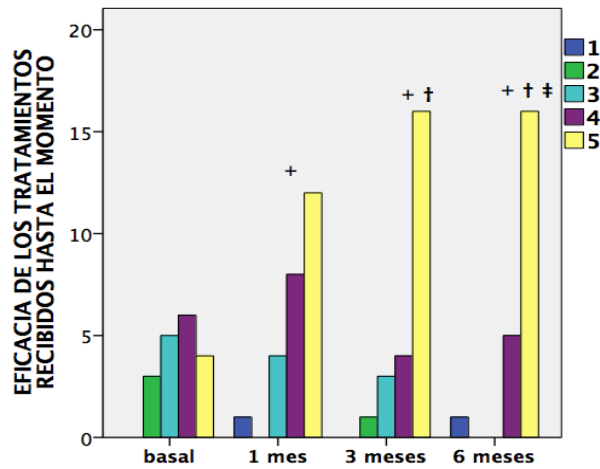
Tabla 34: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la eficacia de los tratamientos que hasta ese momento han llevado los pacientes del grupo CMG

SATISFACCIÓN		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	0	1	0	1	2
	PORCENTAJE	0,0%	4,0%	0,0%	4,5%	2,2%
2	Nº ANIMALES	3	0	1	0	4
	PORCENTAJE	16,7%	0,0%	4,2%	0,0%	4,5%
3	Nº ANIMALES	5	4	3	0	12
	PORCENTAJE	27,8%	16,0%	12,5%	0,0%	13,5%
4	Nº ANIMALES	6	8	4	5	23
	PORCENTAJE	33,3%	32,0%	16,7%	22,7%	25,8%
5	Nº ANIMALES	4	12	16	16	48
	PORCENTAJE	22,2%	48,0%	66,7%	72,7%	53,9%
TOTAL	Nº ANIMALES	18	25	24	22	89
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 35: Estudio comparativo sobre eficacia de los tratamientos que hasta ese momento han llevado los pacientes del grupo CMG

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	22,99	12	0,03
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	26,56	12	0,01
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	9,76	1	0,00
N DE CASOS VÁLIDOS	89		

Gráfica 18: Eficacia de los tratamientos recibidos hasta el momento en los pacientes del grupo CMG



* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Respecto a la eficacia de los tratamientos que hasta el momento han llevado los animales, observamos que en basal, antes de la aplicación de las CMG, las respuestas se encuentran repartidas en valores medios (3 y 4), obteniendo a los 6 meses post tratamiento el mayor porcentaje de animales en el valor más elevado (5), lo que nos indica que el tratamiento con CMG ha obtenido mejores resultados que el resto de tratamientos que hayan podido recibir los pacientes.

Sexta pregunta

En cuanto a la calidad de vida de los animales según el criterio del propietario, tenemos los resultados en las tablas 36 y 37 y en la gráfica 19.

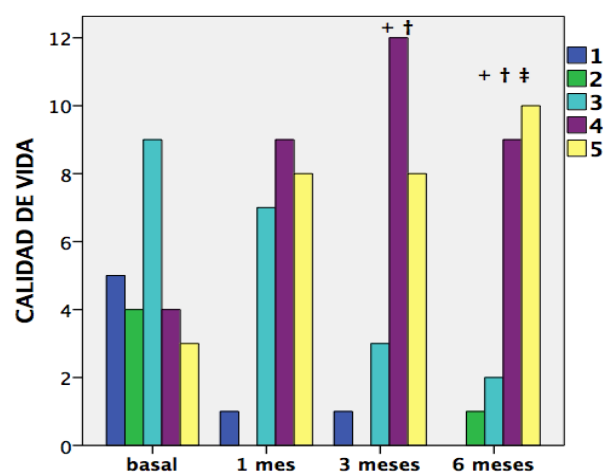
Tabla 36: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la calidad de vida en los pacientes del grupo CMG

SATISFACCIÓN		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	5	1	1	0	7
	PORCENTAJE	20,0%	4,0%	4,2%	0,0%	7,3%
2	Nº ANIMALES	4	0	0	1	5
	PORCENTAJE	16,0%	0,0%	0,0%	4,5%	5,2%
3	Nº ANIMALES	9	7	3	2	21
	PORCENTAJE	36,0%	28,0%	12,5%	9,1%	21,9%
4	Nº ANIMALES	4	9	12	9	34
	PORCENTAJE	16,0%	36,0%	50,0%	40,9%	35,4%
5	Nº ANIMALES	3	8	8	10	29
	PORCENTAJE	12,0%	32,0%	33,3%	45,5%	30,2%
TOTAL	Nº ANIMALES	25	25	24	22	96
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 37: Estudio comparativo sobre calidad de vida en los pacientes del grupo CMG

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	30,15	12	0,00
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	31,97	12	0,00
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	17,98	1	0,00
N DE CASOS VÁLIDOS	96		

Gráfica 19: Calidad de vida en los pacientes del grupo CMG



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

En cuanto a la calidad de vida de los pacientes, observamos que en basal, antes de la aplicación de las CMG, el mayor porcentaje de animales se encontraba en las puntuaciones más bajas (1, 2 y 3), es decir, los propietarios opinaban que sus mascotas tenían una calidad de vida media-baja. A los 6 meses post infiltración con CMG observamos que la gran mayoría de animales se encuentra en las puntuaciones 4 y 5, lo que nos indica que la calidad de vida de estos pacientes ha mejorado de manera considerable tras el tratamiento con CMG.

Analgesia de rescate

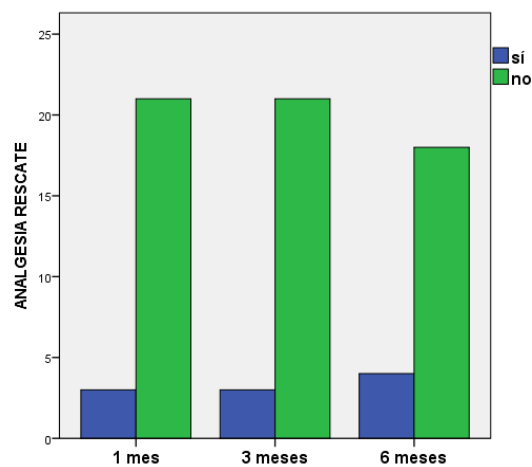
Si durante todo el tiempo que duró el estudio el propietario detectaba algún signo de dolor en el paciente, y siempre después de haber administrado el tratamiento post operatorio, podía administrar meloxicam al animal y registrarlo en un diario para luego informarnos.

En cuanto la utilización de meloxicam como analgésico de rescate durante el estudio, los resultados se encuentran en la tabla 38 y en la gráfica 20.

Tabla 38: Estudio comparativo entre tiempos de la analgesia de rescate en el grupo CMG

ANALGESIA DE RESCATE		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
SÍ	Nº ANIMALES	0	3	3	4
	PORCENTAJE	0,0%	30,0%	30,0%	40,0%
NO	Nº ANIMALES	25	22	22	21
	PORCENTAJE	27,8%	24,4%	24,4%	23,3%
TOTAL	Nº ANIMALES	25	25	25	25
	PORCENTAJE	25,0%	25,0%	25,0%	25,0%

Gráfica 20: Evolución de la analgesia de rescate de los pacientes del grupo CMG en el tiempo



* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Sólo 3 pacientes necesitaron emplear este fármaco tanto a los 3 como a los 6 meses, y no existieron diferencias con el primer mes de estudio.

Estudio Descriptivo y Comparativo del Factor Tiempo Grupo CMG+PRGF

En esta sección se van a exponer los datos obtenidos en el grupo CMG+PRGF. En primer lugar se describen los datos obtenidos en cada uno de los tiempos para las diferentes variables estudiadas y en segundo lugar se procede a la comparación de los mismos y a su exposición en forma de gráfica para poder evaluar de manera más sencilla los datos obtenidos.

Peso

En la tabla 39 se han representado los pesos medios obtenidos de cada paciente en cada evaluación. Además se han incorporado los valores medios y la desviación típica de cada uno de ellos.

Tabla 39: Evaluación del peso en los pacientes del grupo CMG+PRGF

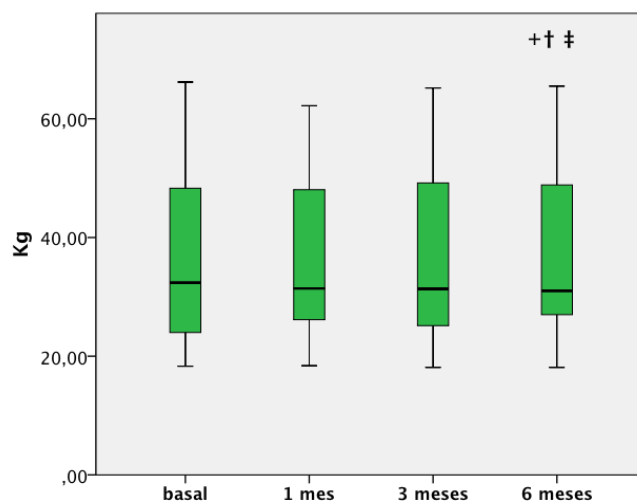
GRUPO CMG + PRGF	BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
1	18,30	19,00	20,00	20,00	19,33	0,83
3	31,30	31,40	31,20	30,00	30,98	0,66
4	39,10	39,10	43,00	42,50	40,93	2,12
5	24,00	27,15	26,50	27,60	26,31	1,61
6	35,00	36,00	37,00	40,00	37,00	2,16
7	26,00	27,15	26,80	27,00	26,74	0,51
10	18,30	18,40	18,10	18,10	18,23	0,15
11	52,00	50,60	52,00	54,00	52,15	1,40
12	24,00	22,60	23,50	22,60	23,18	0,69
13	31,00	29,00	29,50	30,30	29,95	0,88
14	48,00	48,10	48,30	48,85	48,31	0,38
15	23,00	25,15	25,15	23,30	24,15	1,16
16	51,00	40,50	50,00	51,00	48,13	5,11
17	23,00	23,50	23,00	30,00	24,88	3,42
18	48,60	52,80	49,20	-	50,20	2,27
20	57,40	54,00	54,20	-	55,20	1,91
21	45,00	48,00	51,00	55,60	49,90	4,52
22	66,20	62,20	65,20	65,50	64,78	1,77
23	56,20	53,80	-	54,80	54,93	1,21
24	29,20	29,00	31,20	31,00	30,10	1,16
25	43,20	43,80	41,00	42,00	42,50	1,25
46	32,40	28,00	31,50	34,40	31,58	2,67
47	22,00	22,20	21,60	22,85	22,16	0,52
TOTAL	36,70	36,15	36,32	36,73	36,47	13,35

Para comparar los valores del peso entre los diferentes tiempos de estudio, se ha realizado un estudio estadístico, en el que se ha visto que los pacientes han disminuido de peso a los 6 meses en comparación con el resto de revisiones (Tabla 40).

Tabla 40: Estudio comparativo entre tiempos del factor peso en el grupo CMG+PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	0,55	3,08	0,64	-0,78	1,89	0,86	22	0,397
BASAL-3MESES	-0,50	2,06	0,44	-1,41	0,42	-1,13	21	0,270
BASAL-6MESES	-1,58	3,03	0,66	-2,96	-0,20	-2,39	20	0,027
1MES-3MESES	-0,97	2,65	0,56	-2,14	0,21	-1,72	21	0,101
1MES-6MESES	-2,23	3,28	0,72	-3,72	-0,73	-3,11	20	0,005
3MESES-6MESES	-1,05	2,07	0,46	-2,02	-0,08	-2,28	19	0,035

Gráfica 21: Evolución del peso de los pacientes del grupo CMG+PRGF en el tiempo



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

Como podemos apreciar en la tabla 40 y en la gráfica 21, a los 6 meses de estudio, los pacientes de grupo CMG+PRGF, presentaban un peso significativamente menor en comparación con el resto de tiempos evaluados.

Estudio del grado de artrosis mediante la escala de Bioarth

Como ya hemos comentado anteriormente, el estudio del grado de artrosis, se llevó a cabo mediante la escala Bioarth para cada una de las articulaciones evaluadas. Esta escala consta de:

Evaluación Radiológica

En la tabla 41 se expresan los resultados obtenidos en frecuencia y porcentaje para cada tiempo de estudio en el grupo CMG+PRGF.

Tabla 41: Evaluación radiológica en los pacientes del grupo CMG+PRGF

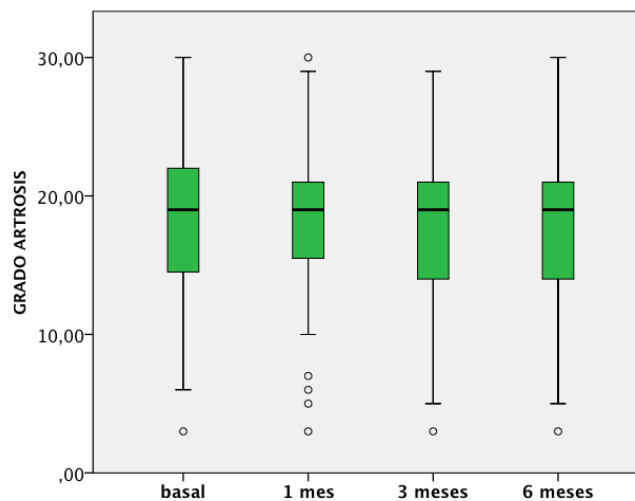
		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
ARTROSIS LEVE	Nº ANIMALES	4	4	4	4	16
	PORCENTAJE	17,4%	17,4%	18,2%	19,0%	18,0%
ARTROSIS MODERADA	Nº ANIMALES	2	2	2	2	8
	PORCENTAJE	8,7%	8,7%	9,1%	9,5%	9,0%
ARTROSIS SEVERA	Nº ANIMALES	17	17	16	15	65
	PORCENTAJE	73,9%	73,9%	72,7%	71,4%	73,0%
TOTAL	Nº ANIMALES	23	23	22	21	89
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

La comparación entre cada uno de los tiempos de estudio se llevo a cabo mediante la aplicación del coeficiente de contingencia, y se ha expresado en la tabla 42 y gráfica 22.

Tabla 42: Estudio comparativo entre tiempos del grado de artrosis en el grupo CMG+PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	0,04	0,82	0,17	-0,31	0,40	0,25	22	0,803
BASAL-3MESES	0,14	1,08	0,23	-0,34	0,62	0,59	21	0,561
BASAL-6MESES	-0,05	0,97	0,21	-0,49	0,40	-0,22	20	0,825
1MES-3MESES	0,09	0,53	0,11	-0,14	0,32	0,81	21	0,427
1MES-6MESES	-0,05	0,67	0,15	-0,35	0,26	-0,33	20	0,748
3MESES-6MESES	-0,15	0,49	0,11	-0,38	0,08	-1,37	19	0,186

Gráfica 22: Evolución del grado de artrosis de los pacientes del grupo CMG+PRGF en el tiempo



[†] Diferencias con basal. [‡] Diferencias con 1 mes. [§] Diferencias con 3 meses

En este parámetro no hubo ninguna diferencia significativa entre los distintos tiempos de estudio, de manera que el grado de artrosis evaluado radiológicamente se mantiene constante durante los 6 meses del estudio tras el tratamiento con CMG y PRGF.

Limitación funcional

La valoración de la limitación funcional según las preguntas contenidas en la escala de Bioarth se expresan a continuación en la tabla 43, como la media±DE (IC 95%).

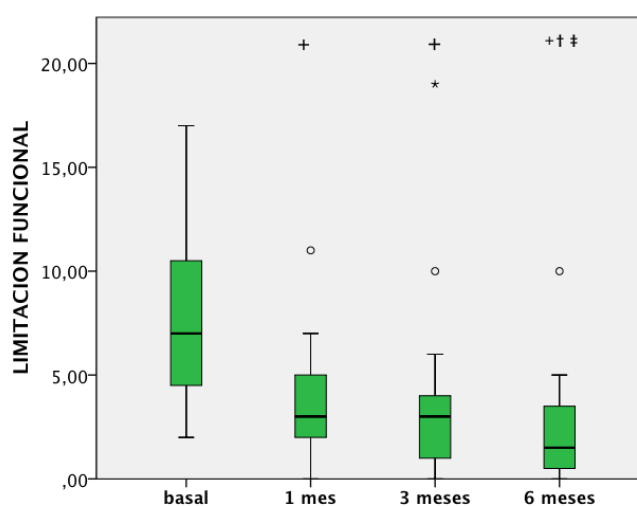
Tabla 43: Evaluación de la limitación funcional en los pacientes del grupo CMG+PRGF

	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
BASAL	23	7,70	4,43	5,78	9,61
1 MES	23	3,65	2,55	2,55	4,76
3 MESES	22	3,59	4,16	1,75	5,44
6 MESES	20	2,20	2,42	1,07	3,33
TOTAL	88	4,36	4,04	3,51	5,22

Los resultados obtenidos en cada uno de los tiempos de estudio se compararon entre sí y se exponen a continuación en forma de tabla (Tabla 44) y gráfica (Gráfica 23).

Tabla 44: Estudio comparativo entre tiempos de la limitación funcional en el grupo CMG+PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	4,04	3,99	0,83	2,32	5,77	4,86	22	<0,0001
BASAL-3MESES	4,18	4,00	0,85	2,41	5,95	4,91	21	<0,0001
BASAL-6MESES	5,20	4,31	0,96	3,18	7,22	5,39	19	<0,0001
1MES-3MESES	-0,05	3,58	0,76	-1,63	1,54	-0,06	21	0,953
1MES-6MESES	1,55	2,11	0,47	0,56	2,54	3,28	19	0,004
3MESES-6MESES	0,89	1,70	0,39	0,08	1,71	2,30	18	0,034

Gráfica 23: Evolución de la limitación funcional de los pacientes del grupo CMG+PRGF en el tiempo

⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

Este parámetro mejoró de una forma muy evidente ya desde el primer mes de estudio, observando los propietarios una mejoría clara en la calidad de vida de los pacientes, alcanzando a los 6 meses de estudios los valores de limitación funcional más bajos.

Movilidad articular

A continuación, en la tabla 45 aparecen expuestos de manera descriptiva los parámetros valorados de dentro del apartado movilidad articular entre los que se encuentran el rango de movimiento articular (grado de extensión y flexión) y la presencia de molestias o dolor durante la movilización pasiva de la extremidad.

Tabla 45: Evaluación de la movilidad articular en los pacientes del grupo CMG+PRGF

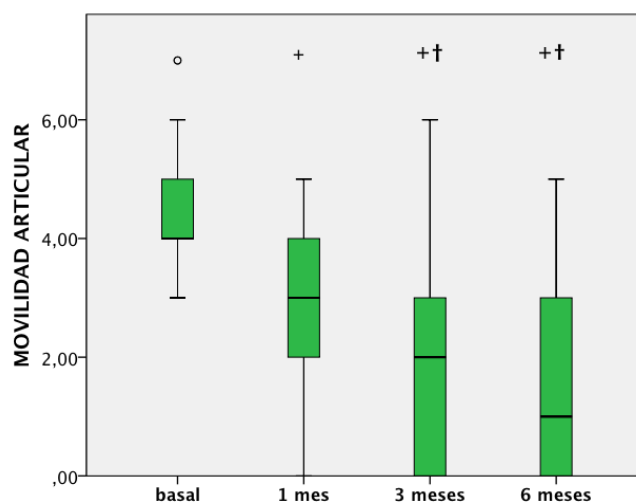
VARIABLE	TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
					LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
MOVILIDAD ARTICULAR	BASAL	23	4,61	1,08	4,14	5,07
	1 MES	23	2,78	1,48	2,14	3,42
	3 MESES	22	2,05	1,96	1,17	2,92
	6 MESES	21	1,62	1,77	0,81	2,43
	TOTAL	89	2,80	1,95	2,39	3,21
GRADO FLEXION	BASAL	23	63,48	8,63	59,75	67,21
	1 MES	23	55,04	4,87	52,94	57,15
	3 MESES	22	54,18	3,94	52,44	55,93
	6 MESES	21	52,90	3,91	51,12	54,68
	TOTAL	89	56,51	7,03	55,02	57,99
GRADO EXTENSION	BASAL	23	130,52	12,04	125,31	135,73
	1 MES	23	153,30	11,51	148,33	158,28
	3 MESES	22	154,73	15,14	148,01	161,44
	6 MESES	21	158,10	8,87	154,06	162,13
	TOTAL	89	148,90	16,25	145,48	152,32

Una vez obtenidos los datos de cada uno de los tiempos, se realizó la comparación entre los mismos, quedando reflejados en la tabla 46 y en la gráfica 24.

Tabla 46: Estudio comparativo entre tiempos de la movilidad articular en el grupo CMG+PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	1,83	1,27	0,26	1,28	2,37	6,91	22	<0,0001
BASAL-3MESES	2,50	1,44	0,31	1,86	3,14	8,15	21	<0,0001
BASAL-6MESES	2,90	1,48	0,32	2,23	3,58	8,99	20	<0,0001
1MES-3MESES	0,68	1,59	0,34	-0,02	1,38	2,02	21	0,057
1MES-6MESES	1,24	1,30	0,28	0,65	1,83	4,36	20	<0,0001
3MESES-6MESES	0,40	1,14	0,26	-0,13	0,93	1,57	19	0,134

Gráfica 24: Evolución de la movilidad articular de los pacientes del grupo CMG+PRGF en el tiempo



+ Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

En la movilidad articular existió una mejoría progresiva conforme avanzaba el estudio, obtenido resultados significativamente más favorables a los 3 y 6 meses de estudio en comparación con los resultados obtenidos en basal y a 1 mes del tratamiento.

Atrofia Muscular

Para valorar la atrofia muscular se evaluó por un lado el perímetro de la masa muscular en centímetros, y por otro, se categorizó la variable (0: sin atrofia, 1: atrofia leve, 2: atrofia severa). Los resultados se encuentran expuestos en las tablas 47 y 48.

Tabla 47: Evaluación del perímetro de la masa muscular en centímetros en los pacientes del grupo CMG+PRGF

TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	23	31,17	5,80	28,66	33,68
1 MES	23	32,30	5,37	29,98	34,63
3 MESES	22	32,14	4,98	29,93	34,34
6 MESES	21	32,90	5,26	30,51	35,30
TOTAL	89	32,11	5,31	30,99	33,23

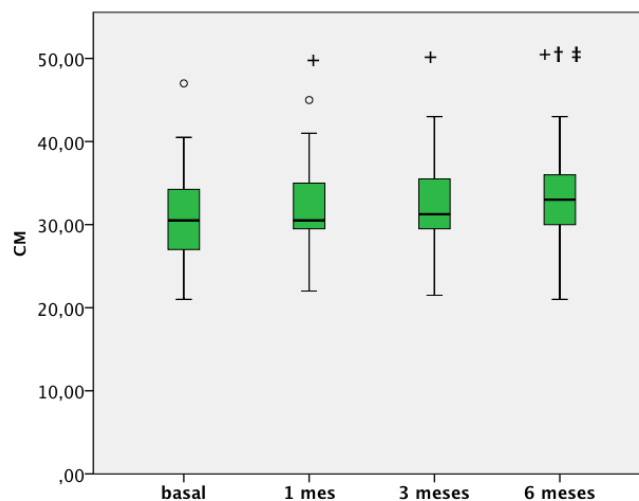
Tabla 48: Valoración de la atrofia muscular de forma categórica en los pacientes del grupo CMG+PRGF en todos los tiempos de evaluación

		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
SIN ATROFIA	Nº ANIMALES	3	4	4	11	22
	PORCENTAJE	13,0%	17,4%	18,2%	52,4%	24,7%
ATROFIA LEVE	Nº ANIMALES	14	15	15	9	53
	PORCENTAJE	60,9%	65,2%	68,2%	42,9%	59,6%
ATROFIA SEVERA	Nº ANIMALES	6	4	3	1	14
	PORCENTAJE	26,1%	17,4%	13,6%	4,8%	15,7%
TOTAL	Nº ANIMALES	23	23	22	21	89
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Una vez obtenidos los datos estadísticos se realizó la comparación de los mismos obteniendo los datos que se encuentran en la tabla 49 y en la gráfica 25.

Tabla 49: Estudio comparativo entre tiempos de la evolución del perímetro de masa muscular en centímetros en los pacientes del grupo CMG+PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C. INFERIOR SUPERIOR	T	GL	SIG
BASAL-1MES	-1,13	1,63	0,34	-1,83 -0,43	-3,34	22	0,003
BASAL-3MESES	-0,86	2,19	0,47	-1,84 0,11	-1,85	21	0,079
BASAL-6MESES	-1,90	2,32	0,51	-2,96 -0,85	-3,77	20	0,001
1MES-3MESES	0,27	1,29	0,27	-0,30 0,84	0,99	21	0,332
1MES-6MESES	-0,83	1,58	0,35	-1,55 -0,11	-2,41	20	0,026
3MESES-6MESES	-1,18	1,62	0,36	-1,93 -0,42	-3,25	19	0,004

Gráfica 25: Evolución del perímetro de la masa muscular en centímetros de los pacientes del grupo CMG+PRGF en el tiempo

⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

Como podemos ver en la tabla y gráfica anteriores existió un aumento de la masa muscular de estos pacientes en el primer mes de estudio, alcanzando el mayor perímetro muscular a los 6 meses post tratamiento.

Rango de movilidad

El rango de movilidad, como ya hemos comentado anteriormente, fue una variable calculada de restar el grado de flexión al grado de extensión de cada articulación. Los datos obtenidos en cada tiempo de estudio se reflejan a continuación en la tabla 50.

Tabla 50: Evaluación del rango de movilidad articular en los pacientes del grupo CMG+PRGF

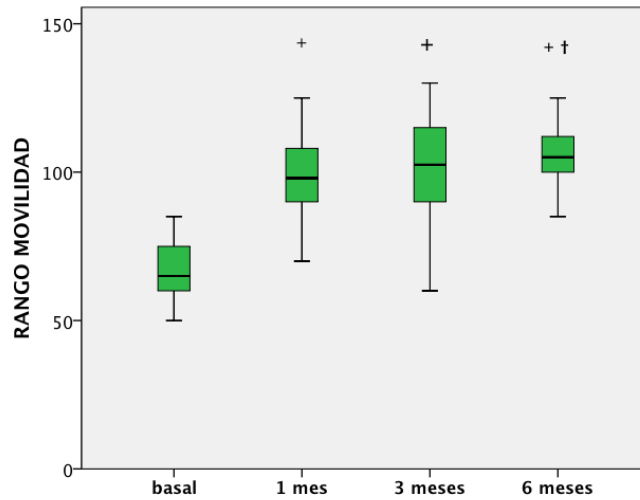
VARIABLE	TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
					LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
RANGO MOVILIDAD	BASAL	23	67,04	9,82	62,80	71,29
	1 MES	23	98,26	11,85	93,14	103,38
	3 MESES	22	100,55	15,90	93,50	107,59
	6 MESES	21	105,19	10,39	100,46	109,92
	TOTAL	89	92,39	19,41	88,31	96,48

En la comparación que se ha realizado entre los distintos tiempos de estudio, podemos observar en la tabla 51 y en la gráfica 26, cómo ha evolucionado el rango de movilidad de los pacientes.

Tabla 51: Estudio comparativo entre tiempos del rango de movilidad en los pacientes del grupo CMG+PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	-31,22	14,47	3,02	-37,48	-24,96	-10,35	22	<0,0001
BASAL-3MESES	-33,18	18,00	3,84	-41,16	-25,20	-8,65	21	<0,0001
BASAL-6MESES	-38,43	12,34	2,69	-44,05	-32,81	-14,27	20	<0,0001
1MES-3MESES	-2,14	13,27	2,83	-8,02	3,75	-0,76	21	0,458
1MES-6MESES	-7,67	12,52	2,73	-13,36	-1,97	-2,81	20	0,011
3MESES-6MESES	-3,95	12,33	2,76	-9,72	1,82	-1,43	19	0,168

Gráfica 26: Evolución del rango de movilidad de los pacientes del grupo CMG+PRGF en el tiempo



* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

En la anterior tabla y gráfica podemos ver como en el grupo CMG+PRGF existió un aumento progresivo del rango de movilidad de los animales, alcanzado los valores significativamente más favorables 6 meses después del tratamiento.

Evaluación del dolor

La percepción del dolor se ha valorado de forma doble, por un lado el propietario y por otro el veterinario investigador. Los datos obtenidos de cada uno de ellos aparecen reflejados de manera descriptiva en la tablas 52 y 53.

Propietario

Tabla 52: Evaluación de la VAS por parte del propietario en los pacientes del grupo CMG+PRGF

TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	23	32,81	17,18	25,38	40,24
1 MES	23	14,96	13,15	9,27	20,64
3 MESES	22	21,09	23,15	10,83	31,36
6 MESES	20	16,51	12,98	10,44	22,59
TOTAL	88	21,51	18,31	17,63	25,39

Veterinario

Tabla 53: Evaluación de la VAS por parte del veterinario en los pacientes del grupo CMG+PRGF

TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA %	
				LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	25	29,35	16,62	22,48	36,21
1 MES	25	17,79	14,25	11,90	23,67
3 MESES	24	13,08	9,21	9,19	16,96
6 MESES	22	11,27	7,43	7,97	14,56
TOTAL	96	18,12	14,30	15,23	21,02

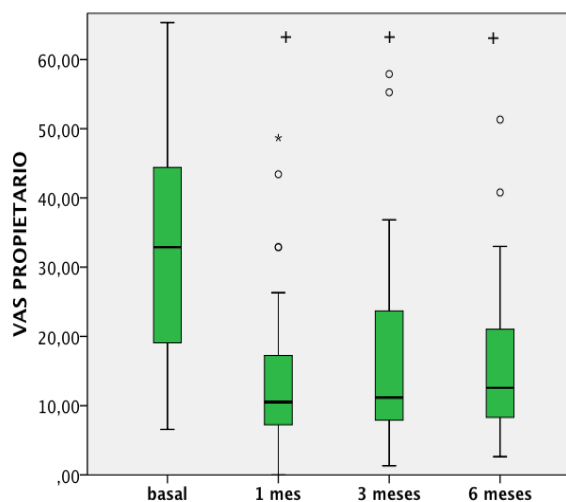
VAS propietario

La comparación de los resultados obtenidos en los diversos tiempos de estudio por parte del propietario aparecen en la tabla 54 y en la gráfica 27.

Tabla 54: Estudio comparativo entre tiempos de la VAS evaluada por parte del propietario en el grupo CMG+PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	17,85	20,37	4,25	9,05	26,66	4,20	22	<0,0001
BASAL-3MESES	11,27	22,20	4,73	1,43	21,12	2,38	21	0,027
BASAL-6MESES	15,35	21,32	4,77	5,37	25,33	3,22	19	0,005
1MES-3MESES	-7,43	25,38	5,41	-18,68	3,82	-1,37	21	0,184
1MES-6MESES	-2,12	17,35	3,88	-10,24	6,01	-0,55	19	0,592
3MESES-6MESES	2,00	14,28	3,28	-4,89	8,88	0,61	18	0,550

Gráfica 27: Evolución de la evaluación del dolor (VAS) por parte del propietario de los pacientes del grupo CMG+PRGF en el tiempo



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [#] Diferencias con 3 meses

Según los propietarios los pacientes que recibieron el tratamiento con CMG+PRGF presentaron una mejoría muy evidente en el primer mes de estudio, que se mantuvo constante durante el resto de los tiempos de estudio.

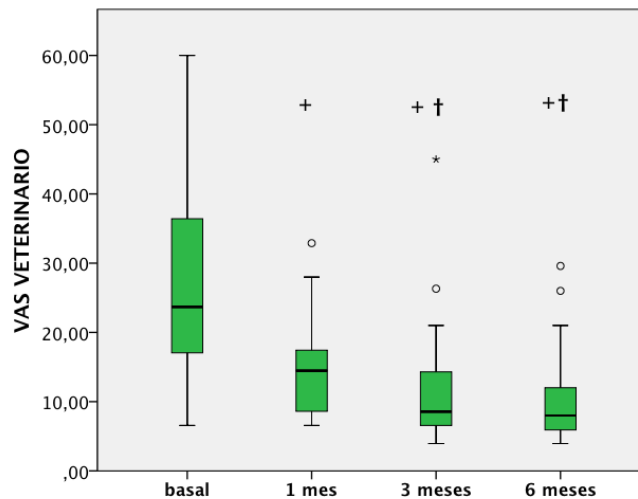
VAS veterinario

La comparación entre los tiempos de estudio de los resultados obtenidos en la valoración del dolor que presentaban los pacientes por parte del veterinario investigador aparecen reflejados en la tabla 55 y en la gráfica 28.

Tabla 55: Estudio comparativo entre tiempos de la VAS evaluada por parte del veterinario en el grupo CMG+PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	11,19	12,41	2,59	5,82	16,55	4,32	22	<0,0001
BASAL-3MESES	15,83	11,46	2,44	10,75	20,91	6,48	21	<0,0001
BASAL-6MESES	16,50	11,56	2,52	11,24	21,76	6,54	20	<0,0001
1MES-3MESES	4,66	6,98	1,49	1,57	7,75	3,13	21	0,005
1MES-6MESES	3,98	5,07	1,11	1,68	6,29	3,60	20	0,002
3MESES-6MESES	0,78	3,18	0,71	-0,71	2,27	1,10	19	0,287

Gráfica 28: Evolución de la evaluación del dolor (VAS) por parte del veterinario de los pacientes del grupo CMG+PRGF en el tiempo



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

El veterinario investigador, a diferencia de los propietarios, observó una mejoría progresiva hasta los 3 meses de estudio, que se mantuvo de manera similar hasta los 6 meses.

Valoración de la satisfacción del propietario

A continuación se detallan los resultados obtenidos de la satisfacción del propietario ante el tratamiento que ha recibido su mascota.

Primera pregunta

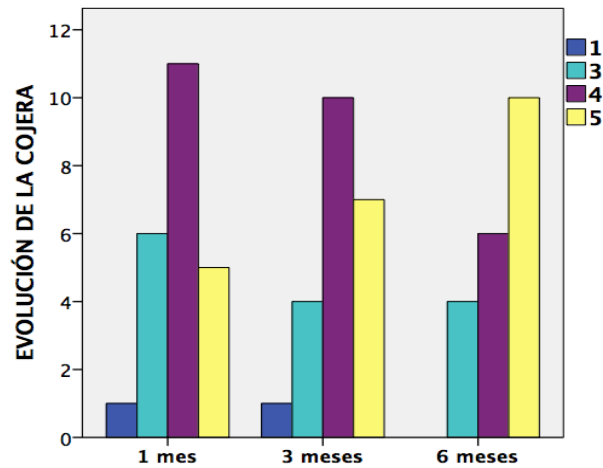
Los resultados obtenidos sobre la evolución de la cojera en los pacientes aparecen en la tabla 56. En cuanto a la comparación entre tiempos los resultados se exponen en la tabla 57 y en la gráfica 29.

Tabla 56: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la evolución de la cojera en los pacientes del grupo CMG+PRGF

SATISFACCIÓN		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	1	1	0	2
	PORCENTAJE	4,3%	4,5%	0,0%	3,1%
2	Nº ANIMALES	0	0	0	0
	PORCENTAJE	0%	0%	0%	0%
3	Nº ANIMALES	6	4	4	14
	PORCENTAJE	26,1%	18,2%	20,0%	21,5%
4	Nº ANIMALES	11	10	6	27
	PORCENTAJE	47,8%	45,5%	30,0%	41,5%
5	Nº ANIMALES	5	7	10	22
	PORCENTAJE	21,7%	31,8%	50,0%	33,8%
TOTAL	Nº ANIMALES	23	22	20	65
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 57: Estudio comparativo sobre la evolución de la cojera en los pacientes del grupo CMG+PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	4,75	6	0,58
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	5,33	6	0,50
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	2,82	1	0,09
N DE CASOS VÁLIDOS	65		

Gráfica 29: Evolución de la cojera en los pacientes del grupo CMG+PRGF

[‡] Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [#] Diferencias con 3 meses

Como hemos podido ver en la gráfica 29, en la pregunta respecto a la evolución de la cojera de la mascota, en el primer mes post tratamiento, el mayor porcentaje de animales se encuentra en la puntuación 4, la cual es una puntuación muy buena, aún así observamos que al finalizar el estudio, es decir, a los 6 meses post tratamiento, el mayor porcentaje de animales se encuentra en la puntuación 5, lo que nos indica que la cojera evoluciono de manera muy favorable, obteniendo los mejores resultados a los 6 meses de estudio, pero sin existir diferencias significativas entre 1, 3 y 6 meses de estudio.

Segunda pregunta

En la eficacia de los tratamientos los resultados están expuestos en las tablas 58 y 59, y se muestran gráficamente en la gráfica 30.

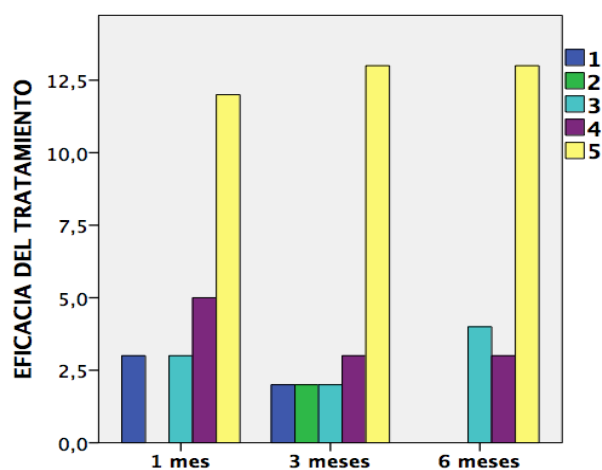
Tabla 58: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la eficacia al tratamiento en los pacientes del grupo CMG+PRGF

SATISFACCIÓN		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	3	2	0	5
	PORCENTAJE	13,0%	9,1%	0,0%	7,7%
2	Nº ANIMALES	0	2	0	2
	PORCENTAJE	0,0%	9,1%	0,0%	3,1%
3	Nº ANIMALES	3	2	4	9
	PORCENTAJE	13,0%	9,1%	20,0%	13,8%
4	Nº ANIMALES	5	3	3	11
	PORCENTAJE	21,7%	13,6%	15,0%	16,9%
5	Nº ANIMALES	12	13	13	38
	PORCENTAJE	52,2%	59,1%	65,0%	58,5%
TOTAL	Nº ANIMALES	23	22	20	65
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 59: Estudio comparativo sobre la eficacia al tratamiento en los pacientes del grupo CMG+PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	12,73	12	0,39
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	13,34	12	0,35
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	1,35	1	0,25
N DE CASOS VÁLIDOS	66		

Gráfica 30: Eficacia al tratamiento en los pacientes del grupo CMG+PRGF



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

En cuanto a la eficacia del tratamiento, observamos que ya desde el primer mes, la mayoría de animales se encuentra en la puntuación más elevada, manteniéndose con estos valores tan favorables hasta los 6 meses posteriores al tratamiento.

Tercera pregunta

En la respuesta al tratamiento administrado a los pacientes, los resultados obtenidos de la encuesta al propietario aparecen en la tabla 60. La evolución en el tiempo y su comparación están en la tabla 61 y en la gráfica 31.

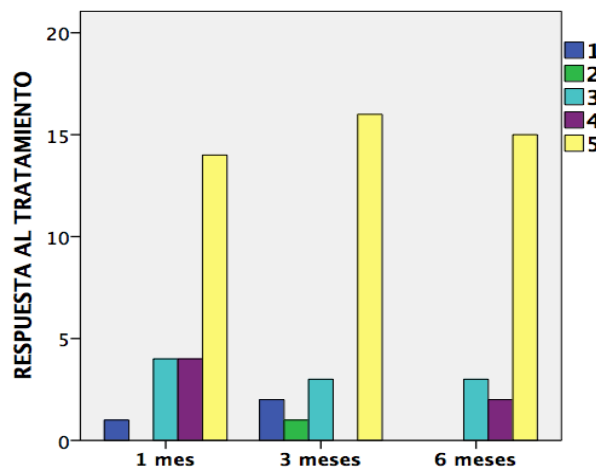
Tabla 60: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre respuesta al tratamiento en los pacientes del grupo CMG+PRGF

SATISFACCIÓN		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	1	2	0	3
	PORCENTAJE	4,3%	9,1%	0,0%	4,6%
2	Nº ANIMALES	0	1	0	1
	PORCENTAJE	0,0%	4,5%	0,0%	1,5%
3	Nº ANIMALES	4	3	3	10
	PORCENTAJE	17,4%	13,6%	15,0%	15,4%
4	Nº ANIMALES	4	0	2	6
	PORCENTAJE	17,4%	0,0%	10,0%	9,2%
5	Nº ANIMALES	14	16	15	45
	PORCENTAJE	60,9%	72,7%	75,0%	69,2%
TOTAL	Nº ANIMALES	23	22	20	65
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 61: Estudio comparativo sobre la respuesta al tratamiento en los pacientes del grupo CMG+PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	8,01	8	0,43
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	10,63	8	0,22
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	0,72	1	0,40
N DE CASOS VÁLIDOS	65		

Gráfica 31: Respuesta al tratamiento en los pacientes del grupo CMG+PRGF



* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Como podemos ver en la tabla anterior respecto a la respuesta de los animales frente al tratamiento, ya desde 1 mes de estudio los animales presentaban una respuesta muy favorable al tratamiento con CMG+PRGF, alcanzando el mayor porcentaje de respuestas beneficiosas a los 6 meses.

Cuarta pregunta

En las siguientes tablas y gráficas (Tabla 62, Tabla 63 y Gráfica 32), se muestra el grado de cojera que presentan los animales en cada uno de los tiempos evaluados.

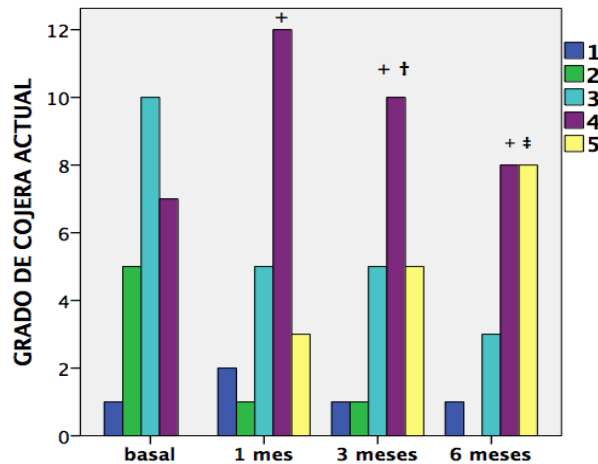
Tabla 62: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre grado de cojera actual de los pacientes del grupo CMG+PRGF

SATISFACCIÓN		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	1	2	1	1	5
	PORCENTAJE	4,3%	8,7%	4,5%	5,0%	5,7%
2	Nº ANIMALES	5	1	1	0	7
	PORCENTAJE	21,7%	4,3%	4,5%	0,0%	8,0%
3	Nº ANIMALES	10	5	5	3	23
	PORCENTAJE	43,5%	21,7%	22,7%	15,0%	26,1%
4	Nº ANIMALES	7	12	10	8	37
	PORCENTAJE	30,4%	52,2%	45,5%	40,0%	42,0%
5	Nº ANIMALES	0	3	5	8	16
	PORCENTAJE	0,0%	13,0%	22,7%	40,0%	18,2%
TOTAL	Nº ANIMALES	23	23	22	20	88
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 63: Estudio comparativo sobre grado de cojera actual de los pacientes del grupo CMG+PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	23,53	12	0,02
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	26,07	12	0,01
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	11,96	1	0,00
N DE CASOS VÁLIDOS	88		

Gráfica 32: Grado de cojera actual en los pacientes del grupo CMG+PRGF



* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Podemos observar que conforme avanza el estudio, las puntuaciones van mejorando de manera progresiva en cada una de la valoraciones, alcanzando las mejores puntuaciones a los 6 meses posteriores al tratamiento.

Quinta pregunta

En la tabla 64 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la eficacia de los tratamiento que los pacientes recibieron antes del estudio y en cada uno de los tiempos de evolución. Mientras que en la tabla 65 y en la gráfica 33 se comparan estos resultados en el tiempo.

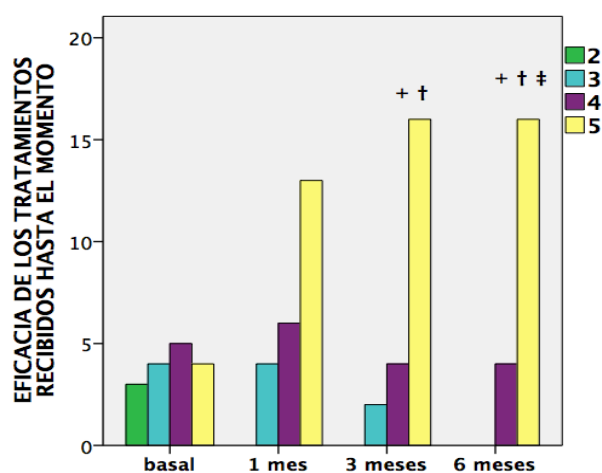
Tabla 64: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la eficacia de los tratamientos que hasta ese momento han llevado los pacientes del grupo CMG+PRGF

SATISFACCIÓN		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	0	0	0	0	0
	PORCENTAJE	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
2	Nº ANIMALES	3	0	0	0	3
	PORCENTAJE	18,8%	0,0%	0,0%	0,0%	3,7%
3	Nº ANIMALES	4	4	2	0	10
	PORCENTAJE	25,0%	17,4%	9,1%	0,0%	12,3%
4	Nº ANIMALES	5	6	4	4	19
	PORCENTAJE	31,2%	26,1%	18,2%	20,0%	23,5%
5	Nº ANIMALES	4	13	16	16	49
	PORCENTAJE	25,0%	56,5%	72,7%	80,0%	60,5%
TOTAL	Nº ANIMALES	16	23	22	20	81
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 65: Estudio comparativo sobre eficacia de los tratamientos que hasta ese momento han llevado los pacientes del grupo CMG+PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	23,43	9	0,01
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	23,73	9	0,01
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	16,74	1	0,00
N DE CASOS VÁLIDOS	81		

Gráfica 33: Eficacia de los tratamientos recibidos hasta el momento en los pacientes del grupo CMG+PRGF



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

En cuanto a la eficacia de los tratamientos que han llevado cada uno de los pacientes hasta el momento de la evaluación, observamos que conforme avanza el estudio, el mayor porcentaje de animales se encuentra en las valoraciones más altas, alcanzando las mejores puntuaciones al final del estudio, lo que nos indica que el tratamiento con CMG+PRGF tiene un efecto muy beneficioso en esta valoración.

Sexta pregunta

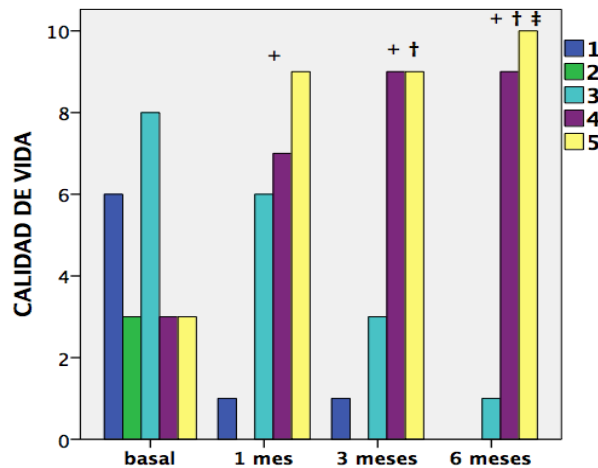
En las siguientes tablas y gráfica (Tablas 66 y 67 y Gráfica 34), se muestra la calidad de vida de los pacientes evaluados en el grupo CMG+PRGF, y la comparación en el tiempo de los valores obtenidos en cada uno de los tiempos de estudio.

Tabla 66: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la calidad de vida en los pacientes del grupo CMG+PRGF

SATISFACCIÓN		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	6	1	1	0	8
	PORCENTAJE	26,1%	4,3%	4,5%	0,0%	9,1%
2	Nº ANIMALES	3	0	0	0	3
	PORCENTAJE	13,0%	0,0%	0,0%	0,0%	3,4%
3	Nº ANIMALES	8	6	3	1	18
	PORCENTAJE	34,8%	26,1%	13,6%	5,0%	20,5%
4	Nº ANIMALES	3	7	9	9	28
	PORCENTAJE	13,0%	30,4%	40,9%	45,0%	31,8%
5	Nº ANIMALES	3	9	9	10	31
	PORCENTAJE	13,0%	39,1%	40,9%	50,0%	35,2%
TOTAL	Nº ANIMALES	23	23	22	20	88
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 67: Estudio comparativo sobre calidad de vida en los pacientes del grupo CMG+PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	33,15	12	0,00
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	34,42	12	0,00
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	20,61	1	0,00
N DE CASOS VÁLIDOS	88		

Gráfica 34: Calidad de vida en los pacientes del grupo CMG+PRGF

* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

La calidad de vida de los pacientes evaluados en el grupo CMG+PRGF mejora de manera progresiva desde el valor obtenido en basal, alcanzado las valoraciones más altas al final del estudio, lo que nos indica que el tratamiento con CMG+PRGF mejora de manera significativa la calidad de vida de nuestros pacientes.

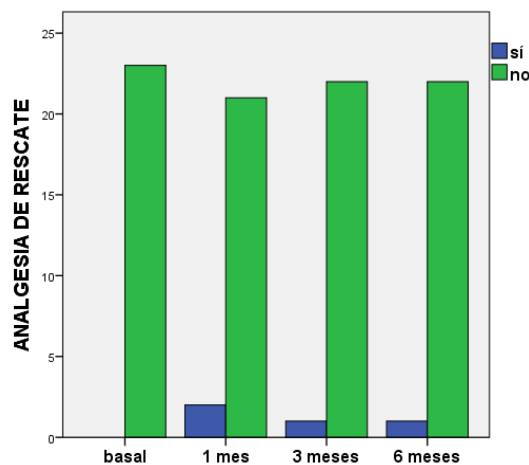
Analgesia de rescate

En cuanto a la necesidad de emplear el meloxicam como analgesia de rescate durante el estudio en el grupo CMG+PRGF, los resultados aparecen en la tabla 68 y en la gráfica 35.

Tabla 68: Estudio comparativo entre tiempos de la analgesia de rescate en el grupo CMG+PRGF

ANALGESIA DE RESCATE		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
SÍ	Nº ANIMALES	2	1	1	4
	PORCENTAJE	50,0%	25,0%	25,0%	100,0%
NO	Nº ANIMALES	21	22	22	88
	PORCENTAJE	23,9%	25,0%	25,0%	100,0%
TOTAL	Nº ANIMALES	23	23	23	92
	PORCENTAJE	25,0%	25,0%	25,0%	100,0%

Gráfica 35: Evolución de la analgesia de rescate de los pacientes del grupo CMG+PRGF en el tiempo



[†] Diferencias con basal. [‡] Diferencias con 1 mes. [#] Diferencias con 3 meses

Sólo 2 animales necesitaron analgesia al mes, 1 sólo a los tres y seis meses tras el tratamiento.

Estudio Descriptivo y Comparativo del Factor Tiempo Grupo PRGF

Peso

En la tabla 69 aparece la evolución del peso de cada uno de los pacientes pertenecientes al grupo PRGF a lo largo del estudio.

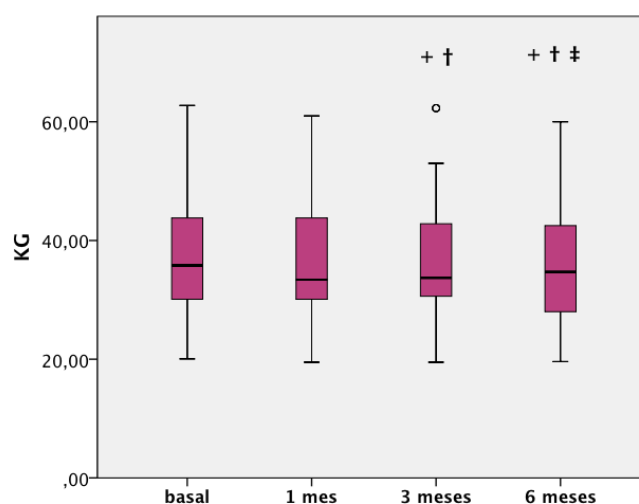
Tabla 69: Evaluación del peso en los pacientes del grupo PRGF

GRUPO PRGF	BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
26	35,80	30,00	30,60	28,00	31,10	3,08
28	24,50	24,00	24,30	24,00	24,20	0,23
29	37,00	36,00	34,70	34,20	35,48	1,17
30	32,50	30,80	31,10	30,70	31,28	0,77
33	30,10	29,15	28,50	24,00	27,94	2,42
34	31,50	30,20	30,90	30,40	30,75	0,54
35	43,80	44,50	43,30	42,50	43,53	0,75
36	55,00	53,00	53,00	52,90	53,48	0,91
37	29,30	30,60	32,25	32,10	31,06	1,26
38	36,50	37,60	36,60	35,50	36,55	0,79
39	44,20	43,10	42,35	41,90	42,89	0,93
40	31,40	31,10	30,60	34,70	31,95	1,72
41	37,80	38,50	38,00	39,60	38,48	0,75
42	20,05	19,50	19,50	19,60	19,66	0,24
43	62,75	61,00	62,30	60,00	61,51	1,12
44	33,00	33,40	33,70	34,80	33,73	0,71
45	28,50	29,90	29,00	27,00	28,60	1,12
48	36,00	39,00	39,40	40,35	38,69	1,74
49	32,30	32,50	32,60	-	32,47	0,14
TOTAL	37,80	37,31	37,27	36,79	37,30	11,04

Una vez desplegados los datos, se llevo a cabo un estudio comparativo entre cada uno de los tiempos de estudio, expuestos en la tabla 70 y gráfica 36.

Tabla 70: Estudio comparativo entre tiempos del factor peso en el grupo PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	0,49	1,72	0,25	-0,01	0,99	1,96	46	0,057
BASAL-3MESES	0,53	1,77	0,26	0,01	1,05	2,04	46	0,047
BASAL-6MESES	1,26	2,99	0,45	0,36	2,16	2,82	44	0,007
1MES-3MESES	0,04	0,86	0,13	-0,22	0,29	0,30	46	0,768
1MES-6MESES	0,74	2,06	0,31	0,12	1,36	2,40	44	0,021
3MESES-6MESES	0,69	1,86	0,28	0,14	1,25	2,51	44	0,016

Gráfica 36: Evolución del peso de los pacientes del grupo PRGF en el tiempo

⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

Como se aprecia en los resultados anteriormente expuestos, existieron diferencias significativas entre los 6 meses y el resto de tiempos de estudio evaluados, indicándonos que a los 6 meses de estudio los animales del grupo PRGF presentaban un peso mayor.

Estudio del grado de artrosis mediante la escala de Bioarth

La evaluación del grado de artrosis realizada mediante la escala de Bioarth para cada una de las articulaciones afectadas se muestra en los resultado expuestos a continuación:

Evaluación Radiológica

En la tabla 71 se presentan de manera descriptiva los valores obtenidos en la evaluación radiológica en cada uno de los tiempos de estudio, expuestos a modo de frecuencia de datos y de porcentaje.

Tabla 71: Evaluación radiológica en los pacientes del grupo PRGF

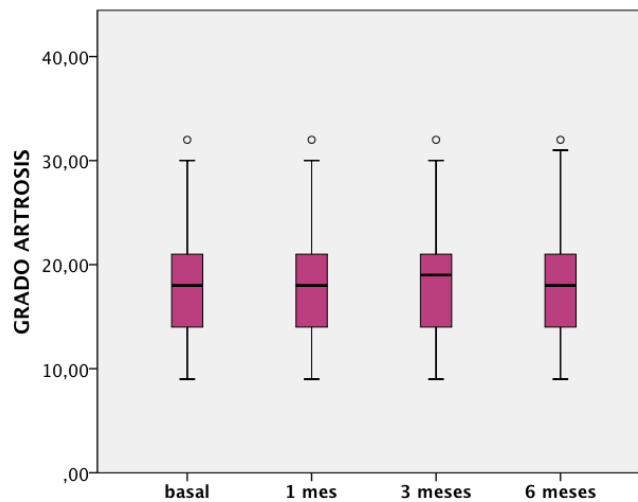
		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
ARTROSIS LEVE	Nº ANIMALES	0	0	0	0	0
	PORCENTAJE	0%	0%	0%	0%	0%
ARTROSIS MODERADA	Nº ANIMALES	15	15	15	15	60
	PORCENTAJE	31,9%	31,9%	31,9%	33,3%	32,3%
ARTROSIS SEVERA	Nº ANIMALES	32	32	32	30	126
	PORCENTAJE	68,1%	68,1%	68,1%	66,7%	67,7%
TOTAL	Nº ANIMALES	47	47	47	45	186
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Una vez presentados los datos de manera descriptiva, se llevo a cabo un estudio comparativo entre los distintos tiempos de estudio mediante la aplicación del coeficiente de contingencia (Tabla 72 y Gráfica 37).

Tabla 72: Estudio comparativo entre tiempos del grado de artrosis en el grupo PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	-0,06	0,32	0,05	-0,16	0,03	-1,35	46	0,183
BASAL-3MESES	-0,09	0,35	0,05	-0,19	0,02	-1,66	46	0,103
BASAL-6MESES	-0,22	1,06	0,16	-0,54	0,10	-1,40	44	0,168
1MES-3MESES	-0,02	0,15	0,02	-0,06	0,02	-1,00	46	0,323
1MES-6MESES	-0,16	1,07	0,16	-0,48	0,16	-0,98	44	0,333
3MESES-6MESES	-0,13	1,06	0,16	-0,45	0,18	-0,85	44	0,402

Gráfica 37: Evolución del grado de artrosis de los pacientes del grupo PRGF en el tiempo



[†] Diferencias con basal. [‡] Diferencias con 1 mes. [§] Diferencias con 3 meses

Como podemos apreciar en la tabla 72 y en la gráfica 37, no existen diferencias en el grado de artrosis medido con la escala de Bioarth, de manera que este parámetro se ha mantenido constante durante los 6 meses del estudio.

Limitación funcional

En la tabla 73 se exponen los datos correspondientes a la limitación funcional en todos los tiempos de estudio para el grupo PRGF.

Tabla 73: Evaluación de la limitación funcional en los pacientes del grupo PRGF

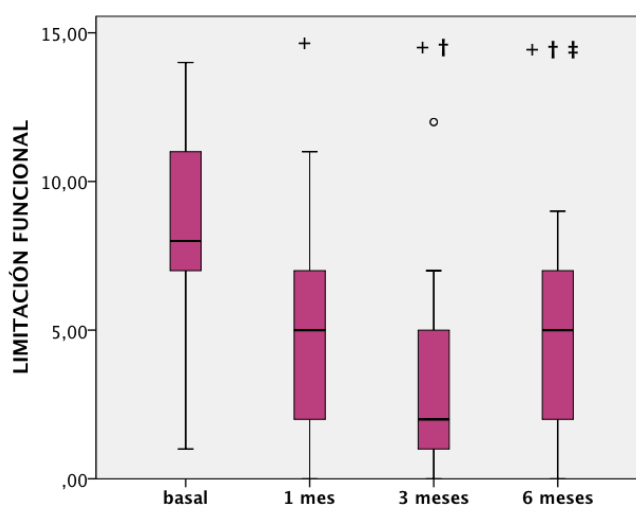
	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
BASAL	47	8,45	3,36	7,46	9,43
1 MES	47	5,13	3,13	4,21	6,05
3 MESES	47	3,38	2,93	2,52	4,24
6 MESES	45	4,42	2,85	3,57	5,28
TOTAL	186	5,35	3,60	4,83	5,88

A continuación, en la tabla 74 y gráfica 38 se muestran los resultados obtenidos de comparar los valores de cada uno de los tiempos de estudio para poder analizar la evolución de la limitación funcional en el tiempo.

Tabla 74: Estudio comparativo entre tiempos de la limitación funcional en el grupo PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	3,32	2,87	0,42	2,48	4,16	7,92	46	<0,0001
BASAL-3MESES	5,06	2,91	0,43	4,21	5,92	11,91	46	<0,0001
BASAL-6MESES	3,78	3,76	0,56	2,65	4,91	6,74	44	<0,0001
1MES-3MESES	1,74	2,75	0,40	0,94	2,55	4,36	46	<0,0001
1MES-6MESES	0,67	3,36	0,50	-0,34	1,68	1,33	44	0,191
3MESES-6MESES	-1,11	3,16	0,47	-2,06	-0,16	-2,36	44	0,023

Gráfica 38: Evolución de la limitación funcional de los pacientes del grupo PRGF en el tiempo



* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Tras la comparación entre los diversos tiempos podemos observar, tanto en la tabla 60 como en la gráfica 38, una mejoría evidente de este parámetro hasta los 3 meses habiendo un ligero aumento de la misma a los 6 meses de estudio.

Movilidad articular

En la tabla 75 se expresan los datos obtenidos para la movilidad articular en el grupo PRGF a través de la evaluación del rango de movimiento articular y la presencia dolor durante la realización del estudio.

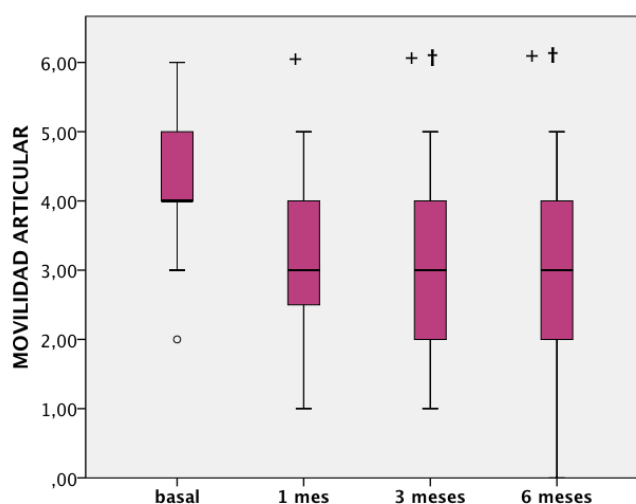
Tabla 75: Evaluación de la movilidad articular en los pacientes del grupo PRGF

VARIABLE	TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
					LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
MOVILIDAD ARTICULAR	BASAL	47	4,09	0,83	3,84	4,33
	1 MES	47	3,19	0,95	2,91	3,47
	3 MESES	47	2,87	1,06	2,56	3,18
	6 MESES	45	2,89	1,13	2,55	3,23
	TOTAL	186	3,26	1,11	3,10	3,42
GRADO FLEXIÓN	BASAL	47	60,91	5,09	59,42	62,41
	1 MES	47	56,23	3,07	55,33	57,14
	3 MESES	47	54,13	3,27	53,17	55,09
	6 MESES	45	55,22	4,64	53,83	56,62
	TOTAL	186	56,64	4,83	55,94	57,34
GRADO EXTENSIÓN	BASAL	47	139,72	11,07	136,47	142,97
	1 MES	47	145,74	11,19	142,46	149,03
	3 MESES	47	149,23	10,79	146,06	152,40
	6 MESES	45	149,78	11,28	146,39	153,17
	TOTAL	186	146,08	11,70	144,39	147,77

Se ha realizado la comparación de estos parámetros en los diferentes tiempos de estudio quedando reflejados en la tabla 76 y gráfica 39.

Tabla 76: Estudio comparativo entre tiempos de la movilidad articular en el grupo PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	0,91	0,88	0,13	0,66	1,17	7,12	46	<0,0001
BASAL-3MESES	1,23	1,11	0,16	0,91	1,56	7,64	46	<0,0001
BASAL-6MESES	1,22	1,28	0,19	0,84	1,61	6,42	44	<0,0001
1MES-3MESES	0,32	0,91	0,13	0,05	0,59	2,40	46	0,020
1MES-6MESES	0,27	1,12	0,17	-0,07	0,60	1,60	44	0,116
3MESES-6MESES	-0,07	0,75	0,11	-0,29	0,16	-0,60	44	0,554

Gráfica 39: Evolución de la movilidad articular de los pacientes del grupo PRGF en el tiempo

⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

Como podemos observar en la gráfica 39 existe una mayor movilidad articular en los pacientes con diferencias entre todos los tiempos con basal, sin embargo no han existido diferencias entre 1 y 6 meses ni entre 3 y 6 manteniéndose en estos casos la mejoría.

Atrofia muscular

Como ya se ha comentado con anterioridad, la atrofia muscular se midió de forma categórica (sin atrofia, atrofia leve, atrofia severa) y de forma continua con los centímetros del perímetro de la musculatura en unos puntos anatómicos determinados. Los datos obtenidos en cada uno de los tiempos se encuentran reflejados en las tablas 77 y 78.

Tabla 77: Evaluación del perímetro de la masa muscular en centímetros en los pacientes del grupo PRGF

		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
SIN ATROFIA	Nº ANIMALES	6	8	10	12	36
	PORCENTAJE	12,8%	17,0%	21,3%	26,7%	19,4%
ATROFIA LEVE	Nº ANIMALES	34	32	32	25	123
	PORCENTAJE	72,3%	68,1%	68,1%	55,6%	66,1%
ATROFIA SEVERA	Nº ANIMALES	7	7	5	8	27
	PORCENTAJE	14,9%	14,9%	10,6%	17,8%	14,5%
TOTAL	Nº ANIMALES	47	47	47	45	186
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

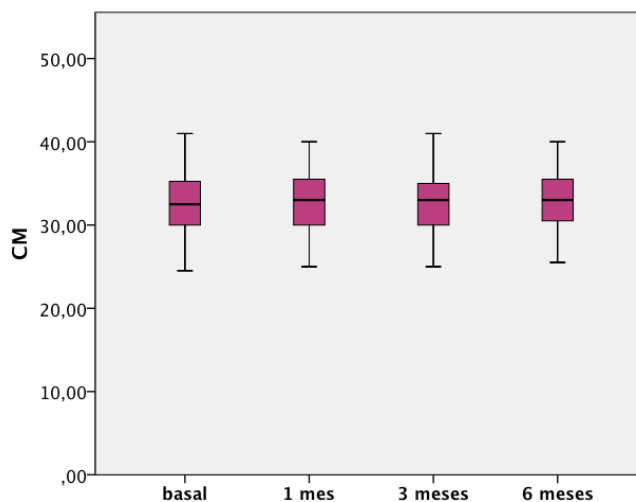
Tabla 78: Valoración de la atrofia muscular de forma categórica en los pacientes del grupo PRGF en todos los tiempos de evaluación

TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	47	32,64	3,69	31,55	33,72
1 MES	47	32,78	3,71	31,69	33,87
3 MESES	47	32,67	3,79	31,55	33,78
6 MESES	45	32,66	3,84	31,50	33,81
TOTAL	186	32,68	3,73	32,15	33,22

Una vez obtenidos los datos se compararon entre cada uno de los tiempos para evaluar las posibles diferencias. Los datos de estos estudios estadísticos aparecen en la tabla 79 y en la gráfica 40.

Tabla 79: Estudio comparativo entre tiempos de la evolución del perímetro de masa muscular en centímetros en los pacientes del grupo PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	-0,14	0,93	0,14	-0,41	0,13	-1,02	46	0,311
BASAL-3MESES	-0,03	1,09	0,16	-0,35	0,29	-0,17	46	0,863
BASAL-6MESES	0,16	1,60	0,24	-0,32	0,64	0,65	44	0,517
1MES-3MESES	0,11	0,85	0,12	-0,14	0,36	0,89	46	0,376
1MES-6MESES	0,30	1,51	0,22	-0,15	0,75	1,34	44	0,188
3MESES-6MESES	0,18	1,36	0,20	-0,22	0,59	0,91	44	0,366

Gráfica 40: Evolución del perímetro de la masa muscular en centímetros de los pacientes del grupo PRGF en el tiempo

* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

En el diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio perímetro muscular, no existieron diferencias significativas entre ninguno de los tiempos de estudio en el grupo PRGF.

Rango de movilidad

A continuación, en la tabla 80 se exponen de manera descriptiva los datos obtenidos del rango de movilidad en cada uno de los tiempos de estudio para el grupo PRGF.

Tabla 80: Evaluación del rango de movilidad articular en los pacientes del grupo PRGF

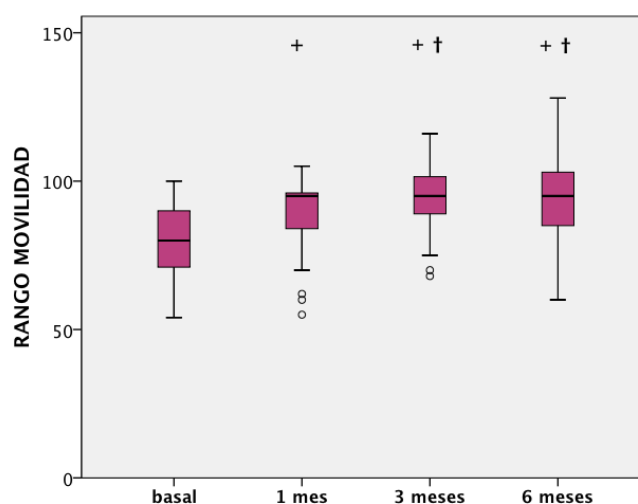
VARIABLE	TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
					LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
RANGO MOVILIDAD	BASAL	47	78,81	12,71	75,08	82,54
	1 MES	47	89,51	11,85	86,03	92,99
	3 MESES	47	95,11	11,50	91,73	98,48
	6 MESES	45	94,56	14,33	90,25	98,86
	TOTAL	186	89,44	14,14	87,39	91,49

La comparación del rango de movilidad entre los distintos tiempo de estudio para el grupo PRGF aparece expuesto en la tabla 81 y en la gráfica 41.

Tabla 81: Estudio comparativo entre tiempos del rango de movilidad en los pacientes del grupo PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	-10,70	9,94	1,45	-13,62	-7,78	-7,38	46	<0,0001
BASAL-3MESES	-16,30	11,01	1,61	-19,53	-13,06	-10,15	46	<0,0001
BASAL-6MESES	-14,80	13,36	1,99	-18,82	-10,79	-7,43	44	<0,0001
1MES-3MESES	-5,60	7,32	1,07	-7,75	-3,45	-5,24	46	<0,0001
1MES-6MESES	-4,11	10,58	1,58	-7,29	-0,93	-2,61	44	0,012
3MESES-6MESES	1,49	9,79	1,46	-1,45	4,43	1,02	44	0,313

Gráfica 41: Evolución del rango de movilidad de los pacientes del grupo PRGF en el tiempo



+ Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Como se observa en los resultados anteriores ha existido una mejoría notable en el rango de movimiento articular de estos pacientes con diferencias en todos los tiempos con basal y mejorando con respecto al mes de evolución, sin embargo esta mejoría se mantiene estable a partir de los 3 meses.

Evaluación del dolor

Al igual que en los grupos anteriores este parámetro fue evaluado tanto por parte del propietario, como por parte del veterinario investigador.

Los resultados expresados por el propietario aparecen en la tabla 82, mientras que los obtenidos por el veterinario aparecen en la tabla 83.

Propietario

Tabla 82: Evaluación de la vas por parte del propietario en los pacientes del grupo PRGF

	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95% LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	47	43,45	22,15	36,94	49,95
1 MES	47	28,33	15,81	23,69	32,97
3 MESES	47	26,90	18,55	21,45	32,35
6 MESES	45	24,16	15,02	19,65	28,67
TOTAL	186	30,78	19,50	27,96	33,60

Veterinario

Tabla 83: Evaluación de la vas por parte del veterinario en los pacientes del grupo PRGF

	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95% LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	47	33,44	11,06	30,19	36,68
1 MES	47	26,85	9,19	24,15	29,55
3 MESES	47	24,12	8,91	21,50	26,73
6 MESES	45	26,17	9,35	23,36	28,98
TOTAL	186	27,66	10,21	26,18	29,14

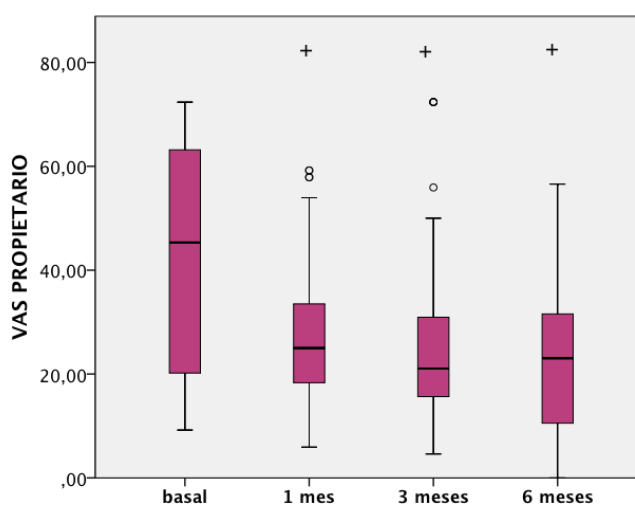
VAS propietario

La comparación en el tiempo de los resultados obtenidos por parte del propietario para este parámetro, aparecen reflejados en la tabla 84 y en la gráfica 42.

Tabla 84: Estudio comparativo entre tiempos de la vas evaluada por parte del propietario en el grupo PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	15,11	14,81	2,16	10,76	19,46	6,99	46	<0,0001
BASAL-3MESES	16,55	17,45	2,55	11,42	21,67	6,50	46	<0,0001
BASAL-6MESES	19,24	22,88	3,41	12,36	26,11	5,64	44	<0,0001
1MES-3MESES	1,43	11,43	1,67	-1,92	4,79	0,86	46	0,395
1MES-6MESES	4,38	20,90	3,12	-1,90	10,66	1,41	44	0,167
3MESES-6MESES	3,21	23,78	3,54	-3,93	10,36	0,91	44	0,369

Gráfica 42: Evolución de la evaluación del dolor (VAS) por parte del propietario de los pacientes del grupo PRGF en el tiempo



+ Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Como se aprecia en la gráfica 42 existió una mejoría del dolor desde el primer mes de la aplicación del tratamiento, manteniéndose constante hasta finalizar el estudio.

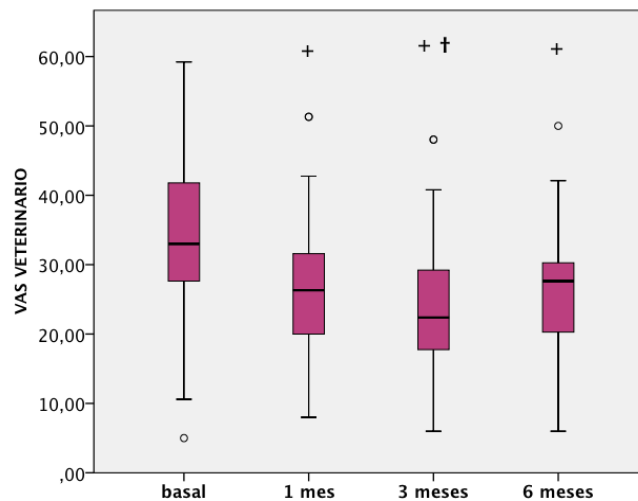
VAS veterinario

En cuanto a la percepción del dolor por parte del veterinario investigador, las comparaciones se encuentran expresadas en la tabla 85 y en la gráfica 43.

Tabla 85: Estudio comparativo entre tiempos de la vas evaluada por parte del veterinario en el grupo PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	7,69	6,37	0,93	5,82	9,57	8,28	46	<0,0001
BASAL-3MESES	10,44	6,93	1,01	8,41	12,48	10,34	46	<0,0001
BASAL-6MESES	7,94	9,92	1,48	4,96	10,92	5,37	44	<0,0001
1MES-3MESES	2,75	2,27	0,33	2,08	3,42	8,29	46	<0,0001
1MES-6MESES	0,78	8,20	1,22	-1,69	3,24	0,64	44	0,528
3MESES-6MESES	-1,86	8,69	1,29	-4,47	0,75	-1,44	44	0,158

Gráfica 43: Evolución de la evaluación del dolor (VAS) por parte del veterinario de los pacientes del grupo PRGF en el tiempo



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

El veterinario investigador apreció al igual que los propietarios una clara mejoría desde el primer mes de estudio, pero a los 6 meses comenzaba a empeorar de nuevo este parámetro en el grupo PRGF, aunque manteniéndose siempre mejor que en basal.

Valoración de la satisfacción del propietario

A continuación observamos la valoración de la satisfacción de los propietarios del grupo PRGF en base a las preguntas que les realizamos en cada una de las revisiones.

Primera pregunta

En la tabla 86 y 87, y en la gráfica 44 observamos la evolución de la cojera en los animales del grupo PRGF a lo largo del estudio, y la comparación en cada uno de los tiempos valorados.

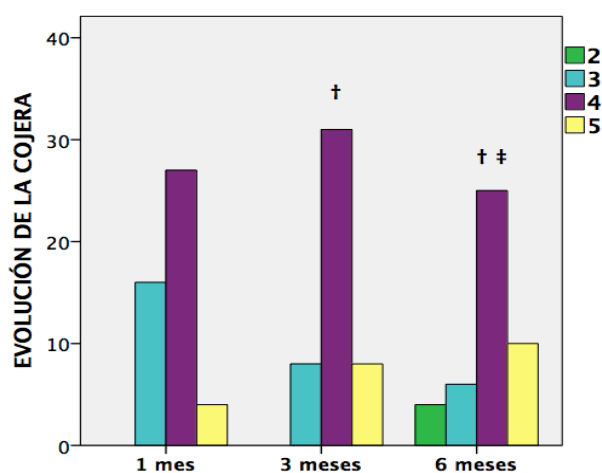
Tabla 86: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la evolución de la cojera en los pacientes del grupo PRGF

SATISFACCIÓN		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	0	0	0	0
	PORCENTAJE	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
2	Nº ANIMALES	0	0	4	4
	PORCENTAJE	0,0%	0,0%	8,9%	2,9%
3	Nº ANIMALES	16	8	6	30
	PORCENTAJE	34,0%	17,0%	13,3%	21,6%
4	Nº ANIMALES	27	31	25	83
	PORCENTAJE	57,4%	66,0%	55,6%	59,7%
5	Nº ANIMALES	4	8	10	22
	PORCENTAJE	8,5%	17,0%	22,2%	15,8%
TOTAL	Nº ANIMALES	47	47	45	139
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 87: Estudio comparativo sobre la evolución de la cojera en los pacientes del grupo PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	16,88	6	0,01
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	17,49	6	0,01
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	1,37	1	0,24
N DE CASOS VÁLIDOS	139		

Gráfica 44: Evolución de la cojera en los pacientes del grupo PRGF



† Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

En los resultados obtenidos en la pregunta sobre la evolución de la cojera de la mascota, ya desde el primer mes post tratamiento observamos un elevado porcentaje de animales en las puntuaciones más elevadas. Estos valores se mantienen en estas puntuaciones durante todo el estudio, pero se observan diferencias significativas a los 3 y a los 6 meses en comparación con los resultados obtenidos en basal.

Segunda pregunta

En cuanto a las respuestas por parte de los propietarios del grupo PRGF sobre la eficacia del tratamiento en los tiempos evaluados, observamos los resultados obtenidos, y la comparación de los mismos en las tablas 88 y 89, y en la gráfica 45.

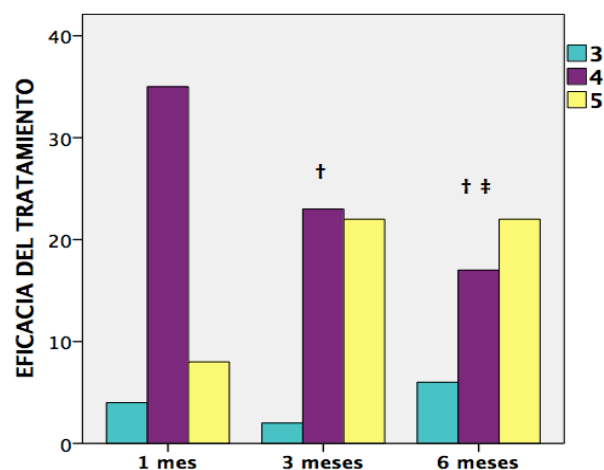
Tabla 88: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la eficacia al tratamiento en los pacientes del grupo PRGF

SATISFACCIÓN		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	0	0	0	0
	PORCENTAJE	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
2	Nº ANIMALES	0	0	0	0
	PORCENTAJE	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
3	Nº ANIMALES	4	2	6	12
	PORCENTAJE	8,5%	4,3%	13,3%	8,6%
4	Nº ANIMALES	35	23	17	75
	PORCENTAJE	74,5%	48,9%	37,8%	54,0%
5	Nº ANIMALES	8	22	22	52
	PORCENTAJE	17,0%	46,8%	48,9%	37,4%
TOTAL	Nº ANIMALES	47	47	45	139
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 89: Estudio comparativo sobre la eficacia al tratamiento en los pacientes del grupo PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	16,18	4	0,00
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	17,25	4	0,00
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	4,52	1	0,03
N DE CASOS VÁLIDOS	139		

Gráfica 45: Eficacia al tratamiento en los pacientes del grupo PRGF



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

Como podemos ver en las respuestas obtenidas sobre la eficacia al tratamiento, ya en el primer mes observamos un mayor porcentaje de animales en la valoración número 4, alcanzando tanto a los 3 meses los porcentajes más elevados en la mayor puntuación (5). A los 6 meses estos resultados tan positivos disminuyen significativamente en comparación con los 3 meses, pero se mantienen más elevados que al mes de estudio.

Tercera pregunta

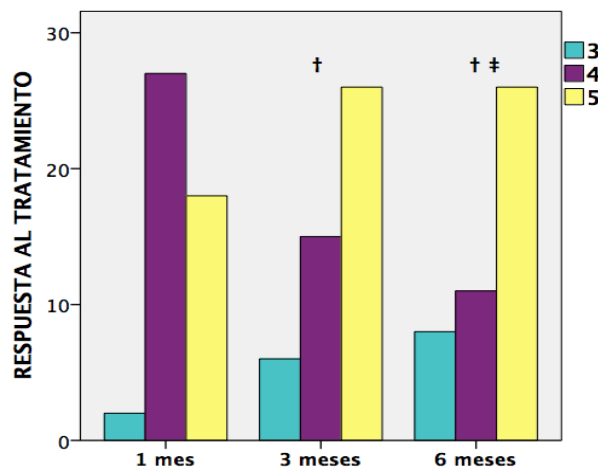
El análisis de las contestaciones de los propietarios correspondientes la cuestión sobre la respuesta al tratamiento por parte de los pacientes del grupo PRGF, se encuentra a continuación en la tabla 90 y 91, y en la gráfica 46.

Tabla 90: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre respuesta al tratamiento en los pacientes del grupo PRGF

SATISFACCIÓN		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	0	0	0	0
	PORCENTAJE	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
2	Nº ANIMALES	0	0	0	0
	PORCENTAJE	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
3	Nº ANIMALES	2	6	8	16
	PORCENTAJE	4,3%	12,8%	17,8%	11,5%
4	Nº ANIMALES	27	15	11	53
	PORCENTAJE	57,4%	31,9%	24,4%	38,1%
5	Nº ANIMALES	18	26	26	70
	PORCENTAJE	38,3%	55,3%	57,8%	50,4%
TOTAL	Nº ANIMALES	47	47	45	139
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 91: Estudio comparativo sobre la respuesta al tratamiento en los pacientes del grupo PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	13,11	4	0,01
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	13,40	4	0,01
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	0,18	1	0,67
N DE CASOS VÁLIDOS	139		

Gráfica 46: Respuesta al tratamiento en los pacientes del grupo PRGF

* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Respecto a la respuesta de los animales frente al tratamiento, podemos observar en la tabla 74, que ya desde fases iniciales del estudio los animales presentaban una respuesta muy favorable al tratamiento con PRGF, alcanzando el mayor porcentaje de respuestas beneficiosas a los 3 meses de estudio, disminuyendo ligeramente los valores obtenidos a los 6 meses en comparación con los 3 meses.

Cuarta pregunta

En la tabla 92 y 93, y en la gráfica 47, se muestra las respuestas de los propietarios del grupo PRGF a la cuestión sobre el grado de cojera actual que padecen sus mascotas.

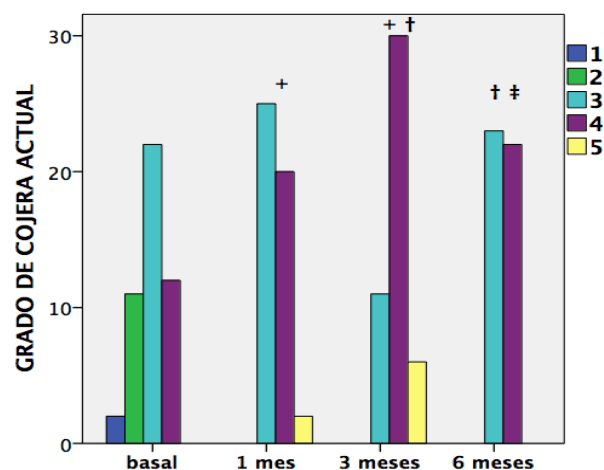
Tabla 92: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre grado de cojera actual de los pacientes del grupo PRGF

SATISFACCIÓN		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	2	0	0	0	2
	PORCENTAJE	4,3%	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
2	Nº ANIMALES	11	0	0	0	11
	PORCENTAJE	23,4%	0,0%	0,0%	0,0%	5,9%
3	Nº ANIMALES	22	25	11	23	81
	PORCENTAJE	46,8%	53,2%	23,4%	51,1%	43,5%
4	Nº ANIMALES	12	20	30	22	84
	PORCENTAJE	25,5%	42,6%	63,8%	48,9%	45,2%
5	Nº ANIMALES	0	2	6	0	8
	PORCENTAJE	0,0%	4,3%	12,8%	0,0%	4,3%
TOTAL	Nº ANIMALES	47	47	47	45	186
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 93: Estudio comparativo sobre grado de cojera actual de los pacientes del grupo PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	64,17	12	0,00
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	63,84	12	0,00
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	19,13	1	0,00
N DE CASOS VÁLIDOS	186		

Gráfica 47: Grado de cojera actual en los pacientes del grupo PRGF



+ Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Como podemos ver en los datos obtenidos sobre el grado de cojera de los animales del grupo PRGF, observamos que al inicio del estudio encontramos un mayor porcentaje de animales en valores más bajos, pero conforme avanza el estudio, estos porcentajes van mejorando, obteniendo los resultados significativamente más favorables a los 3 meses de estudio en comparación con los restantes tiempos evaluados.

Quinta pregunta

La respuesta sobre la eficacia del tratamiento aplicado en los pacientes del grupo PRGF y la comparación entre cada uno de los tiempos estudiados, se muestra a continuación en las tablas 94 y 95, y en la gráfica 48.

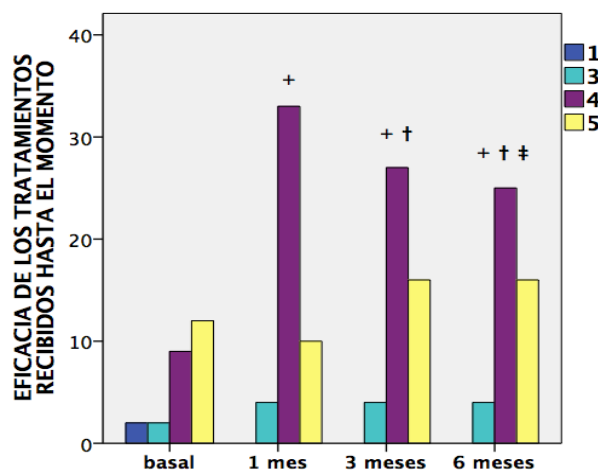
Tabla 94: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la eficacia de los tratamientos que hasta ese momento han llevado los pacientes del grupo PRGF

SATISFACCIÓN		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	2	0	0	0	2
	PORCENTAJE	8,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,2%
2	Nº ANIMALES	0	0	0	0	0
	PORCENTAJE	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
3	Nº ANIMALES	2	4	4	4	14
	PORCENTAJE	8,0%	8,5%	8,5%	8,9%	8,5%
4	Nº ANIMALES	9	33	27	25	94
	PORCENTAJE	36,0%	70,2%	57,4%	55,6%	57,3%
5	Nº ANIMALES	12	10	16	16	54
	PORCENTAJE	48,0%	21,3%	34,0%	35,6%	32,9%
TOTAL	Nº ANIMALES	25	47	47	45	164
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 95: Estudio comparativo sobre eficacia de los tratamientos que hasta ese momento han llevado los pacientes del grupo PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	18,28	9	0,03
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	14,96	9	0,09
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	0,91	1	0,34
N DE CASOS VÁLIDOS	164		

Gráfica 48: Eficacia de los tratamientos recibidos hasta el momento en los pacientes del grupo PRGF



* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

En este grupo, observamos que desde el inicio del estudio los propietarios están satisfechos con los tratamientos que hasta el momento han llevado los animales, mejorando este grado de satisfacción hasta los 6 meses posteriores al tratamiento.

Sexta pregunta

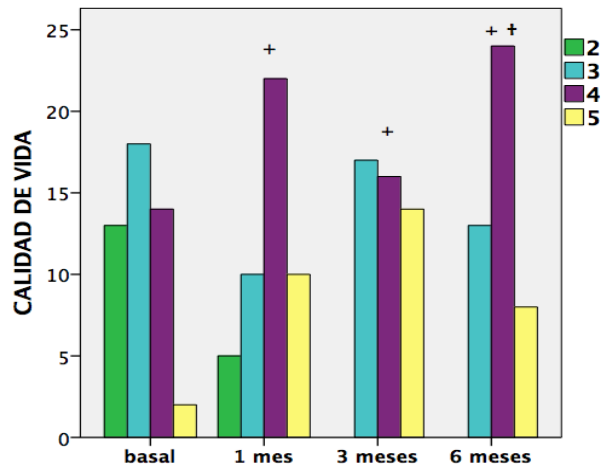
Los resultados descriptivos y la comparación entre cada unos de los tiempos de estudio obtenidos para la variable calidad de vida de los pacientes, se detallan a continuación en las tablas 96 y 97, y en la gráfica 49.

Tabla 96: Respuesta de los propietarios a la pregunta sobre la calidad de vida en los pacientes del grupo PRGF

SATISFACCIÓN		BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
1	Nº ANIMALES	0	0	0	0	0
	PORCENTAJE	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
2	Nº ANIMALES	13	5	0	0	18
	PORCENTAJE	27,7%	10,6%	0,0%	0,0%	9,7%
3	Nº ANIMALES	18	10	17	13	58
	PORCENTAJE	38,3%	21,3%	36,2%	28,9%	31,2%
4	Nº ANIMALES	14	22	16	24	76
	PORCENTAJE	29,8%	46,8%	34,0%	53,3%	40,9%
5	Nº ANIMALES	2	10	14	8	34
	PORCENTAJE	4,3%	21,3%	29,8%	17,8%	18,3%
TOTAL	Nº ANIMALES	47	47	47	45	186
	PORCENTAJE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 97: Estudio comparativo sobre calidad de vida en los pacientes del grupo PRGF

	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	40,11	9	0,00
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	45,57	9	0,00
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	18,69	1	0,00
N DE CASOS VÁLIDOS	186		

Gráfica 49: Calidad de vida en los pacientes del grupo PRGF

⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [‡] Diferencias con 3 meses

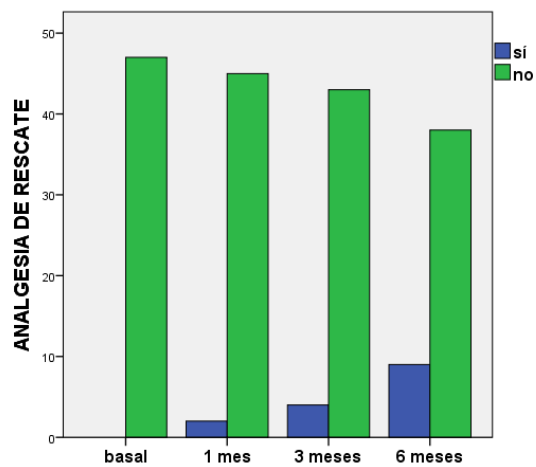
En la respuesta sobre la calidad de vida de los animales, observamos que en basal, los resultados se encuentran repartidos entre las puntuaciones más bajas, mientras que conforme avanza el estudio, estas puntuaciones van aumentando, obteniendo los mejores resultados a los 6 meses de estudio.

Analgesia de rescate

En cuanto a la necesidad de utilizar analgesia de rescate durante el estudio, los resultados están en la tabla 98 y en la gráfica 50.

Tabla 98: Estudio comparativo entre tiempos de la analgesia de rescate en el grupo PRGF

ANALGESIA DE RESCATE		1 MES	3 MESES	6 MESES	TOTAL
SÍ	Nº ANIMALES	2	4	9	15
	PORCENTAJE	13,3%	26,7%	60,0%	100,0%
NO	Nº ANIMALES	45	43	38	173
	PORCENTAJE	26,0%	24,9%	22,0%	100,0%
TOTAL	Nº ANIMALES	47	47	47	188
	PORCENTAJE	25,0%	25,0%	25,0%	100,0%

Gráfica 50: Evolución de la analgesia de rescate de los pacientes del grupo PRGF en el tiempo

⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [#] Diferencias con 3 meses

En este grupo 2 animales necesitaron tomar meloxicam al primer mes de evolución, 4 a los 3 meses y 9 a los 6 meses, aunque no se presentaron diferencias entre tiempos.

Estudio Comparativo del Factor Tratamiento

Para evaluar las diferencias que existieron entre cada uno de los grupos en todos los tiempos de estudio se realizó un estudio comparativo entre ellos con el test no paramétrico de la Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes.

A continuación, en forma de tabla, aparecen los resultados obtenidos en cada una de las variables en los 3 grupos y en los cuatro tiempos de estudio. En las gráficas se valoran las diferencias entre los grupos para cada uno de los tiempos.

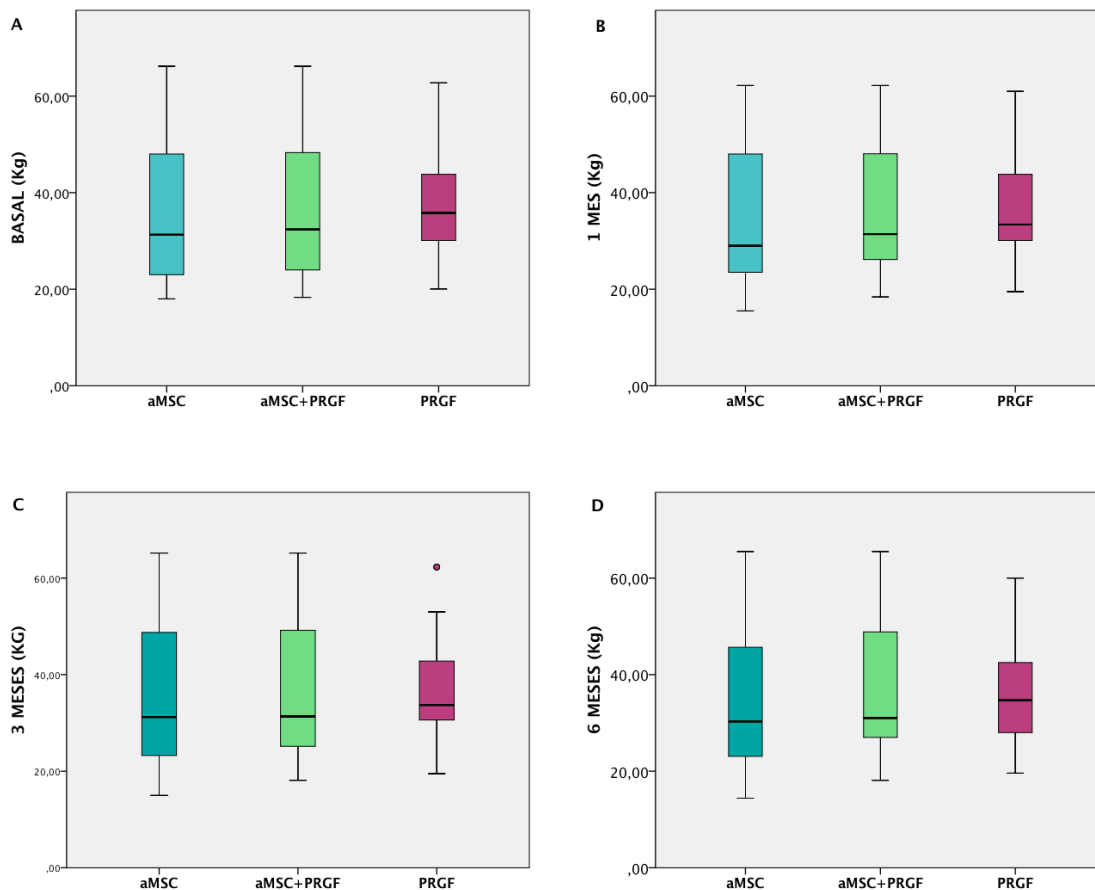
Peso

Lo primero en comparar fueron los pesos para ver la correlación existente entre los pacientes de los 3 grupos. En la tabla 99 aparecen los pesos de los pacientes y las diferencias entre grupos (Gráfica 51).

Tabla 99: Comparación entre grupos del peso de los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA		SIG
					95%		
					LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	25	35,49	14,15	29,65	41,33	0,458
	CMG+PRGF	23	36,70	14,06	30,62	42,78	
	PRGF	47	37,80	11,28	34,49	41,11	
	Total	95	36,93	12,67	34,35	39,51	
1 MES	CMG	25	34,76	13,47	29,20	40,33	0,330
	CMG+PRGF	23	36,15	13,12	30,48	41,82	
	PRGF	47	37,31	10,90	34,11	40,51	
	Total	95	36,36	12,08	33,90	38,82	
3 MESES	CMG	24	34,83	13,80	29,00	40,65	0,483
	CMG+PRGF	22	36,32	13,40	30,38	42,26	
	PRGF	47	37,27	11,04	34,03	40,52	
	Total	93	36,42	12,27	33,89	38,94	
6 MESES	CMG	23	35,05	14,24	28,89	41,21	0,586
	CMG+PRGF	21	36,73	13,75	30,48	42,99	
	PRGF	45	36,79	11,27	33,40	40,17	
	Total	89	36,33	12,56	33,68	38,97	

Gráfica 51: Comparación entre grupos del peso en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

Como observamos en las gráficas anteriores, no existieron diferencias entre grupos en la variable peso en ninguno de los tiempos de estudio evaluados.

Estudio del grado de artrosis mediante la escala Bioarth

Para la evaluación del grado de artrosis mediante la escala Bioarth, se realizó un estudio comparativo entre los diversos tiempos de los parámetros detallados a continuación:

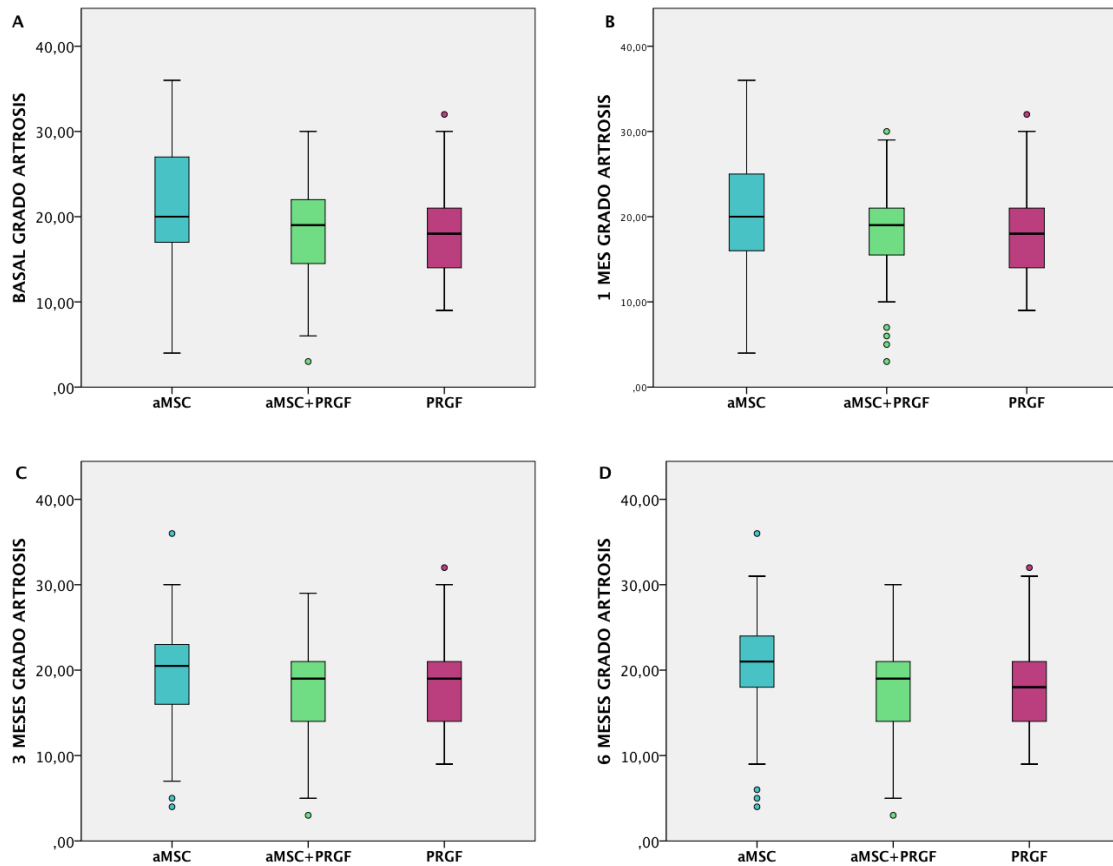
Evaluación Radiológica

En la tabla 100 y en la gráfica 52 se exponen los datos obtenidos de la evaluación radiológica comparando cada uno de los tres grupos de estudio en cada uno de los tiempos valorados.

Tabla 100: Comparación entre grupos del grado de artrosis de los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA		SIG
					95% LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	25	20,16	8,27	16,75	23,57	
	CMG+PRGF	23	18,13	7,87	14,73	21,53	0,525
	PRGF	47	18,15	5,57	16,51	19,78	
	Total	95	18,67	6,92	17,26	20,08	
1 MES	CMG	25	20,04	8,11	16,69	23,39	
	CMG+PRGF	23	18,09	7,75	14,74	21,44	0,498
	PRGF	47	18,21	5,49	16,60	19,82	
	Total	95	18,66	6,80	17,28	20,05	
3 MESES	CMG	24	19,67	7,93	16,32	23,02	
	CMG+PRGF	22	17,45	7,34	14,20	20,71	0,505
	PRGF	47	18,23	5,49	16,62	19,85	
	Total	93	18,42	6,61	17,06	19,78	
6 MESES	CMG	23	20,04	8,15	16,52	23,57	
	CMG+PRGF	21	17,71	7,73	14,19	21,23	0,455
	PRGF	45	18,24	5,87	16,48	20,01	
	Total	89	18,58	6,94	17,12	20,05	

Gráfica 52: Comparación entre grupos del grado de artrosis en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



En los resultados obtenidos sobre la valoración radiológica no existieron diferencias entre grupos en ninguno de los tiempos de estudio, indicándonos que el grado de artrosis de los animales en los tres grupos fue el mismo durante todo el estudio.

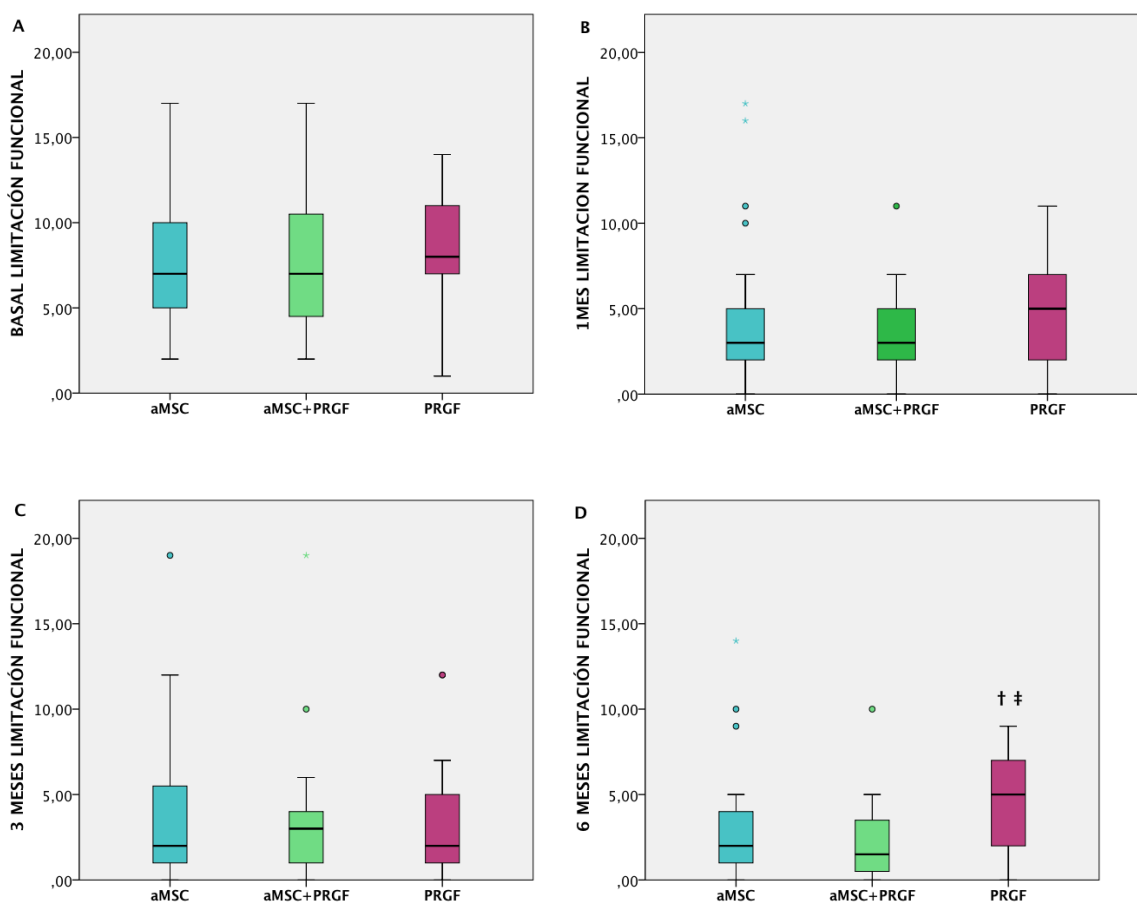
Limitación funcional

A continuación en la tabla 101 y en la gráfica 53, se exponen los datos obtenidos sobre la limitación funcional en los 3 grupos de estudio para ver la correlación existente entre ellos en cada uno de los tiempos evaluados.

Tabla 101: Comparación entre grupos de la limitación funcional de los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA		SIG
					95%		
					LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	25	7,76	4,26	6,00	9,52	0,370
	CMG+PRGF	23	7,70	4,43	5,78	9,61	
	PRGF	47	8,45	3,36	7,46	9,43	
	Total	95	8,08	3,86	7,30	8,87	
1 MES	CMG	25	4,52	4,54	2,65	6,39	0,118
	CMG+PRGF	23	3,65	2,55	2,55	4,76	
	PRGF	47	5,13	3,13	4,21	6,05	
	Total	95	4,61	3,46	3,91	5,31	
3 MESES	CMG	24	3,92	4,63	1,96	5,87	0,955
	CMG+PRGF	22	3,59	4,16	1,75	5,44	
	PRGF	47	3,38	2,93	2,52	4,24	
	Total	93	3,57	3,70	2,81	4,33	
6 MESES	CMG	22	3,09	3,62	1,48	4,70	0,005
	CMG+PRGF	20	2,20	2,42	1,07	3,33	
	PRGF	45	4,42	2,85	3,57	5,28	
	Total	87	3,57	3,09	2,92	4,23	

Gráfica 53: Comparación entre grupos de la limitación funcional en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

En los resultados obtenidos, observamos que tanto a tiempo basal, como uno y tres meses tras la aplicación de los diversos tratamientos, no existieron diferencias entre ninguno de los grupos, pero a los 6 meses de estudio, el grupo tratado con PRGF obtuvo peor puntuación en este parámetro, obteniendo diferencias significativas con los grupos tratados con CMG y CMG+PRGF.

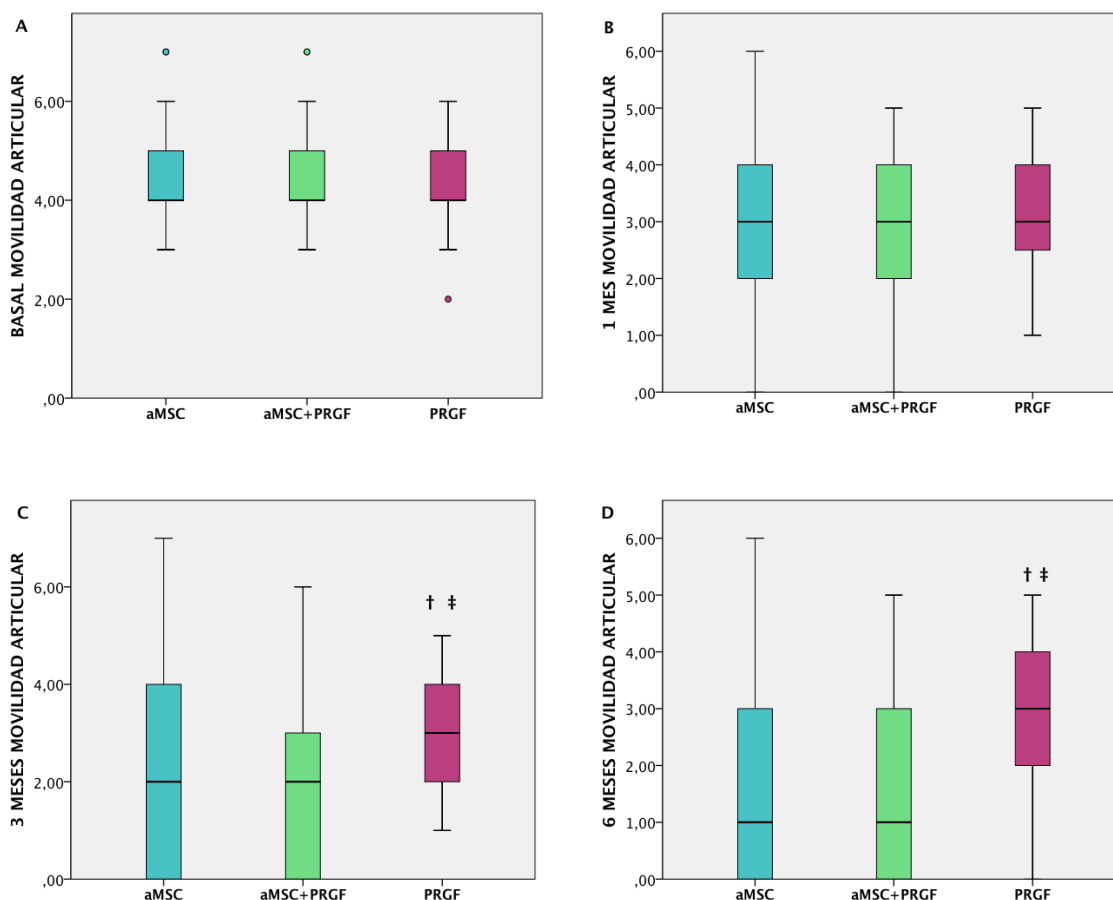
Movilidad articular

Los resultados obtenidos de la comparación entre grupos de la variable movilidad articular, en la cual evaluamos tanto el rango de movimiento de cada de una de las articulaciones, como la molestia a la hora de manipular la extremidad afectada se exponen a continuación en la tabla 102 y en la gráfica 54.

Tabla 102: Comparación entre grupos de la movilidad articular de los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA		SIG
					95% LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	25	4,60	1,12	4,14	5,06	
	CMG+PRGF	23	4,61	1,08	4,14	5,07	0,150
	PRGF	47	4,11	0,84	3,86	4,35	
	Total	95	4,36	1,00	4,15	4,56	
1 MES	CMG	25	3,00	1,29	2,47	3,53	
	CMG+PRGF	23	2,78	1,48	2,14	3,42	0,587
	PRGF	47	3,19	0,95	2,91	3,47	
	Total	95	3,04	1,18	2,80	3,28	
3 MESES	CMG	24	2,13	2,11	1,23	3,02	
	CMG+PRGF	22	2,05	1,96	1,17	2,92	0,045
	PRGF	47	2,87	1,06	2,56	3,18	
	Total	93	2,48	1,65	2,14	2,82	
6 MESES	CMG	23	1,74	1,86	0,93	2,55	
	CMG+PRGF	21	1,62	1,77	0,81	2,43	0,002
	PRGF	45	2,89	1,13	2,55	3,23	
	Total	89	2,29	1,61	1,95	2,63	

Gráfica 54: Comparación entre grupos de la movilidad articular en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

Como podemos observar en los datos expuestos anteriormente, no existieron diferencias entre grupos en el parámetro movilidad articular a tiempo basal y un mes tras la aplicación de los diversos tratamientos. En cambio 3 y 6 meses posteriores a la aplicación de los mismos, obtenemos mejores resultados en los grupos tratados con CMG y CMG+PRGF, existiendo en ambos grupos diferencias significativas con el grupo tratado con PRGF.

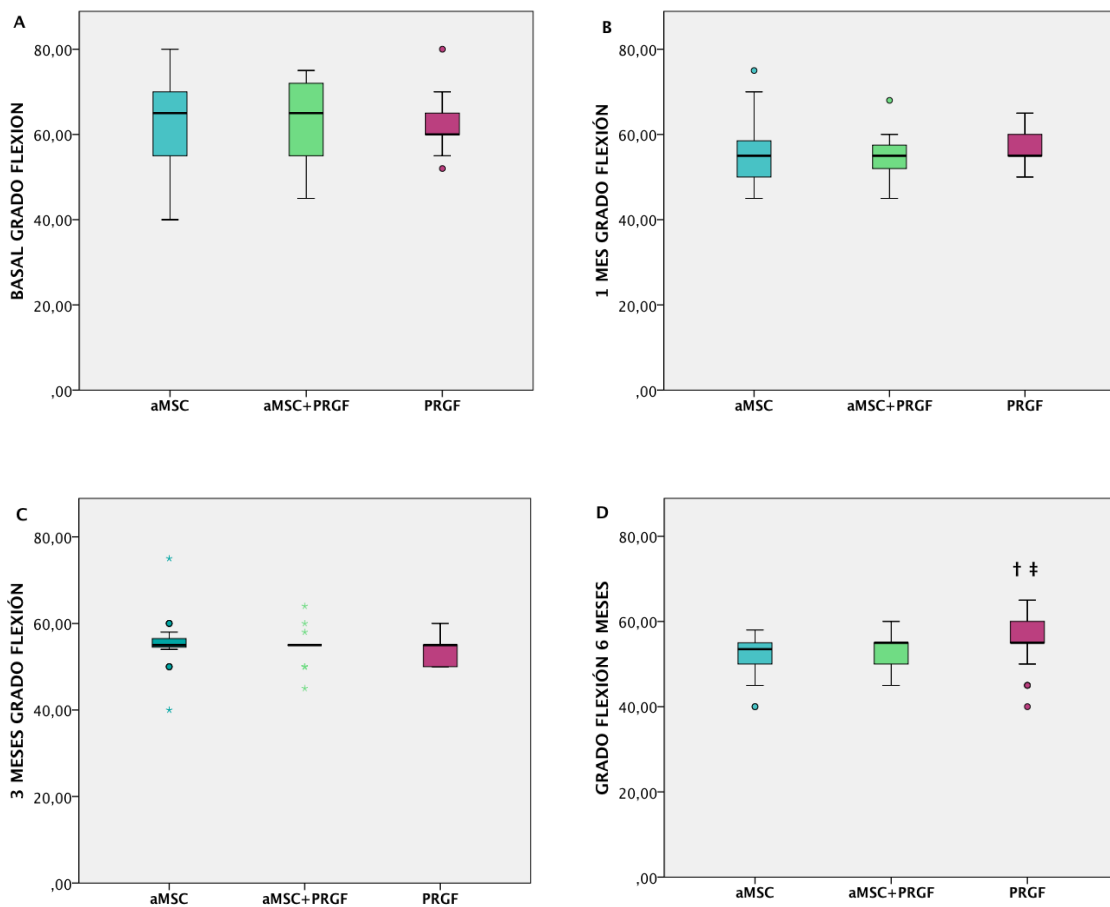
Grado flexión

Dentro de la movilidad articular, uno de los parámetros a evaluar era el grado de flexión de las articulaciones estudiadas. Los resultados obtenidos tras analizar la correlación existente entre los grupos de estudio en cada uno de los tiempo evaluados se muestra a continuación (Tabla 103 y Gráfica 55).

Tabla 103: Comparación entre grupos del grado de flexión de los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%		SIG
					LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	24	62,58	10,70	58,06	67,10	0,368
	CMG+PRGF	23	63,48	8,63	59,75	67,21	
	PRGF	47	60,91	5,09	59,42	62,41	
	Total	94	61,97	7,75	60,38	63,55	
1 MES	CMG	24	55,79	7,22	52,74	58,84	0,235
	CMG+PRGF	23	55,04	4,87	52,94	57,15	
	PRGF	47	56,23	3,07	55,33	57,14	
	Total	94	55,83	4,84	54,84	56,82	
3 MESES	CMG	23	55,30	6,15	52,64	57,97	0,505
	CMG+PRGF	22	54,41	3,83	52,71	56,11	
	PRGF	47	54,13	3,27	53,17	55,09	
	Total	92	54,49	4,26	53,61	55,37	
6 MESES	CMG	22	51,55	5,13	49,27	53,82	0,003
	CMG+PRGF	21	52,90	3,91	51,12	54,68	
	PRGF	45	55,22	4,64	53,83	56,62	
	Total	88	53,75	4,83	52,73	54,77	

Gráfica 55: Comparación entre grupos del grado de flexión en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

Estos resultados nos muestran que únicamente existieron diferencias entre grupos a los 6 meses de estudio, donde los animales tratados con PRGF obtuvieron un grado de flexión más limitado que los tratados con CMG y CMG+PRGF.

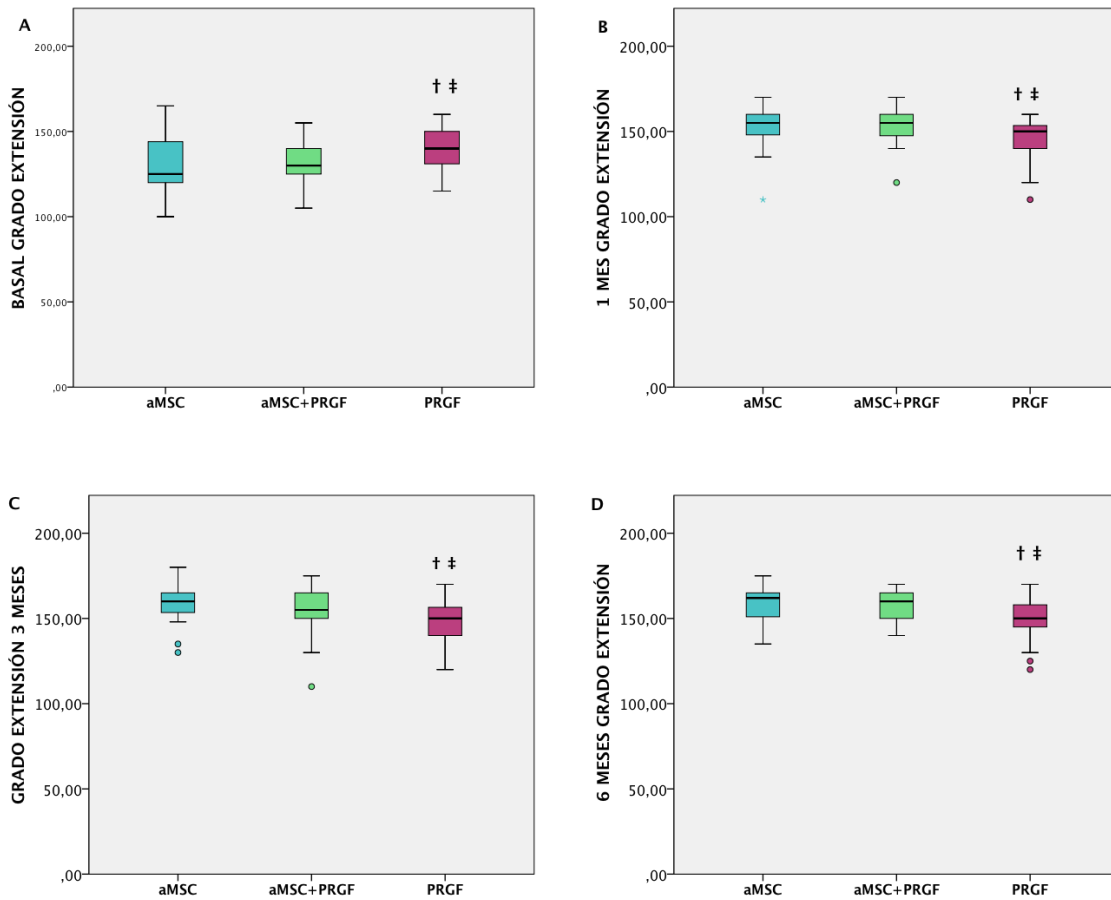
Grado extensión

Otro de los parámetros evaluados dentro de la movilidad articular fue el grado de extensión de las articulaciones, mostrándose a continuación (Tabla 104 y Gráfica 56) los resultados obtenidos de la comparación entre grupos a cada uno de los tiempos de estudio.

Tabla 104: Comparación entre grupos del grado de extensión de los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%		SIG
					LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	25	130,36	17,58	123,10	137,62	
	CMG+PRGF	23	130,52	12,04	125,31	135,73	0,004
	PRGF	47	139,72	11,07	136,47	142,97	
	Total	95	135,03	13,95	132,19	137,87	
1 MES	CMG	25	151,48	12,13	146,47	156,49	
	CMG+PRGF	23	153,30	11,51	148,33	158,28	0,009
	PRGF	47	145,74	11,19	142,46	149,03	
	Total	95	149,08	11,89	146,66	151,51	
3 MESES	CMG	24	158,42	10,74	153,88	162,95	
	CMG+PRGF	22	154,73	15,14	148,01	161,44	0,002
	PRGF	47	149,23	10,79	146,06	152,40	
	Total	93	152,90	12,45	150,34	155,47	
6 MESES	CMG	23	159,65	9,80	155,41	163,89	
	CMG+PRGF	21	158,10	8,87	154,06	162,13	<0,0001
	PRGF	45	149,78	11,28	146,39	153,17	
	Total	89	154,29	11,27	151,92	156,67	

Gráfica 56: Comparación entre grupos del grado de extensión en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

Respecto a grado de extensión de las articulaciones, observamos que desde la primera evaluación a tiempo basal, ya existieron diferencias significativas entre el grupo tratado con PRGF y los otros dos grupos tratados con CMG y CMG+PRGF, ya que el grupo de PRGF presentaba un mayor ángulo de extensión al inicio del estudio. Conforme avanza el estudio, el ángulo de extensión de los grupos tratados con CMG y CMG+PRGF va aumentando, obteniendo al mes, a los 3, y a los 6 meses mejores resultados en comparación con el grupo tratado con PRGF.

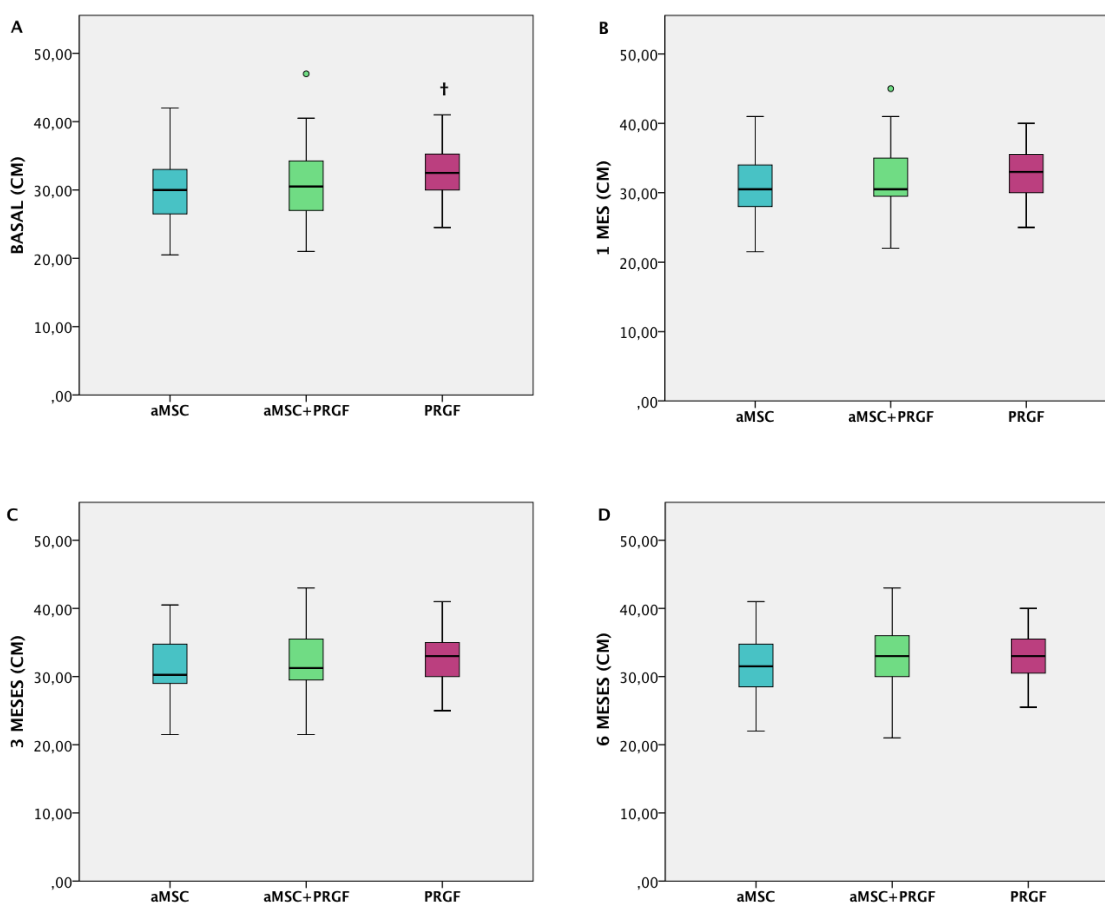
Atrofia muscular

En la tabla 105 y la gráfica 106 aparecen reflejados los datos obtenidos tras comparar la atrofia muscular de los pacientes entre grupos a cada uno de los tiempos evaluados.

Tabla 105: Comparación entre grupos de la atrofia muscular de los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%		SIG
					LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	25	30,28	5,67	1,13	27,94	
	CMG+PRGF	23	31,17	5,80	1,21	28,66	0,046
	PRGF	47	32,64	3,69	0,54	31,55	
	Total	95	31,66	4,88	0,50	30,67	
1 MES	CMG	25	31,28	5,32	1,06	29,09	
	CMG+PRGF	23	32,30	5,37	1,12	29,98	0,424
	PRGF	47	32,78	3,71	0,54	31,69	
	Total	95	32,27	4,59	0,47	31,33	
3 MESES	CMG	24	31,40	5,05	1,03	29,26	
	CMG+PRGF	22	32,14	4,98	1,06	29,93	0,521
	PRGF	47	32,67	3,79	0,55	31,55	
	Total	93	32,21	4,41	0,46	31,30	
6 MESES	CMG	23	31,63	5,22	1,09	29,37	
	CMG+PRGF	21	32,90	5,26	1,15	30,51	0,597
	PRGF	45	32,66	3,84	0,57	31,50	
	Total	89	32,45	4,55	0,48	31,49	

Gráfica 57: Comparación entre grupos de la atrofia muscular en centímetros en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

En los resultados adquiridos de analizar el perímetro muscular en centímetros de cada uno de los grupos y comparar los resultados obtenidos, observamos que únicamente existieron diferencias entre grupos a tiempo basal, estas diferencias se dieron entre el grupo PRGF y el grupo CMG.

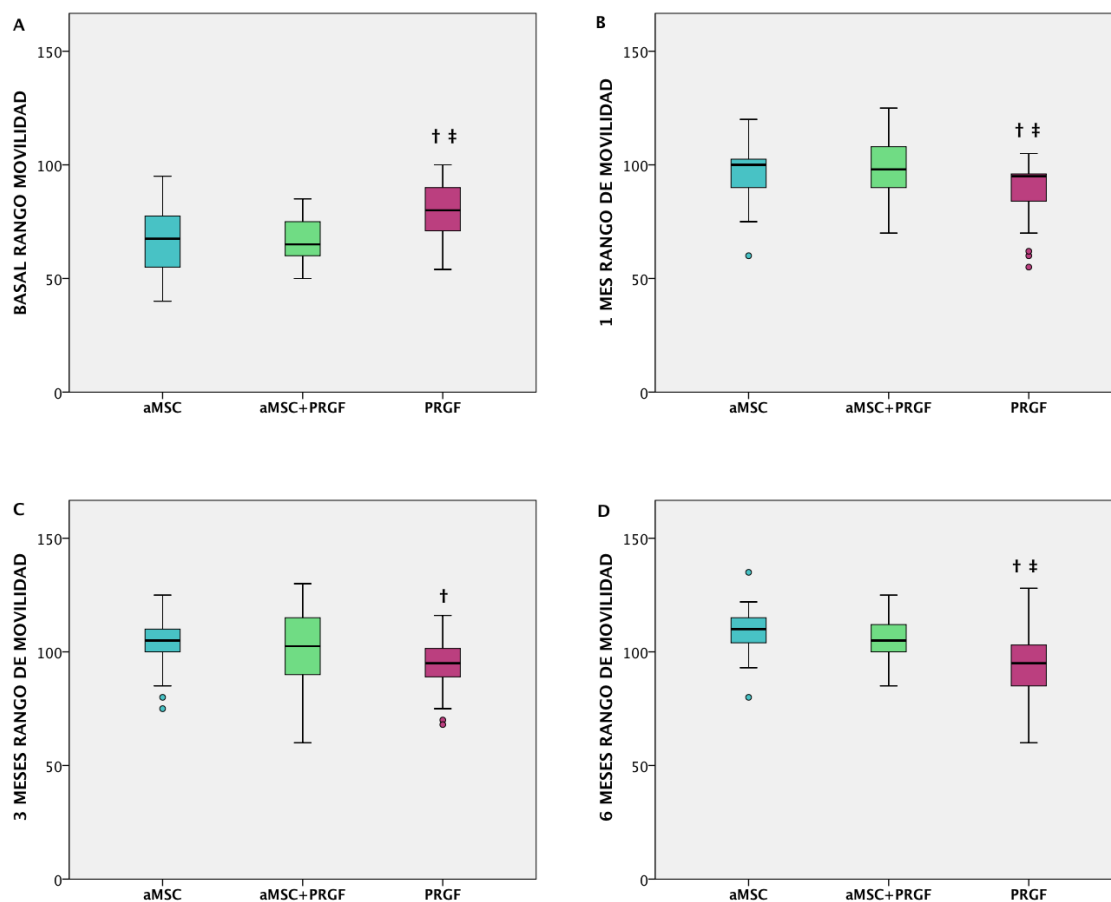
Rango de movilidad

Como ya hemos comentado anteriormente el rango de movilidad es una variable calculada para poder estandarizar la mejora obtenida en todas las articulaciones, ya que el grado de flexión y extensión de cada una de las articulaciones incluidas en el estudio es diferente, de manera que este parámetro valora el % del rango de movimiento sobre el 100% de cada articulación. Las diferencias obtenidas entre grupos a cada uno de los tiempo de estudio se exponen a continuación en la tabla 106 y en la gráfica 58.

Tabla 106: Comparación entre grupos del rango de movilidad de los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%		SIG
					LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	24	66,75	14,82	60,49	73,01	
	CMG+PRGF	23	67,04	9,82	62,80	71,29	<0,0001
	PRGF	47	78,81	12,71	75,08	82,54	
	Total	94	72,85	13,89	70,01	75,70	
1 MES	CMG	24	95,54	12,21	90,39	100,70	
	CMG+PRGF	23	98,26	11,85	93,14	103,38	0,014
	PRGF	47	89,51	11,85	86,03	92,99	
	Total	94	93,19	12,42	90,65	95,74	
3 MESES	CMG	23	103,26	12,34	97,92	108,60	
	CMG+PRGF	22	100,55	15,90	93,50	107,59	0,018
	PRGF	47	95,11	11,50	91,73	98,48	
	Total	92	98,45	13,22	95,71	101,18	
6 MESES	CMG	22	108,32	11,58	103,19	113,45	
	CMG+PRGF	21	105,19	10,39	100,46	109,92	<0,0001
	PRGF	45	94,56	14,33	90,25	98,86	
	Total	88	100,53	14,14	97,54	103,53	

Gráfica 58: Comparación entre grupos del rango de movilidad en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



En este parámetro observamos diferencias entre el grupo PRGF y los restantes grupos (CMG y CMG+PRGF) a tiempo basal donde el grupo PRGF presentan un mayor rango de movilidad, y en los restantes tiempos (1,3 y 6 meses) donde los grupos tratados con CMG y CMG+PRGF obtienen mejores resultados.

Evaluación del dolor

Tanto los propietarios como el veterinario investigador evaluaron el dolor de la mascota mediante una escala analógica visual (VAS) en cada una de las visitas, los resultados obtenidos de la comparación entre grupos se muestran en las siguientes tablas y gráficas.

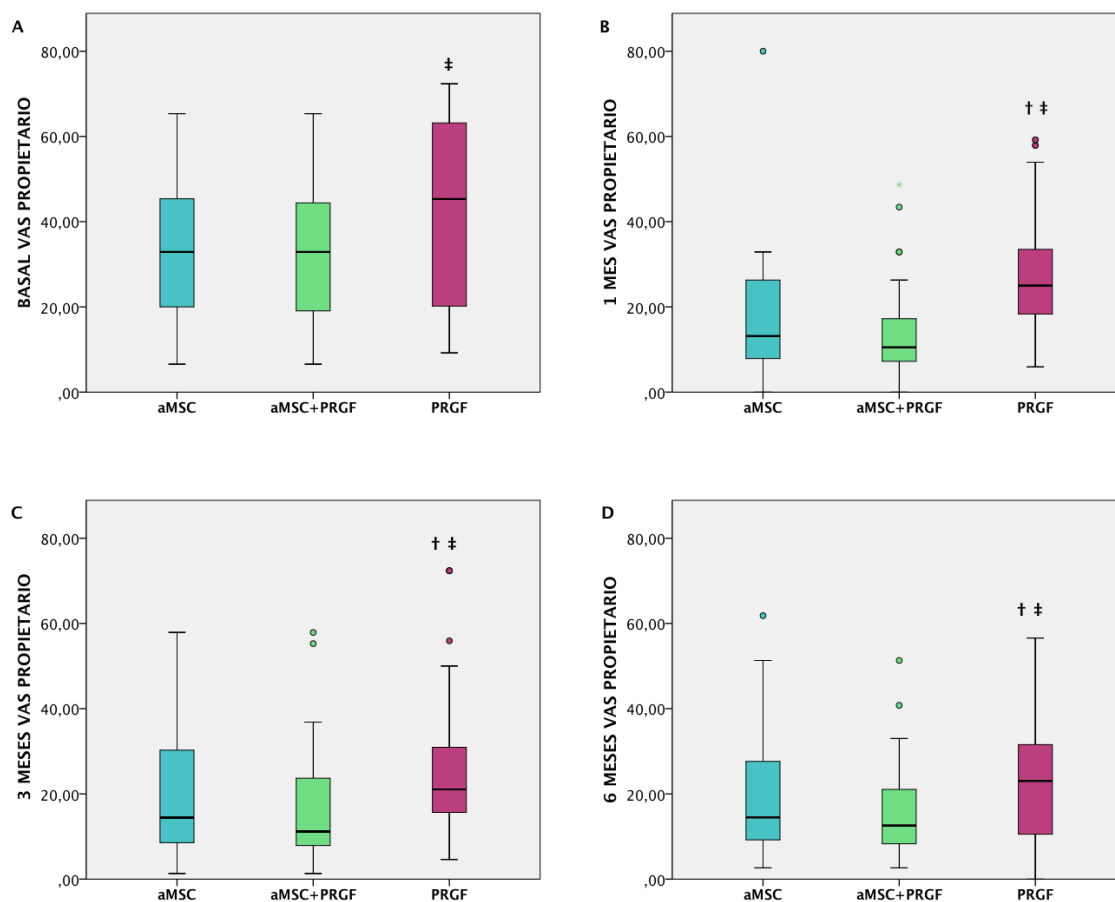
VAS propietario

En la tabla 107 y gráfica 59 quedan reflejadas las diferencias obtenidas entre grupos en la valoración de la VAS por parte de propietario a cada uno de los tiempos de estudio evaluados.

Tabla 107: Comparación entre grupos de la VAS del propietario en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%		SIG
					LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	25	33,98	16,04	27,36	40,60	
	CMG+PRGF	23	32,81	17,18	25,38	40,24	0,048
	PRGF	47	43,45	22,15	36,94	49,95	
	Total	95	38,38	20,01	34,30	42,46	
1 MES	CMG	25	17,77	16,42	10,99	24,55	
	CMG+PRGF	23	14,96	13,15	9,27	20,64	0,001
	PRGF	47	28,33	15,81	23,69	32,97	
	Total	95	22,32	16,38	18,98	25,65	
3 MESES	CMG	24	22,74	22,51	13,23	32,24	
	CMG+PRGF	22	21,09	23,15	10,83	31,36	0,046
	PRGF	47	26,90	18,55	21,45	32,35	
	Total	93	24,45	20,68	20,19	28,71	
6 MESES	CMG	22	20,10	15,98	13,01	27,18	
	CMG+PRGF	20	16,51	12,98	10,44	22,59	0,042
	PRGF	45	24,16	15,02	19,65	28,67	
	Total	87	21,37	15,00	18,18	24,57	

Gráfica 59: Comparación entre grupos de la VAS del propietario en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

Como observamos en los datos anteriores desde tiempo basal existieron diferencias en este parámetro entre el grupo PRGF y el grupo CMG+PRGF en todos los tiempos de estudio, siendo el valor de la VAS más elevado en el grupo PRGF. Comparando este grupo (PRGF) con el grupo de CMG las diferencias se obtuvieron a partir del primer mes, manteniéndose hasta el final del estudio, observando un mayor grado de dolor en el grupo PRGF. No existieron diferencias entre el grupo CMG y el grupo CMG+PRGF en ninguno de los tiempos valorados.

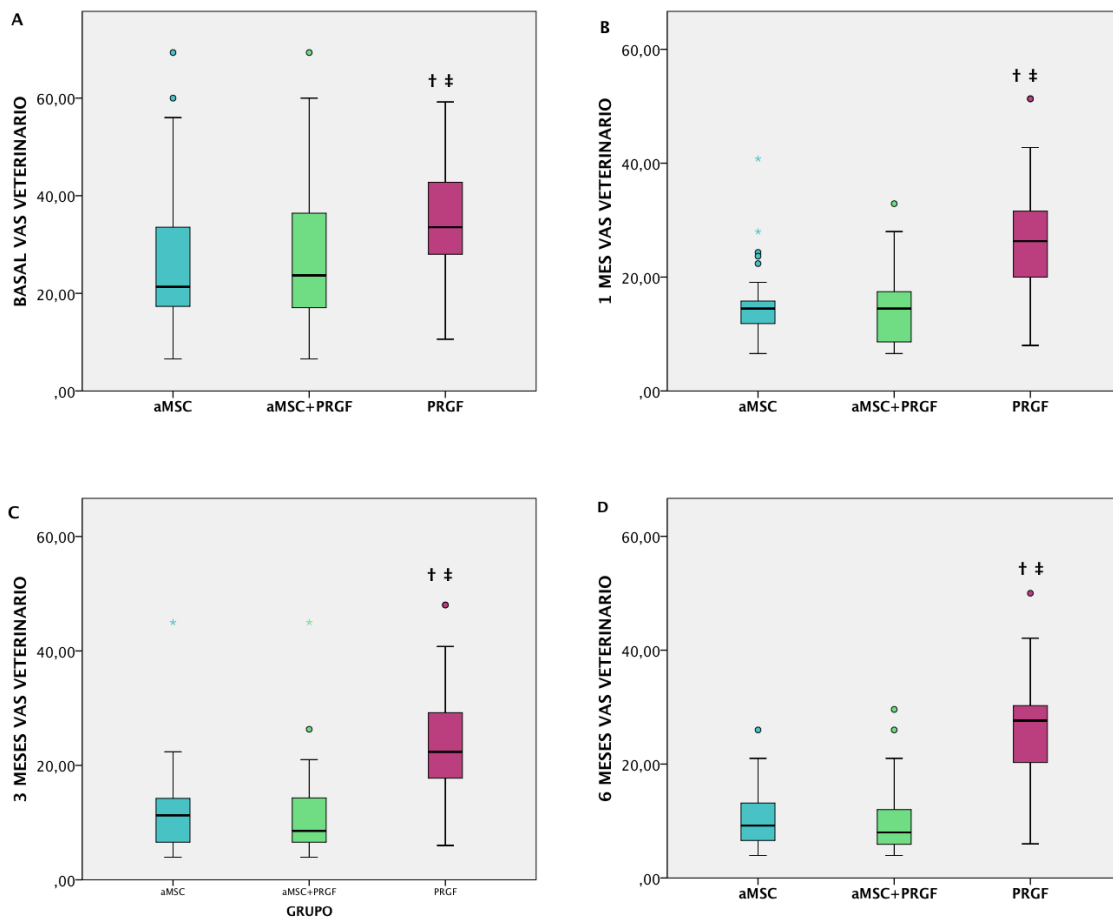
VAS veterinario

En la tabla 108 y gráfica 60 quedan reflejadas las diferencias obtenidas entre grupos en la valoración de la VAS por parte del veterinario investigador a cada uno de los tiempos de estudio.

Tabla 108: Comparación entre grupos de la VAS del veterinario en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%		SIG
					LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	25	27,57	16,02	20,95	34,18	
	CMG+PRGF	23	28,72	17,04	21,36	36,09	0,083
	PRGF	47	34,56	10,88	31,37	37,75	
	Total	95	31,31	14,22	28,41	34,20	
1 MES	CMG	25	15,87	7,51	12,77	18,97	
	CMG+PRGF	23	17,54	14,85	11,12	23,96	<0,0001
	PRGF	47	26,87	9,19	24,17	29,56	
	Total	95	21,71	11,58	19,35	24,07	
3 MESES	CMG	24	12,67	8,70	9,00	16,34	
	CMG+PRGF	22	12,57	9,46	8,37	16,76	<0,0001
	PRGF	47	24,12	8,91	21,50	26,73	
	Total	93	18,43	10,60	16,25	20,61	
6 MESES	CMG	23	10,87	5,96	8,29	13,45	
	CMG+PRGF	21	10,84	7,32	7,50	14,17	<0,0001
	PRGF	45	26,17	9,35	23,36	28,98	
	Total	89	18,60	11,14	16,25	20,95	

Gráfica 60: Comparación entre grupos de la VAS del veterinario en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

Respecto a la VAS del veterinario, desde el inicio del estudio se obtuvieron diferencias en este parámetro entre el grupo PRGF y los otros dos grupos, observándose un mayor grado de dolor en el grupo PRGF en comparación con los restantes grupos ya desde el principio.

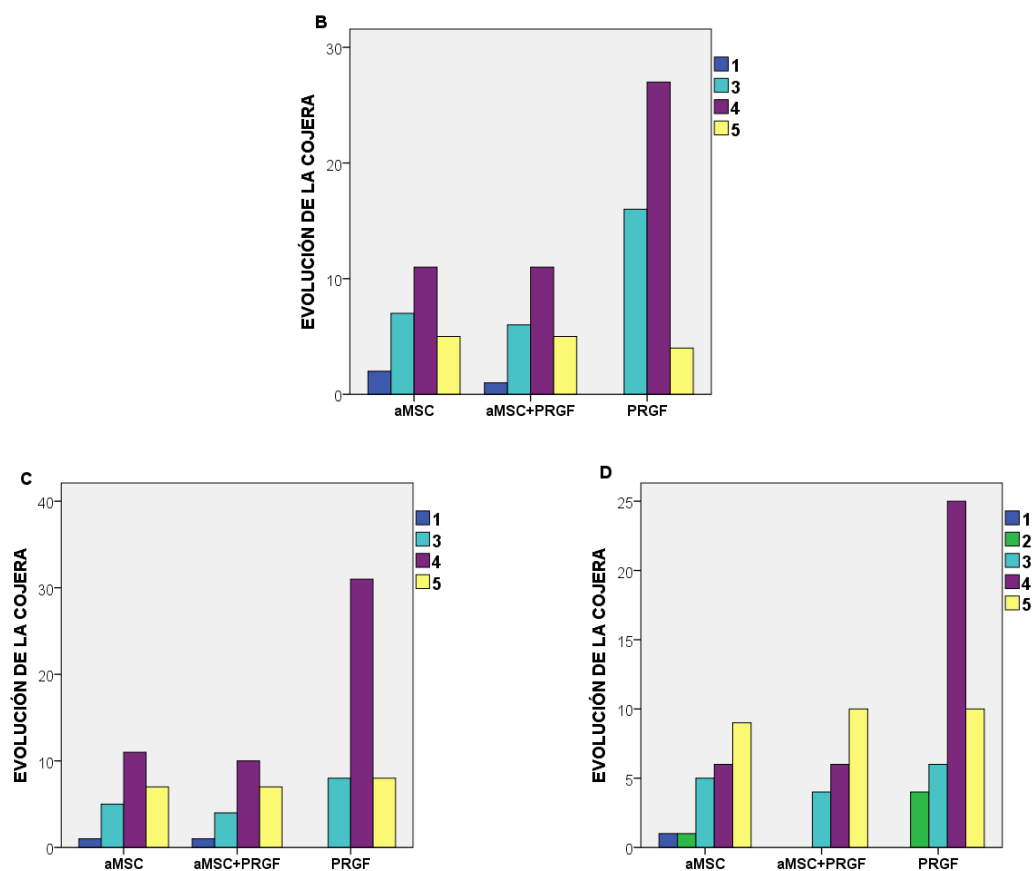
Valoración de la satisfacción del propietario

A continuación se recogen los datos obtenidos sobre la satisfacción de los propietarios en cada uno de los grupos y la comparación entre sí en todos los tiempos de estudio.

Primera pregunta

En la gráfica 61 se exponen los resultados obtenidos en la cuestión sobre la evolución de la cojera en cada uno de los grupos de estudio

Gráfica 61: Comparación entre grupos de la pregunta sobre la evolución de la cojera en los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



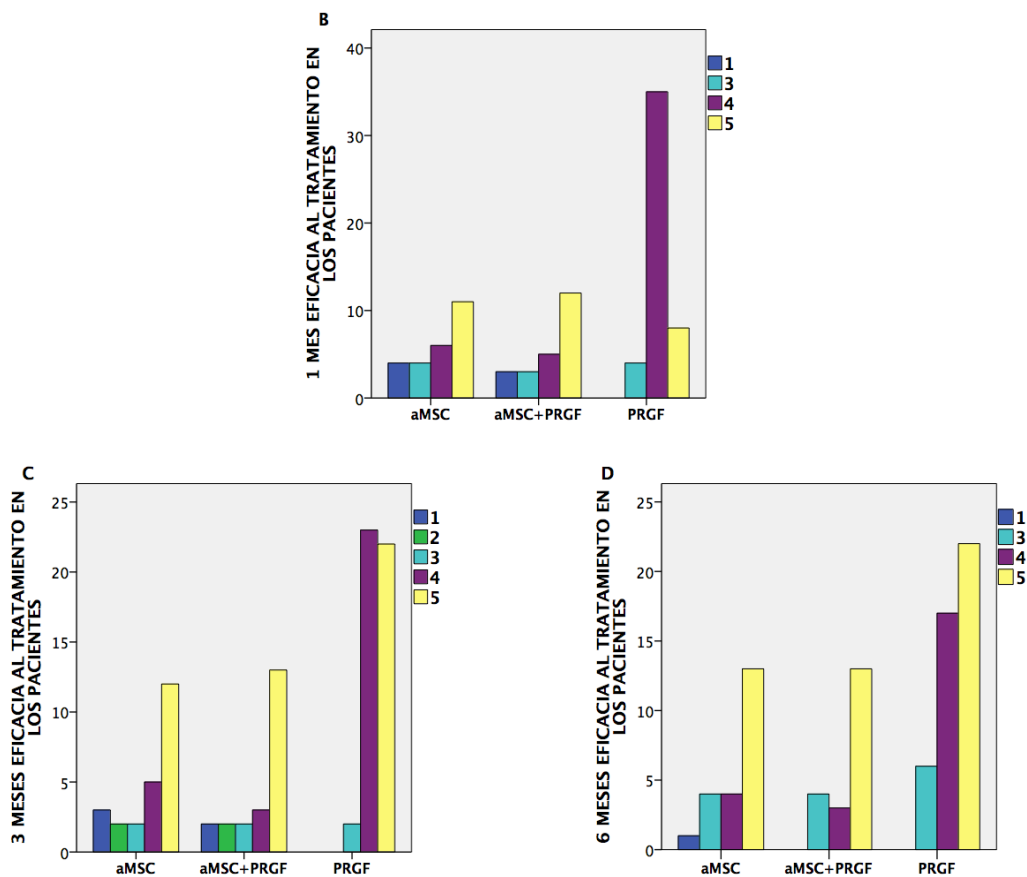
Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

En los resultados obtenidos respecto a la evolución de la cojera en los pacientes observamos que no existen diferencias entre grupos en ninguno de los tiempos de estudio.

Segunda pregunta

En la siguiente gráfica (gráfica 62) se representa la comparación entre grupos de la eficacia al tratamiento en cada uno de los tiempos evaluados.

Gráfica 62: Comparación entre grupos de la pregunta sobre la eficacia al tratamiento en los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



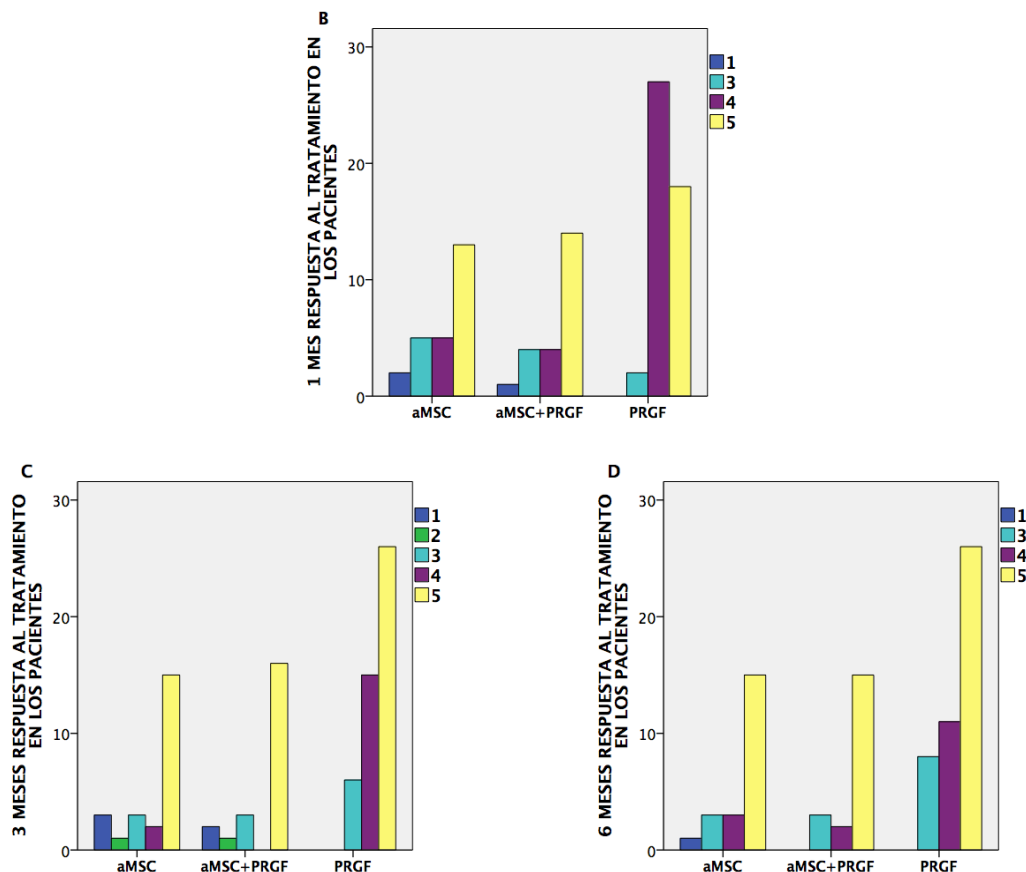
Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

Como observamos en la gráfica anterior, no existieron diferencias entre los grupos a ninguno de los tiempos de estudio en la cuestión referente a la eficacia al tratamiento en los pacientes.

Tercera pregunta

En la gráfica 63 se muestra la comparación entre grupos referente a la cuestión sobre la respuesta al tratamiento en cada uno de los pacientes.

Gráfica 63: Comparación entre grupos de la pregunta sobre respuesta al tratamiento en los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



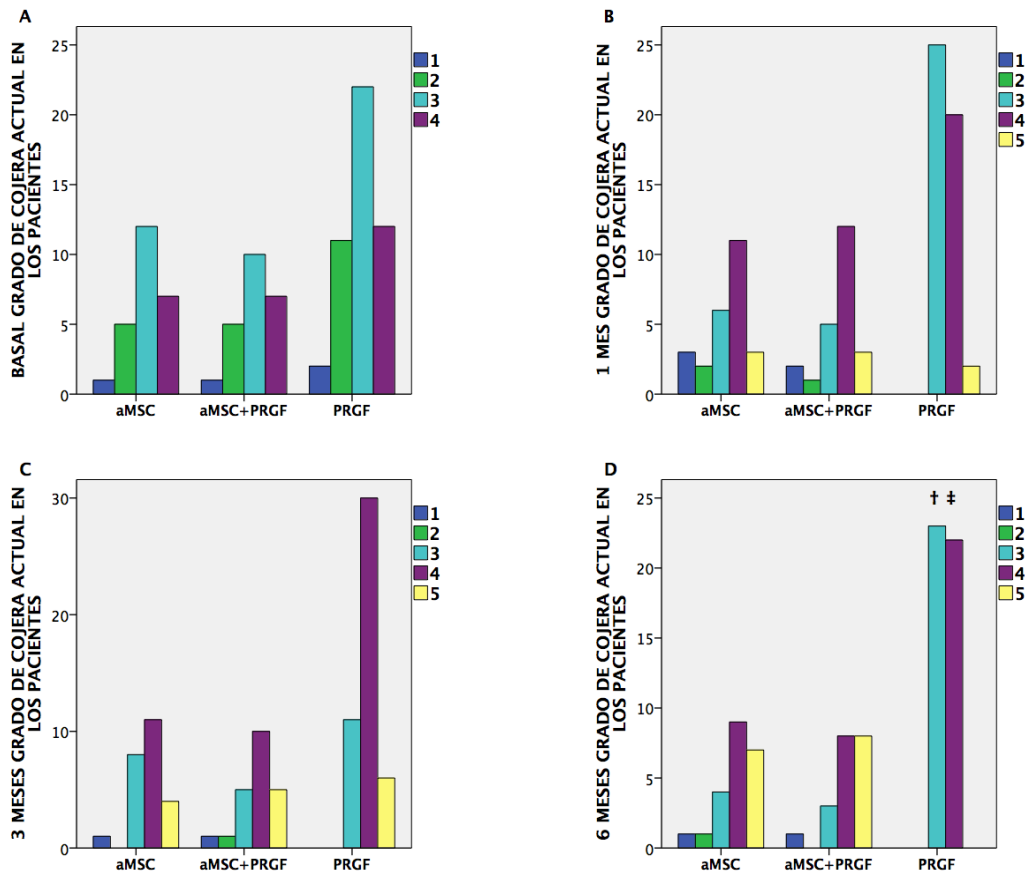
Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

En las gráficas anteriores se representa el resultado obtenido de comparar entre grupos la respuesta al tratamiento en los diferentes tiempos de estudio. Como podemos ver, estos resultados no muestran diferencias significativas en ninguno de los tiempos evaluados.

Cuarta pregunta

En la gráfica 64 se compara entre grupos las respuestas obtenidas respecto al grado de cojera que presentan las mascotas en los diferentes tiempos de estudio.

Gráfica 64: Comparación entre grupos de la pregunta sobre grado de cojera actual de los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



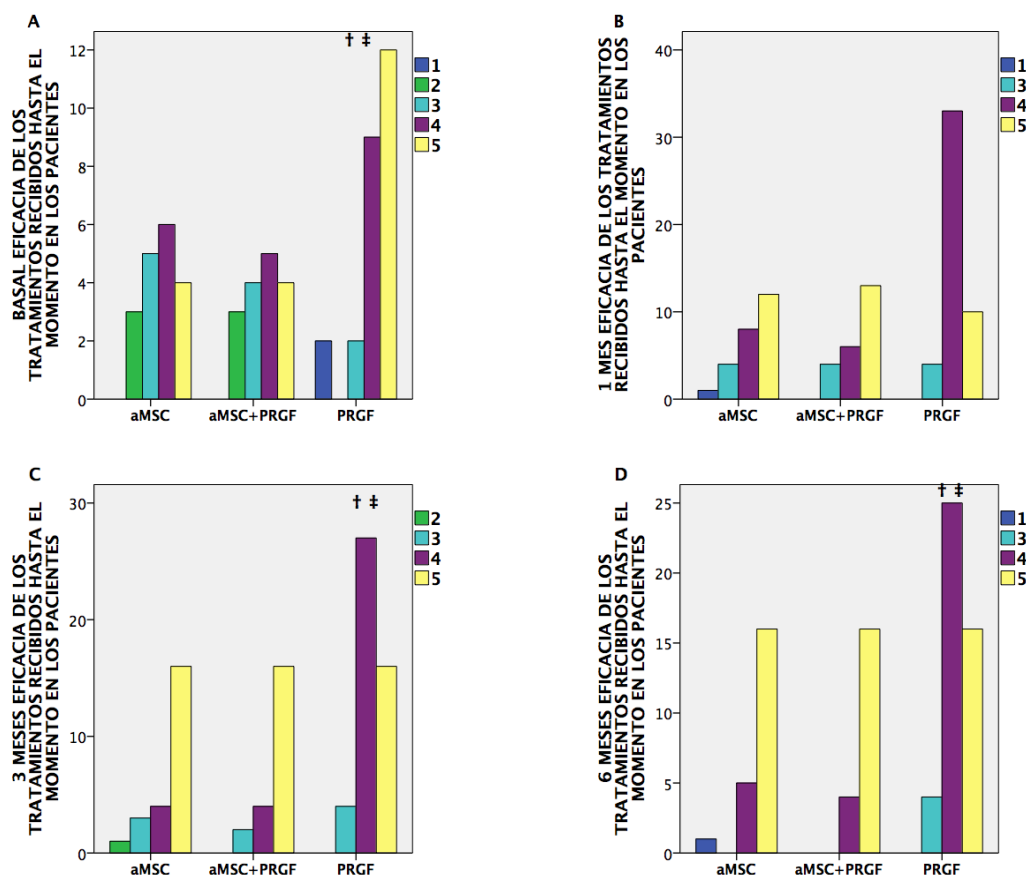
Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

Como podemos ver en esta cuestión, no existen diferencias significativas entre grupos a tiempo basal, 1 y 3 meses posteriores a cada uno de los tratamientos, aún existiendo una mejoría de esta variable a lo largo del estudio. En cambio, a los 6 meses de estudio, el grado de cojera de los animales tratados con PRGF es mayor que los tratados con CMG y CMG+PRGF, existiendo diferencias significativas con estos dos grupos.

Quinta pregunta

A continuación, en la gráfica 65 se muestran los resultados obtenidos de comparar entre cada uno de los grupos, la eficacia al tratamiento que hasta el momento han llevado los pacientes.

Gráfica 65: Comparación entre grupos de la pregunta sobre la eficacia de los tratamientos que hasta ese momento han llevado los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



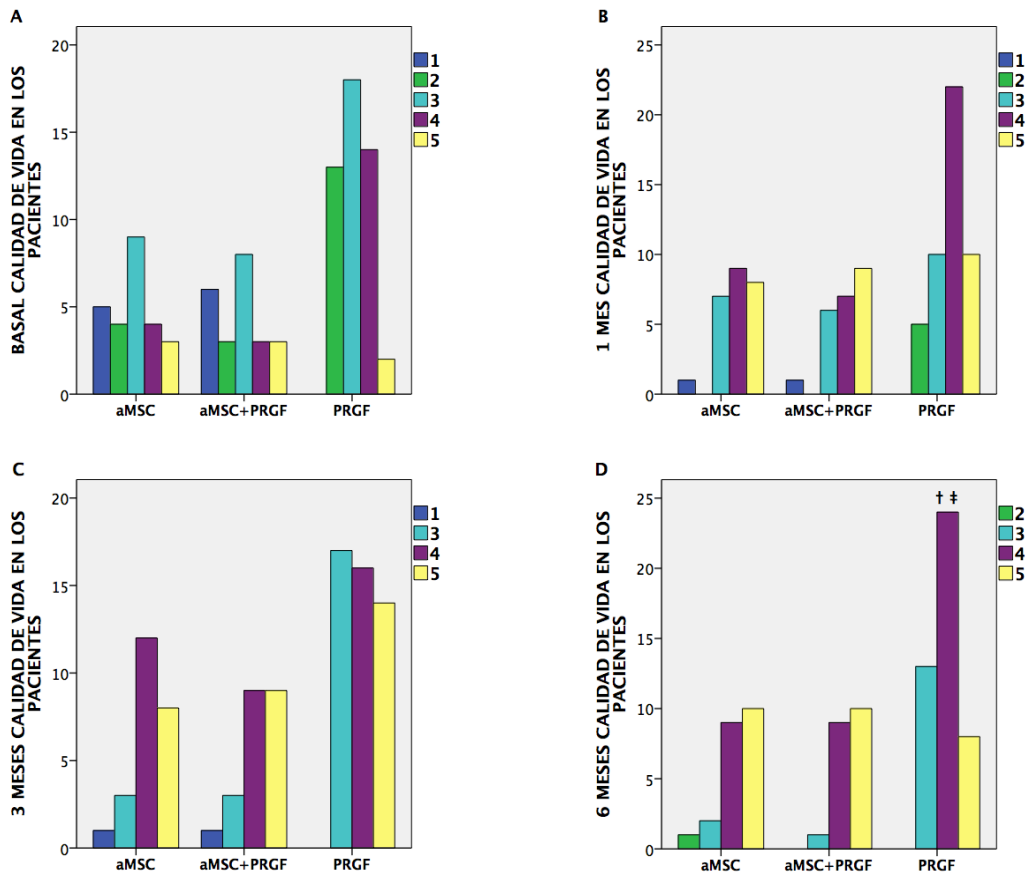
Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

En los resultados anteriores, observamos que a tiempo basal, antes de la aplicación de cada uno de los tratamientos, el grupo PRGF presenta diferencias significativas con los grupos tratados con CMG y CMG+PRGF. Éste grupo (PRGF) obtiene una mayor valoración a tiempo basal en esta cuestión referente a la eficacia al tratamiento que hasta el momento han llevado los pacientes. En cambio, a 3 y a 6 meses, los grupos tratados con CMG y CMG+PRGF obtienen una mejor valoración, mostrando diferencias significativas con el grupo PRGF

Sexta pregunta

En la gráfica 66 se representa la comparación entre grupos referente a la cuestión sobre la calidad de vida en los pacientes en cada uno de los tiempos analizados durante el estudio.

Gráfica 66: Comparación entre grupos de la pregunta sobre la calidad de vida en los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



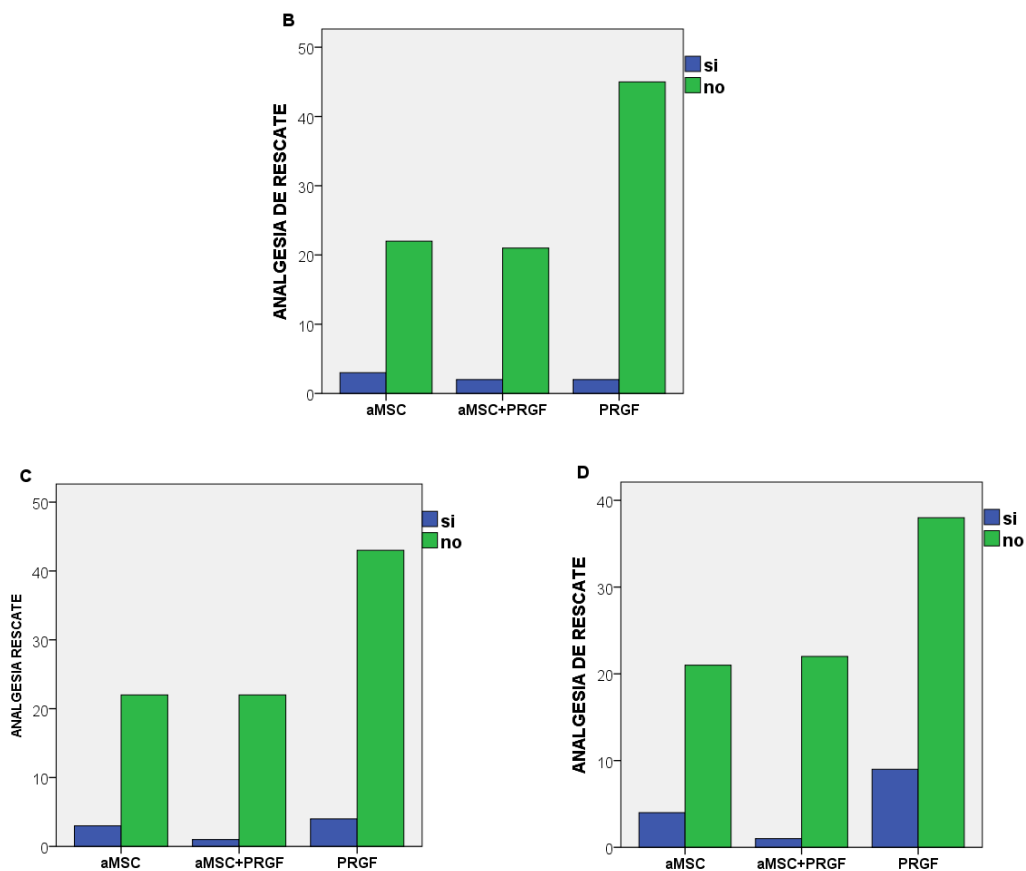
Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

En las respuestas obtenidas sobre la calidad de vida de los pacientes, observamos que en todos los grupos existe una mejoría a lo largo del estudio sin existir diferencias entre grupos hasta los 6 meses, donde los grupos tratados con CMG y CMG+PRGF obtienen una mayor calidad de vida que el grupo tratado con PRGF.

Analgesia de rescate

A continuación en la gráfica 67 se muestran los resultados obtenidos de comparar entre grupos la necesidad de emplear el meloxicam como analgesia de rescate durante el estudio.

Gráfica 67: Comparación entre grupos de la analgesia de rescate en cada uno de los tiempos de estudio (B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

Como observamos en las gráficas anteriores en los tres grupos evaluados predominan los animales que no necesitaron analgesia de rescate durante el estudio. No existieron diferencias significativas en ninguno de los tiempos analizados.

Estudio de los Biomarcadores

A continuación se exponen los resultados obtenidos de la evaluación de los biomarcadores analizados en el suero de los pacientes:

Estudio del Factor Tiempo

A continuación se exponen de manera independiente los datos obtenidos en cada uno de los grupos de estudio (CMG, CMG+PRGF y PRGF), así como el análisis estadístico que compara su evolución en cada uno de los tiempos (Basal, 1, 3 y 6 meses).

Grupo CMG

C2C

En la tabla 109 aparecen los datos descriptivos para los productos de degradación del colágeno (C2C) en el grupo tratado con CMG.

Tabla 109: Evaluación de los productos de degradación del colágeno (C2C) en los pacientes del grupo CMG

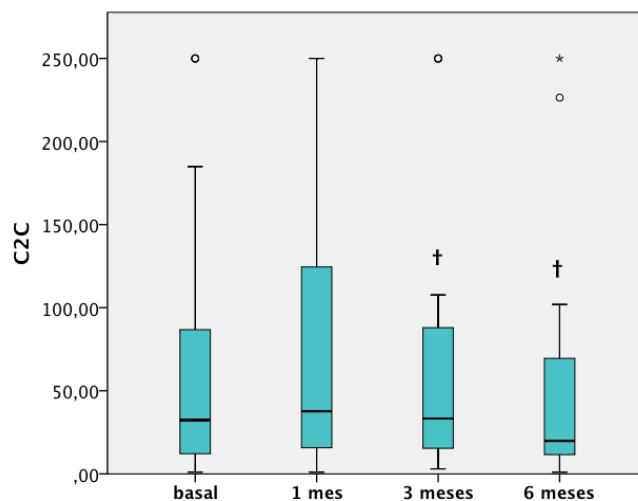
TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LÍMITEINFERIOR	LÍMITESUPERIOR
BASAL	24	68,57	83,17	16,98	33,46
1 MES	23	79,34	89,16	18,59	40,78
3 MESES	22	64,30	80,50	17,16	28,60
6 MESES	22	48,43	67,72	14,44	18,41
TOTAL	91	65,39	80,10	8,40	48,71

Una vez obtenidos los datos se compararon entre cada uno de los tiempos para evaluar las posibles diferencias. Los datos de estos estudios estadísticos aparecen en la tabla 110 y en la gráfica 68.

Tabla 110: Estudio comparativo entre tiempos de los productos de degradación del colágeno (C2C) en el grupo CMG

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	-11,70	50,85	10,60	-33,68	10,29	-1,10	22	0,282
BASAL-3MESES	6,62	65,13	13,89	-22,25	35,50	0,48	21	0,638
BASAL-6MESES	25,55	59,76	12,74	-0,95	52,05	2,01	21	0,058
1MES-3MESES	20,13	42,00	9,17	1,02	39,25	2,20	20	0,04
1MES-6MESES	39,87	66,84	14,59	9,44	70,30	2,73	20	0,013
3MESES-6MESES	16,61	38,56	8,62	-1,44	34,66	1,93	19	0,069

Gráfica 68: Evolución de los productos de degradación del colágeno (C2C) de los pacientes del grupo CMG



* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Como se puede apreciar, en el grupo CMG existieron diferencias significativas a los 3 y los 6 meses de estudio con los valores obtenidos al mes. Lo que nos indica que los productos de degradación del colágeno aumentaron al mes, y después disminuyeron de manera progresiva hasta los 6 meses de estudio.

Ácido Hialurónico (HA)

En la tabla 111 aparecen reflejados los datos descriptivos para el ácido hialurónico en el grupo CMG.

Tabla 111: Evaluación del ácido hialurónico en los pacientes del grupo CMG

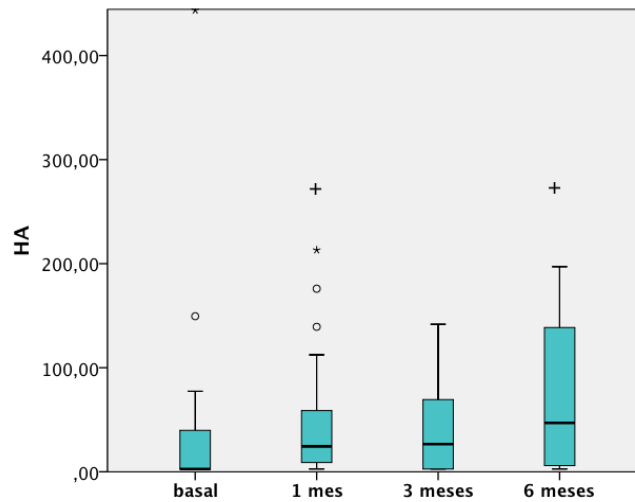
TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95% LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	25	38,89	91,15	18,23	1,26
1 MES	25	95,77	187,78	37,56	18,26
3 MESES	23	83,63	166,25	34,67	11,74
6 MESES	23	104,12	180,76	37,69	25,95
TOTAL	96	80,05	160,09	16,34	47,61

En la tabla 112 y en la gráfica 69, se exponen los resultados obtenidos de comparar los valores de cada uno de los tiempos de estudio para poder evaluar la evolución de este parámetro en el tiempo.

Tabla 112: Estudio comparativo entre tiempos del ácido hialurónico en el grupo CMG

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	-56,89	124,60	24,92	-108,32	-5,45	-2,28	24	0,032
BASAL-3MESES	-42,31	118,32	24,67	-93,48	8,85	-1,72	22	0,1
BASAL-6MESES	-62,08	105,38	21,97	-107,65	-16,51	-2,83	22	0,01
1MES-3MESES	17,06	150,11	31,30	-47,86	81,97	0,55	22	0,591
1MES-6MESES	-0,25	120,91	25,21	-52,54	52,03	-0,01	22	0,992
3MESES-6MESES	-16,35	123,16	26,88	-72,41	39,71	-0,61	20	0,55

Gráfica 69: Evolución del ácido hialurónico de los pacientes del grupo CMG



⁺ Diferencias con basal. [†] Diferencias con 1 mes. [#] Diferencias con 3 meses

Como podemos observar en el grupo tratado con CMG, existió un aumento progresivo del ácido hialurónico evaluados en el suero de los pacientes, observándose diferencias estadísticamente significativas entre basal y mes, y entre basal y 6 meses.

Grupo CMG+PRGF

C2C

En la tabla 113 aparecen reflejados los datos descriptivos para los productos de degradación del colágeno (C2C) en el grupo CMG+PRGF.

Tabla 113: Evaluación de los productos de degradación del colágeno (C2C) en los pacientes del grupo CMG+PRGF

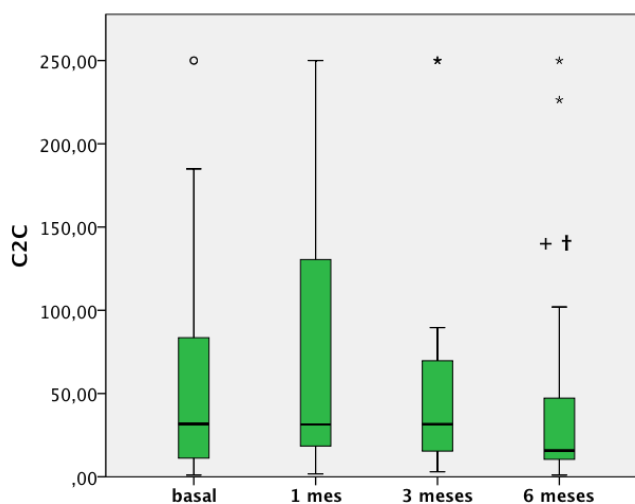
TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95% LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	22	62,38	76,54	16,32	28,45
1 MES	21	78,80	92,18	20,12	36,84
3 MESES	20	64,33	83,28	18,62	25,36
6 MESES	20	45,65	70,98	15,87	12,43
TOTAL	83	62,97	80,53	8,84	45,39

Una vez obtenidos los datos se compararon entre cada uno de los tiempos para evaluar las posibles diferencias. Los datos de estos estudios estadísticos aparecen en la tabla 114 y en la gráfica 70.

Tabla 114: Estudio comparativo entre tiempos de los productos de degradación del colágeno (C2C) en el grupo CMG+PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C. INFERIOR	SUPERIOR	T	GL	SIG
BASAL-1MES	-15,36	40,89	9,14	-34,50	3,77	-1,68	19	0,109
BASAL-3MESES	3,44	60,32	13,84	-25,64	32,51	0,25	18	0,807
BASAL-6MESES	25,41	50,65	11,62	1,00	49,82	2,19	18	0,042
1MES-3MESES	21,15	44,84	10,57	-1,15	43,45	2,00	17	0,062
1MES-6MESES	44,23	70,70	16,66	9,08	79,39	2,65	17	0,017
3MESES-6MESES	19,61	40,16	9,74	-1,04	40,25	2,01	16	0,061

Gráfica 70: Evolución de los productos de degradación del colágeno (C2C) de los pacientes del grupo CMG+PRGF



† Diferencias con basal. ‡ Diferencias con 1 mes. # Diferencias con 3 meses

Como se aprecia en la gráfica 70, respecto a la diferencia entre tiempos de los productos de degradación del colágeno (C2C) en el grupo CMG+PRGF, se observaron diferencias entre basal y

6 meses, y entre 1 y 6 meses, existiendo a los 6 meses una disminución de este parámetro en comparación con los restantes tiempos.

Ácido Hialurónico (HA)

En la tabla 115 aparece el ácido hialurónico de cada uno de los pacientes del grupo tratado con CMG+PRGF y su evolución en el tiempo.

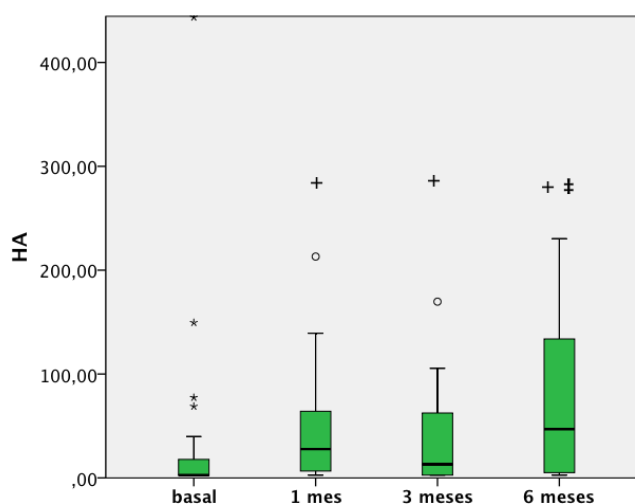
Tabla 115: Evaluación del ácido hialurónico en los pacientes del grupo CMG+PRGF

TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%	
				LÍMITEINFERIOR	LÍMITESUPERIOR
BASAL	23	38,01	95,15	19,84	-3,13
1 MES	23	97,55	194,19	40,49	13,58
3 MESES	21	62,27	130,13	28,40	3,04
6 MESES	21	107,76	190,07	41,48	21,24
TOTAL	88	76,01	157,53	16,79	42,63

En la tabla 116 y gráfica 71, se exponen los resultados obtenidos de comparar los valores de cada uno de los tiempos de estudio para poder evaluar la evolución de este parámetro en el tiempo.

Tabla 116: Estudio comparativo entre tiempos del ácido hialurónico en el grupo CMG+PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	-59,54	127,96	26,68	-114,87	-4,21	-2,23	22	0,036
BASAL-3MESES	-21,68	54,84	11,97	-46,65	3,28	-1,81	20	0,085
BASAL-6MESES	-66,39	115,07	25,11	-118,77	-14,01	-2,64	20	0,016
1MES-3MESES	40,83	119,59	26,10	-13,61	95,26	1,57	20	0,133
1MES-6MESES	-1,18	128,94	28,14	-59,87	57,52	-0,04	20	0,967
3MESES-6MESES	-43,55	76,18	17,48	-80,27	-6,83	-2,49	18	0,023

Gráfica 71: Evolución del ácido hialurónico de los pacientes del grupo CMG+PRGF

* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Los valores de ácido hialurónico en el grupo tratado con CMG+PRGF aumentó de manera progresiva desde el inicio del estudio, observándose diferencias estadísticamente significativas entre tiempo basal y el resto de tiempos evaluados, y entre 1 y 6 meses posteriores al tratamiento.

Grupo PRGF

C2C

En la tabla 117 aparecen los datos descriptivos para productos de degradación del colágeno (C2C) en el grupo PRGF.

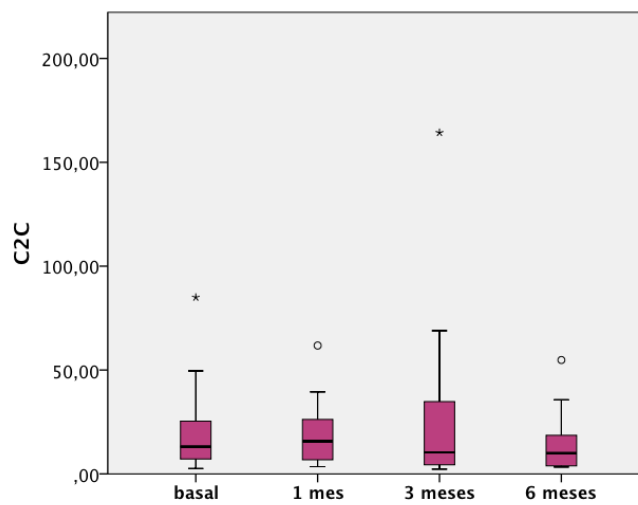
Tabla 117: Evaluación de los productos de degradación del colágeno (C2C) en los pacientes del grupo PRGF

TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95% LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	18	31,97	58,05	13,68	3,11
1 MES	18	43,10	76,65	18,07	4,98
3 MESES	16	39,45	69,57	17,39	2,38
6 MESES	15	29,43	62,71	16,19	-5,30
TOTAL	67	36,18	65,93	8,05	20,10

Una vez obtenidos los datos se compararon entre cada uno de los tiempos para evaluar las posibles diferencias. Los datos de estos estudios estadísticos aparecen en la tabla 118 y en la gráfica 72.

Tabla 118: Estudio comparativo entre tiempos de los productos de degradación del colágeno (C2C) en el grupo PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C.		T	GL	SIG
				INFERIOR	SUPERIOR			
BASAL-1MES	-5,95	25,33	6,33	-19,44	7,55	-0,94	15	0,363
BASAL-3MESES	6,77	12,77	3,30	-0,30	13,84	2,05	14	0,059
BASAL-6MESES	3,59	24,35	6,09	-9,39	16,56	0,59	15	0,565
1MES-3MESES	20,62	50,48	13,03	-7,33	48,57	1,58	14	0,136
1MES-6MESES	14,43	30,83	8,55	-4,20	33,06	1,69	12	0,117
3MESES-6MESES	-5,95	25,33	6,33	-19,44	7,55	-0,94	15	0,363

Gráfica 72: Evolución de los productos de degradación del colágeno (C2C) de los pacientes del grupo PRGF

* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Respecto a los productos de degradación del colágeno (C2C) en el grupo PRGF, se mantuvieron constantes a lo largo de todo el estudio, sin existir diferencias en ninguno de los tiempos de evaluación.

Ácido Hialurónico (HA)

A continuación, en la tabla 119 están reflejados de manera descriptiva los datos obtenidos sobre el ácido hialurónico en el suero de los pacientes del grupo PRGF.

Tabla 119: Evaluación del ácido hialurónico en los pacientes del grupo PRGF

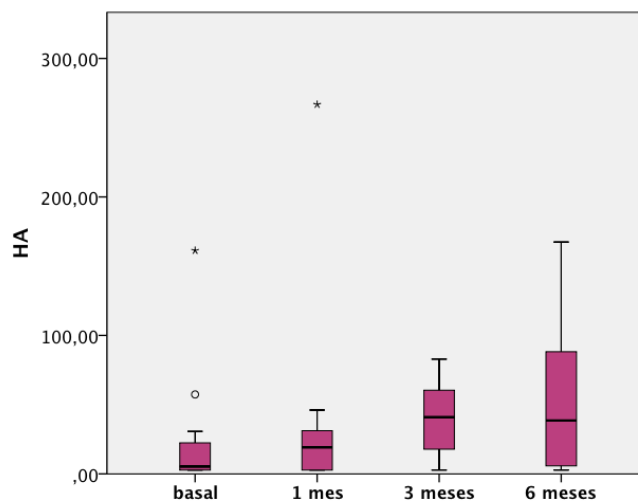
TIEMPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95% LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
BASAL	19	39,17	89,90	20,63	-4,17
1 MES	19	80,67	230,16	52,80	-30,26
3 MESES	17	95,88	234,20	56,80	-24,53
6 MESES	16	50,22	49,96	12,49	23,59
TOTAL	71	66,34	171,17	20,31	25,83

Una vez obtenidos los datos se compararon entre cada uno de los tiempos para evaluar las posibles diferencias. Los datos de estos estudios estadísticos aparecen en la tabla 120 y en la gráfica 73.

Tabla 120: Estudio comparativo entre tiempos del ácido hialurónico en el grupo PRGF

	MEDIA	DE	MEDIA ET	95% I.C. INFERIOR	SUPERIOR	T	GL	SIG
BASAL-1MES	-41,50	157,61	36,16	-117,47	34,46	-1,15	18	0,266
BASAL-3MESES	-53,28	153,97	37,34	-132,44	25,89	-1,43	16	0,173
BASAL-6MESES	-5,52	117,79	29,45	-68,28	57,24	-0,19	15	0,854
1MES-3MESES	-8,69	55,00	13,34	-36,98	19,59	-0,65	16	0,524
1MES-6MESES	43,36	265,13	66,28	-97,92	184,63	0,65	15	0,523
3MESES-6MESES	49,93	275,78	73,70	-109,30	209,16	0,68	13	0,51

Gráfica 73: Evolución del ácido hialurónico de los pacientes del grupo PRGF



* Diferencias con basal. † Diferencias con 1 mes. ‡ Diferencias con 3 meses

Como podemos ver en la gráfica anterior, en la valoración del ácido hialurónico del grupo tratado con PRGF, existió un aumento progresivo de los valores obtenidos, pero estos resultados no fueron estadísticamente significativos entre ninguno de los tiempos de estudio.

Estudio del Factor Tratamiento

Una vez evaluados estos parámetros de manera independiente dentro de cada grupo de estudio, se llevo a cabo una comparación entre grupos a tiempo basal, uno, tres y seis meses posteriores a la aplicación de los tratamientos.

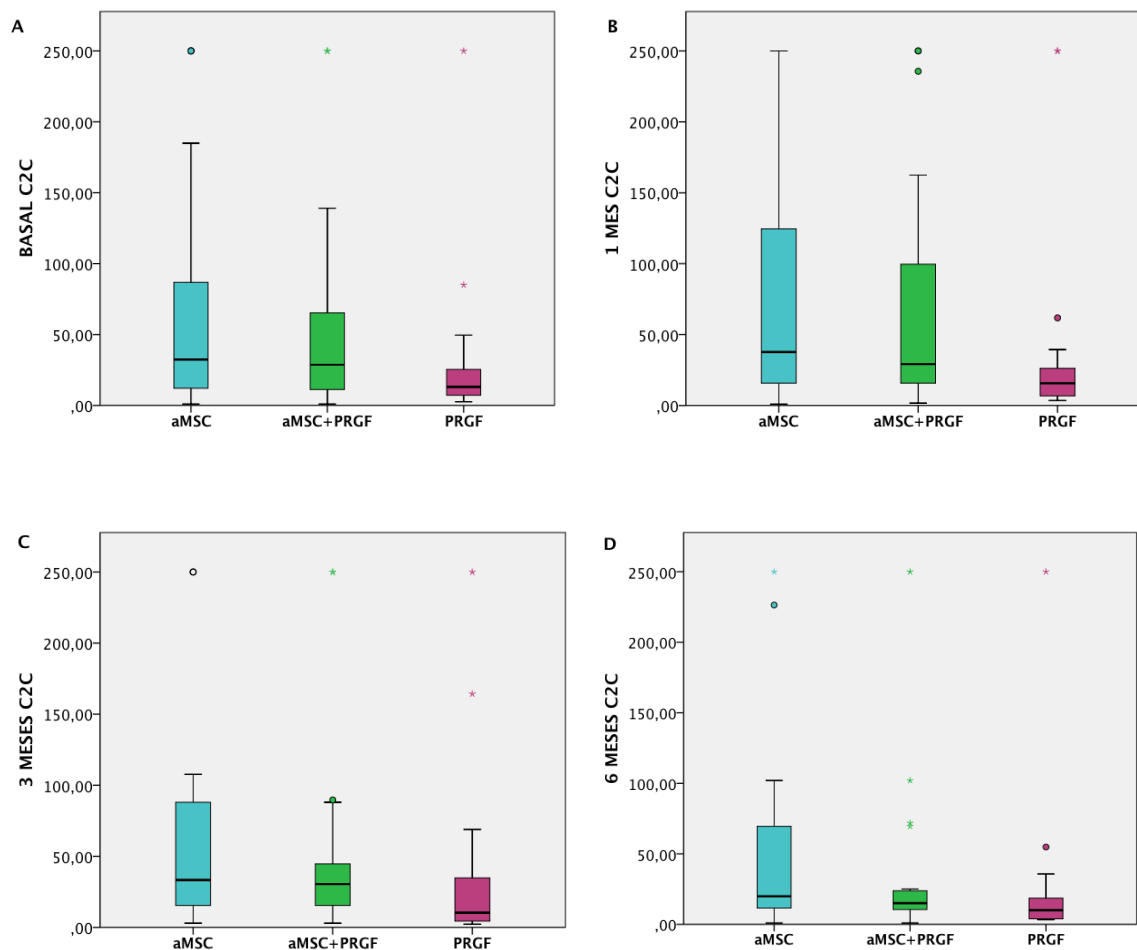
C2C

En la tabla 121 quedan reflejados los resultados obtenidos de comparar entre grupos los productos de degradación del colágenos en cada uno de los tiempos de estudio.

Tabla 121: Comparación entre grupos de los productos de degradación del colágeno (C2C) en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%		SIG
					LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	24	68,57	83,17	16,98	33,46	
	CMG+PRGF	21	56,55	73,25	15,98	23,21	0,282
	PRGF	18	31,97	58,05	13,68	3,11	
	Total	63	54,11	73,80	9,30	35,52	
1 MES	CMG	23	79,34	89,16	18,59	40,78	
	CMG+PRGF	20	70,24	85,58	19,14	30,18	0,384
	PRGF	18	43,10	76,65	18,07	4,98	
	Total	61	65,66	84,44	10,81	44,03	
3 MESES	CMG	22	64,30	80,50	17,16	28,60	
	CMG+PRGF	19	54,56	72,84	16,71	19,45	0,605
	PRGF	16	39,45	69,57	17,39	2,38	
	Total	57	54,08	74,39	9,85	34,34	
6 MESES	CMG	22	48,43	67,72	14,44	18,41	
	CMG+PRGF	19	36,13	58,38	13,39	8,00	0,650
	PRGF	15	29,43	62,71	16,19	-5,30	
	Total	56	39,17	62,70	8,38	22,38	

Gráfica 74: Comparación entre grupos de los productos de degradación del colágeno (C2C) en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

En los resultados obtenidos del estudio comparativo entre grupos, observamos que no existieron diferencias entre ninguno de los grupos de estudio en los tiempos evaluados para los productos de degradación del colágeno (C2C), existiendo en los tres grupos una disminución de los mismos.

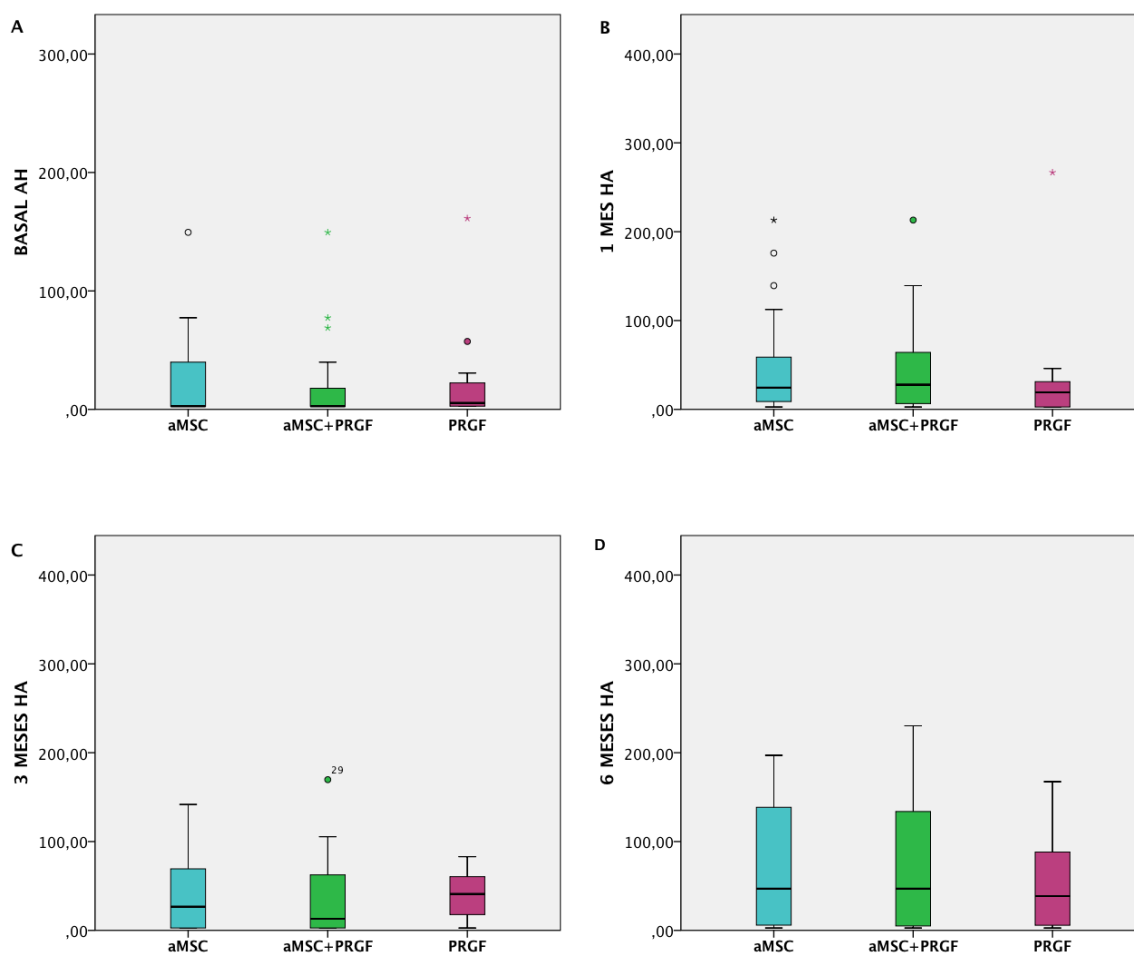
Ácido Hialurónico (HA)

A continuación, en la tabla 122 y en la gráfica 75 se exponen los resultados obtenidos de comparar entre grupos el análisis del ácido hialurónico en el suero de los pacientes en cada uno de los tiempos de estudio.

Tabla 122: Comparación entre grupos del ácido hialurónico en cada uno de los tiempos de estudio

	GRUPO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	INTERVALO CONFIANZA 95%		SIG
					LÍM.INF.	LÍM.SUP.	
BASAL	CMG	25	38,89	91,15	18,23	1,26	0,583
	CMG+PRGF	23	38,01	95,15	19,84	-3,13	
	PRGF	19	39,17	89,90	20,63	-4,17	
	Total	67	38,67	90,80	11,09	16,52	
1 MES	CMG	25	95,77	187,78	37,56	18,26	0,500
	CMG+PRGF	23	97,55	194,19	40,49	13,58	
	PRGF	19	80,67	230,16	52,80	-30,26	
	Total	67	92,10	199,73	24,40	43,38	
3 MESES	CMG	23	83,63	166,25	34,67	11,74	0,838
	CMG+PRGF	21	62,27	130,13	28,40	3,04	
	PRGF	17	95,88	234,20	56,80	-24,53	
	Total	61	79,69	174,90	22,39	34,90	
6 MESES	CMG	23	104,12	180,76	37,69	25,95	0,499
	CMG+PRGF	21	107,76	190,07	41,48	21,24	
	PRGF	16	50,22	49,96	12,49	23,59	
	Total	60	91,02	160,26	20,69	49,62	

Gráfica 75: Comparación entre grupos del ácido hialurónico en cada uno de los tiempos de estudio (A: basal. B: 1mes. C: 3meses. D: 6meses)



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo CMG), ‡ (grupo CMG+PRGF) ($p < 0.05$). Los círculos son outlier, que sí han sido incluidos en el estudio estadístico

Respecto a la comparación entre grupos del ácido hialurónico, igual que ocurre en el caso anterior con el C2C, no observamos ninguna diferencia entre los grupos evaluados en el estudio, en ninguno de los tiempos de valoración.

Estudio de la plataforma de fuerza

Puesto que no en todos los hospitales se disponía de la plataforma de fuerza para el estudio cinético de los pacientes, esta valoración sólo pudo realizarse en 8 animales que pertenecían a la Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

Este estudio tiene varias limitaciones que comentamos para no dar lugar a errores en la discusión de los resultados.

En primer lugar, el hecho de que no todos los pacientes hayan podido realizar este examen hace que los resultados no sean extrapolables a todos ellos.

Se ha realizado el estudio sólo en pacientes que pertenecían al grupo CMG para poder tener un grupo homogéneo que facilitase la lectura de estos resultados, pero esto nos impide poder saber las diferencias que podrían existir entre los 3 grupos del estudio.

Como ya hemos comentado en el apartado de materiales y métodos, para poder realizar una comparación en el % de PVF y de VI, por un lado se ha comparado a los pacientes con un grupo

de animales que no presentaban ninguna cojera (grupo control), y por otro lado se ha diferenciado en cada uno de los animales del grupo de CMG entre miembro más afectado o con más cojera (miembro tratado) y miembro menos afectado o con menos cojera (no tratado). En los 8 pacientes los controles se realizaron en los mismos tiempos de estudio que el resto de variables, es decir, en basal y a 1, 3 y 6 meses postratamiento.

Población

El peso medio de los animales incluidos en esta parte del estudio fue de $47,1 \pm 3,7$ kg (rango 41-53), con una edad media de $5,2 \pm 1,7$ años (rango 4-8). La velocidad media al caminar de ambos grupos (perros tratados y perros sanos) fue de $1,6 \pm 0,5$ m/s, sin existir diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0,06$). Los valores medios de PVF y VI aparecen reflejados en la tabla 123.

Tabla 123: Media y desviación estándar de PVF y VI en relación al peso corporal (N/N y N.s/N, respectivamente) aplicado sobre la extremidad afectada. Los valores reflejados pertenecen a cada una de las revisiones realizadas a los animales

DAYS	BASAL	1 MES	3 MESES	6 MESES
PVF ML	43,56±0,73	49,21±2,1	49,05±1,51	53,2±4,43
PVF LL	55,98±0,62	53,96±1,46	52,67±1,91	51,53±2,79
PVF S	47,40±1,43	47,74±1,34	47,95±1,35	47,94±1,65
VI ML	12,16±0,72	13,75±1,17	13,71±1,1	14,84±1,29
VI LL	16,09±1,01	15,51±1,28	15,12±1,45	14,83±1,54
VI S	14,51±0,47	14,62±0,41	14,67±0,42	14,67±0,51

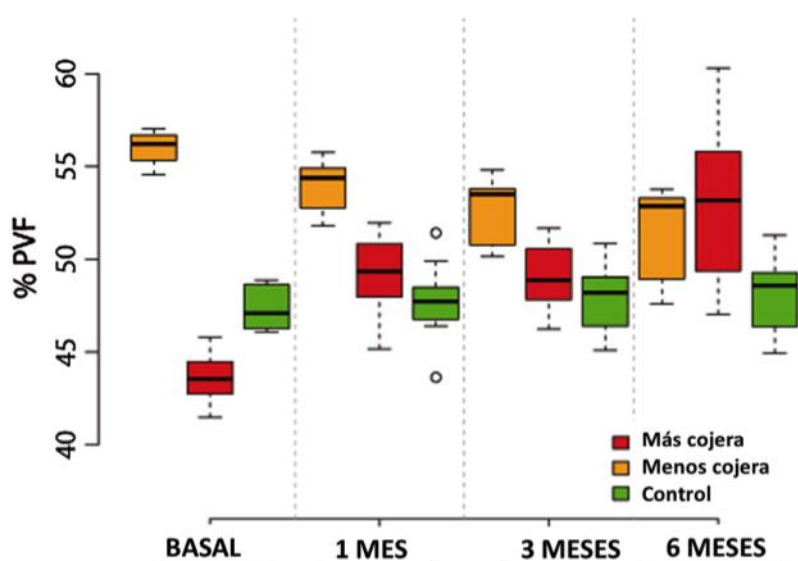
PVF ML: pico de fuerza vertical en el miembro más afectado del paciente. PVF LL: pico de fuerza vertical en el miembro con menos cojera. VI ML: Impulso vertical en el miembro más afectado. VI LL: impulso vertical en el miembro menos afectado. PVF S: pico de fuerza vertical en el grupo control. VI S: impulso vertical en el grupo control.

El modelo ha sido validado testando la normalidad y homocedasticidad de los datos ya normalizados con el peso con el test de Shapiro-Wilk para ambas variables ($p=0,67$ y $p=0,995$, respectivamente).

Análisis de PVF

Los resultados del análisis del pico de fuerza vertical aparecen reflejados en la gráfica 76.

Gráfica 76: Evolución del Pico de Fuerza Vertical (PVF) en el tiempo



El estudio de los miembros más afectados mostró diferencias estadísticamente significativas en % entre el tiempo basal y un mes de tratamiento ($p < 0,001$), sin embargo, no hubo diferencias con los otros tiempos ($p = 0,349$).

En la comparación con el grupo control, al comenzar el estudio (tiempo basal) el % de PVF era significativamente menor ($p < 0,001$), sin embargo estas diferencias desaparecieron en el resto de tiempos de estudio ($p = 0,499$).

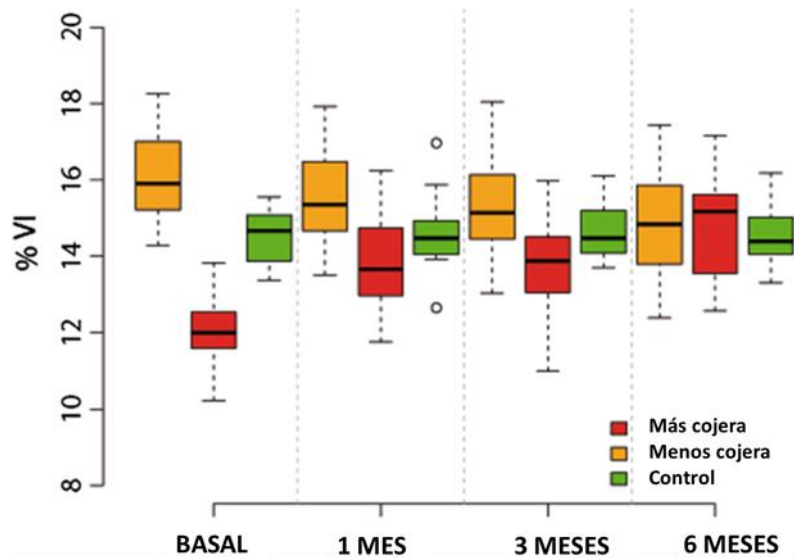
En los miembros con menor cojera, no hubo diferencias significativas al mes del tratamiento, ($p = 0,058$); mientras que a los 3 meses las diferencias sí fueron significativas ($p < 0,001$).

Cuando comparamos el grupo de estudio con el grupo control, el %PVF es significativamente mayor en basal ($p < 0,001$), al mes ($p = 0,03$) y a los 3 meses ($p = 0,015$). Sin embargo, a los 6 meses no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,14$).

Análisis de IV

Los resultados obtenidos del estudio sobre el impulso vertical aparecen reflejados en la gráfica 77.

Gráfica 77: Evolución del Impulso Vertical (IV) en el tiempo



El análisis de los miembros con más cojera mostró diferencias en % VI entre el examen basal y la evolución a 1 mes ($p < 0,001$). En el resto de tiempos de estudio no se presentaron diferencias estadísticamente significativas.

En la comparación con el grupo control, el porcentaje de VI en basal fue menor en el grupo de estudio ($p = 0,024$). A partir del primer tras el tratamiento y hasta los 6 meses de evolución los resultados no fueron significativos, por lo que el apoyo de la extremidad afectada fue similar a las extremidades sanas.

En el análisis de los miembros con menor cojera no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos de estudio ($p = 0,462$).

En la comparación de estos miembros con el grupo control, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún momento ($p = 0,876$).

En cuanto a la asociación entre los miembros más afectados y los menos afectados, existió una asociación negativa entre el % del PVF en los miembros menos afectados y los más afectados ($\beta_1 < 1$, $p = 0,010$). Sin embargo, en el % de VI no existió ninguna asociación entre los miembros menos y más afectados ($\beta_1 = 0$, $p\text{-val} = 0,61$).

Discusión

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.

Enfermedad degenerativa articular

En nuestro estudio, se ha evaluado la efectividad de la aplicación de CMG, PRGF y la combinación de ambos en el tratamiento de la EDA u OA. Ésta es una de las enfermedades con más prevalencia y morbilidad en la actualidad debido al aumento de la esperanza de vida en la sociedad actual, y a la prevalencia creciente de la obesidad (Lawrence et al., 2008). Además por su gravedad e irreversibilidad, se manifiesta como una pérdida colosal de la productividad humana, y una disminución de la calidad de vida de los pacientes, dando lugar a un profundo impacto social y económico en todo el mundo. Esta patología, es la forma más común de artritis y es la principal causa de problemas de movilidad en personas de la tercera edad (Shen y Chen, 2014).

Se ha pronosticado que el 25% de la población adulta, o más de 50 millones de personas en los Estados Unidos, se verán afectadas de OA en el año 2020, y será una de las principales causas de morbilidad y limitación física en las personas mayores de 40 años. Por otra parte, Kurtz y colaboradores, han previsto que el número total de cirugías de reemplazo articular en

los Estados Unidos en el año 2030, llegará 572.000 en la articulación de la cadera, y a 3.480.000 en la articulación de la rodilla (Kurtz et al., 2007).

Además del impacto bien documentado que ocasiona esta patología en la función física, la calidad de vida, la depresión y la ansiedad, hay una carga financiera significativa, con unos gastos médicos anuales superiores a 185 mil millones dólares solo en 2008 (Kotlarz et al., 2009).

La EDA se trata de una patología multifactorial en la que pueden intervenir gran variedad de factores de riesgo, los cuales pueden actuar tanto en la fase inicial, como en la progresión de la enfermedad. Entre estos factores se incluyen la edad, el sexo, lesiones traumáticas previas, la obesidad, disfunciones metabólicas y factores ambientales y genéticos (Shen y Chen, 2014).

En esta patología se producen cambios estructurales transitorios y progresivos en los tejidos articulares, especialmente en el cartílago articular, hueso subcondral, membrana sinovial y líquido sinovial, lo que da lugar al desarrollo de osteofitos y quistes en los márgenes de las articulaciones, afectando también el metabolismo de los condrocitos y la composición de la matriz extracelular, originando los principales síntomas clínicos que incluyen dolor crónico, inestabilidad de la articulación, rigidez y estrechamiento del espacio articular (Shen y Chen, 2014).

En medicina humana la OA afecta mayoritariamente a las articulaciones de la rodilla, la cadera, las pequeñas articulaciones de las manos, la columna vertebral y las articulaciones asociadas con sinovitis leve, causando dolor y rigidez articular (Camafeita, 2011). Sin embargo, en medicina veterinaria, concretamente en la especie canina, las articulaciones más afectadas por esta enfermedad son el codo, la cadera y la rodilla (Malek et al., 2012).

Algunos de los trastornos más críticos asociados con la OA son edema en el cartílago articular, erosión articular con proliferación concomitante de condrocitos, disminución de los proteoglicanos de la matriz, engrosamiento del hueso subcondral, deformación de la superficie articular, formación de osteofitos, hiperplasia sinovial de las células de la íntima, y fibrosis sinovial (Gelber, 2014).

Evaluación del modelo experimental

Para evaluar, y poder comparar de manera más efectiva la evolución de la patología, es necesario elegir un modelo animal cuya estructura articular se parezca lo máximo posible a la del ser humano, pudiendo así reproducir las cargas biomecánicas que se desencadenan en la patología del modelo elegido, y extrapolarlas a humana con el menor número de limitaciones posibles (Poole et al., 2010).

Otro de los factores que debemos tener en cuenta a la hora de escoger el modelo a estudiar, es que en este haya finalizado su crecimiento, y sea un animal esqueléticamente maduro, ya que la OA es una enfermedad que se da mayoritariamente en personas adultas, y los animales en crecimiento, al igual que los niños, tienen una mejor capacidad de regeneración del daño articular, pudiendo variar la respuesta a la creación de la lesión así como la respuesta a la terapia. Teniendo en cuenta todos estos factores y muchos otros, hoy en día, no existe ningún

modelo animal que reproduzca por completo los signos y síntomas de la OA humana (Poole et al., 2010).

Existen diversos modelos animales, como la rata, el ratón, el conejo y el cerdo para realizar estudios de investigación sobre este tipo de patologías que afectan a las articulaciones, ya que son económicos y de mayor o menor facilidad de manipulación (Kaux et al., 2012, Glasson et al., 2004). En el caso de especies como la rata, el ratón y el conejo, debido a su tamaño, tienen un manejo más complicado, un volumen insuficiente para la obtención de muestras para el seguimiento de la patología, a la vez que una difícil evaluación de diversos parámetros como por ejemplo la fuerza de apoyo o la movilidad de las articulaciones (Glasson et al., 2004). Además en estos modelos de reducido tamaño la enfermedad se limita en gran parte a las articulaciones de rodilla (Fernihough et al., 2004). En el caso de la especie porcina, presenta algunos inconvenientes para la investigación ortopédica debido al rápido crecimiento corporal que tiene esta especie, y al carácter que suelen tener estos animales, así como la dificultad en su manejo (Martini et al., 2001).

Otra especie utilizada en este tipo de estudios, son los primates no humanos. Éstos tienen la gran ventaja de ser el modelo más parecido al humano, pero cada vez se tiende a utilizar menos esta especie debido a la implicación emocional que supone hacer investigación con ellos, y a los aspectos legales que rodean su empleo como animales de experimentación (Martini et al., 2001).

En esta Tesis Doctoral, se ha optado por animales de la especie canina debido a que dentro de los animales domésticos y de experimentación, se trata de una de las especies con mayor facilidad de manejo, siendo un modelo biomédico prometedor para la evaluación de nuevas terapias regenerativas (Neff y Rine, 2006, Neupane et al., 2008).

Otro de los motivos de escoger la especie canina como modelo animal, es el mayor tamaño de las estructuras anatómicas, que hacen que para nuestro estudio clínico sea de mayor facilidad de acceso al espacio articular para la infiltración en el mismo, al igual que el acceso a la zona de recolección del tejido adiposo, para el posterior cultivo celular (Neff y Rine, 2006, Neupane et al., 2008).

En la mayoría de casos, para realizar estudios sobre OA, se debe inducir la misma, de diversas maneras ya que se tratan de animales de experimentación los cuales en principio están sanos y exentos de patologías. Para la inducción de la OA, existen diversas técnicas quirúrgicas que alteran la estabilidad articular, como por ejemplo con la realización de una transección del ligamento cruzado anterior, o mediante una menisectomía, en el caso de la

articulación de la rodilla (Lindhorst et al., 2000). Con este tipo de procedimientos la progresión de la enfermedad es más rápida en los modelos animales que en los seres humanos, sin embargo, el daño del cartílago observado en este tipo de modelos, se asemeja bastante al encontrado en la OA de rodilla humana. Por lo tanto, estos modelos han sido ampliamente utilizados para la evaluación de diversos tratamientos frente a la patología (Naik y Wala, 2014).

Otra forma de inducir la OA, es mediante la inyección intraarticular de diversos agentes químicos, como por ejemplo solución salina fisiológica, corticosteroides, estrógenos, colagenasa, yodo acetato monosódico, y quinolonas entre otros. Estos compuestos producen inflamación aguda con degeneración y degradación de la matriz extracelular, simulando las condiciones que se dan en el cartílago humano osteoartrósico (Thakur et al., 2012, Bendele, 2001, Murat et al., 2007).

Al igual que pasa en humanos, en los perros la OA también se puede dar de manera espontánea, dando lugar a cambios morfológicos que se asemejan de manera más exacta a las condiciones que tienen lugar en la patología en medicina humana, lo que nos permite entender mejor la progresión que tiene la enfermedad de manera fisiológica (Naik y Wala, 2014).

En nuestro caso, para conseguir el objetivo del estudio, hemos elegido animales de la especie canina que padeciesen OA de forma fisiológica y estuviesen exentos de otras patologías, simulando así lo máximo posible las condiciones que se dan en esta patología en los seres humanos. Entre estas condiciones destaca el dolor, el cual es uno de los síntomas más problemáticos de la patología. Existen estudios donde se ha determinado que el hecho de que en los modelos animales a estudiar la OA ocurra de manera natural, representa mejor el dolor a la hora de poder extrapolarlo a los humanos que en los modelos donde se ha inducido la enfermedad de manera artificial (Poole et al., 2010).

A parte de estas características, hay que destacar que los pacientes de nuestro estudio son animales domésticos, los cuales tienen una mayor esperanza de vida, acompañada de una mejor calidad de vida, ya que estos canes conviven en casa con sus respectivos propietarios, por lo que presentan un seguimiento continuo por parte de los mismos, dando lugar a un control más exhaustivo de la evolución de la patología.

Uso de CMG

El uso de las células madre se encuentra cada vez más extendido en diversos campos de la medicina actual. En los últimos años ha existido un incremento cada vez mayor del número de artículos relacionados con este tema. Si buscamos en la base de datos *PubMed* la palabra *Stem Cells*, en el año 2000, existieron un total de 4691 artículos relacionados con las células madre, en cambio, si buscamos en el pasado año 2014, existen 221322 artículos. Estos datos nos dan una idea de la importancia creciente del conocimiento de las células madre en la medicina actual.

Las células madre, son un tipo especial de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades y llegar a producir células especializadas, siendo las características que las definen su capacidad de autorrenovación, su multipotencialidad y la viabilidad funcional de las células que generan (Diekman y Guilak, 2013, Cahan y Daley, 2013).

Dentro de las células madre existen varias clasificaciones según su capacidad de diferenciación o según su origen (Kolios y Moodley, 2013).

Según su origen hay que destacar las células madre de origen embrionario (ESC) y las células madre adultas (ASC). Las ESC, debido a su procedencia, son objeto de uno de los debates más polémicos en los últimos años en el campo de la bioética (Aznar Lucea y Martínez, 2012).

El uso clínico de las ESC ha estado y está muy limitado en la actualidad. Al tratarse de un material alogénico, es muy difícil que las líneas celulares que derivan de ellas sean inmunológicamente compatibles con el paciente que pudiera recibirlas, por lo que consecuentemente, en un alto porcentaje de casos, pueden crear problemas de rechazo, debiendo recibir pacientes que utilizan este tratamiento terapia inmunosupresora durante el resto de su vida, circunstancia clínica muy negativa para ellos. Otro problema añadido, es que por su extrema indiferenciación, existe riesgo de que puedan producir teratomas en los pacientes que las reciben. Estos grandes inconvenientes, junto con la valoración ética negativa que tiene su uso, ha hecho que hasta el momento sean muy escasos los ensayos clínicos realizados utilizando ESC (Aznar Lucea y Martínez, 2012).

Por estos motivos, y sobre todo ante la consideración de que el embrión temprano es un ser humano, y que, para obtener las ESC hay que destruir un blastocisto (embrión humano de entre 150 y 200 células), se planteó la necesidad de utilizar células madre que pudieran sustituir a las embrionarias, es decir unas células cuyo uso no conllevara dificultad ética alguna, lo que abrió el camino a la obtención de las ASC (Aznar Lucea y Martínez, 2012, Yao et al., 2006).

Las ASC son un nuevo campo de estudio que se encuentra en expansión. Estas células, se obtienen de cualquier tejido del organismo adulto que derive de las 3 capas germinales y tenga capacidad de reparación o regeneración, así como de tejidos como placenta y cordón umbilical (Timmins et al., 2012, Yang et al., 2012). A su vez, estas células se dividen en células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimales (MSC). Entre las fuentes de obtención de las MSC existen multitud de tejidos como médula ósea, placenta (Timmins et al., 2012), cordón umbilical (Yang et al., 2012), músculo esquelético (Jackson et al., 2011), cápsula sinovial (Jones y Pei, 2012), líquido sinovial (Jones et al., 2008), y tejido adiposo entre otros (Black et al., 2008, Yarak y Okamoto, 2010).

En nuestro estudio hemos escogido las MSC derivadas del tejido adiposo (CMG), debido en primer lugar, a que proceden de un organismo adulto, con lo cual, no plantean ningún problema ético en su obtención. Además, al tratarse de células autólogas, es decir, que

proviene del propio individuo a tratar, no plantean problemas de rechazo, ni existe necesidad alguna de pautar ningún tratamiento inmunosupresor previo o posterior al tratamiento (Mizuno et al., 2012, Lisiany, 2013). Otro de los motivos que nos llevó a escoger esta fuente de obtención de MSC, es la abundancia de tejido adiposo que existe de forma fisiológica en el organismo adulto, lo que hace más fácil su recolección para el cultivo celular. Además se puede obtener en grandes cantidades y causando mínimas molestias en el individuo.

En cuanto a las características positivas que presentan estas células, existen estudios en los que se ha demostrado que la capacidad multipotencial de las CMG es mayor que la de otros tejidos de origen como pueden ser la médula ósea y la sangre de cordón umbilical (Schaffler y Buchler, 2007, Kern et al., 2006, Wagner et al., 2005, Schwarz et al., 2011). Por otra parte, el tejido adiposo posee un elevado rendimiento, ya que con cantidades muy pequeñas de muestra, se pueden obtener un número muy elevado de células funcionalmente activas (Noth et al., 2008, Mizuno, 2009). Entre todas estas características, destaca la capacidad de diferenciación. Existen estudios como los del equipo de Lopa, o Guercio, donde vieron que las células que derivan de este tejido tienen una elevada capacidad de diferenciación a condrocitos, osteocitos y diversos tipos celulares muy útiles en la reparación de la OA, lo que nos ayuda a mejorar la sintomatología y evolución de la enfermedad (Lopa et al., 2014, Lopa et al., 2013, Guercio et al., 2012).

En medicina humana, el tejido adiposo que se utiliza para el cultivo celular, se recolecta a través de procedimientos de liposucción, sobre todo de grasa de la zona abdominal, ya que es una técnica que produce un menor grado de molestias para el paciente y una menor morbilidad en la zona donante que otros métodos de obtención celular (Fraser et al., 2006, Mizuno, 2009).

En cambio, en medicina veterinaria, este tejido se obtiene mediante procedimientos quirúrgicos abiertos o a través de procedimientos laparoscópicos. Existen diversos estudios realizados en la especie canina, donde han extraído MSC del tejido adiposo de diferentes localizaciones anatómicas, entre las que se encuentran el ligamento falciforme (Bigham-Sadegh et al., 2012), la región torácica lateral (Haghighat et al., 2011), la región escapular caudal (Chung et al., 2013), la grasa intra-abdominal o subcutánea obtenida durante cirugía de ovariectomía (Martinello et al., 2011, Reich et al., 2012), la grasa de la zona glútea (Kang et al., 2012) y la región inguinal (Guercio et al., 2012, Oh et al., 2012).

De entre todas las opciones, en esta tesis doctoral, hemos escogido la región inguinal, al igual que Guercio y colaboradores y Oh y colaboradores, debido a la facilidad de acceso a la

zona, las mínimas molestias para el paciente y la rápida recuperación post quirúrgica tras el procedimiento (Guercio et al., 2012, Oh et al., 2012). Otro de los motivos de escoger esta región, es debido al elevado rendimiento celular que se obtiene de la grasa aislada a partir de la zona inguinal, ya que como se ha demostrado en un estudio reciente realizado por Astor y colaboradores, el tejido adiposo de mayor calidad a partir del cual se obtiene un mayor número de células viables por gramo, es del obtenido a partir de grasa de la región inguinal o de la pared torácica (Astor et al., 2013).

Coincidiendo con otros autores, hemos visto que los perros tratados con infiltración intraarticular de CMG, mostraron una mejoría funcional en su sistema locomotor evaluándolo a través de veterinarios cualificados y mediante la apreciación por parte de los propietarios con una escala preestablecida (Guercio et al., 2012, Black et al., 2008, Black et al., 2007, Cuervo et al., 2014). Estos resultados indican que la OA mejora con el tiempo, probablemente debido a la actividad condroprotectora, inmunomoduladora y antiinflamatoria que poseen este tipo de células, ya que se ha demostrado que estas células secretan citoquinas y factores de crecimiento que estimulan la recuperación, fomentando la proliferación y diferenciación celular (Maumus et al., 2013, Manferdini et al., 2013, Caplan y Dennis, 2006, Gimble et al., 2007).

Uso de PRGF

El uso del PRP proporciona una fuente autóloga de factores de crecimiento y otras proteínas biológicamente activas como el fibrinógeno, la fibronectina o la vitronectina, localizadas en los gránulos alfa de las plaquetas y en el plasma (Anitua et al., 2004).

Estas sustancias se utilizan en el tratamiento de diversas patologías acelerando los procesos fisiológicos de curación que tienen lugar en el organismo. Tienen la ventaja de encontrarse en equilibrio biológico con el mismo y, al ser autólogos y proceder del propio paciente, desaparecen los riesgos potenciales derivados de una reacción inmunológica adversa (Anitua et al., 2004, Andia et al., 2010).

El término PRP es un término genérico poco preciso, que engloba una gran cantidad de productos biológicos obtenidos a partir de la propia sangre del paciente que presentan una concentración plaquetaria por encima de los niveles basales (Dohan Ehrenfest et al., 2014). El hecho de no utilizarse una nomenclatura precisa para estos diferentes productos biológicos, llamados todos PRP, ha hecho que existan gran variedad de resultados, muchos de ellos contradictorios (Andia et al., 2010, Anitua et al., 2004).

Esta terminología ha creado mucha confusión y debates en la comunidad científica ante la falta de homogeneidad en las técnicas de obtención (Dohan Ehrenfest et al., 2014). Encontramos múltiples protocolos para el aislamiento del PRP, que se diferencian entre ellos, en puntos tan esenciales como el volumen de sangre necesario para el aislamiento, el protocolo de centrifugado, el número de centrifugaciones, el volumen de PRP aislado o la metodología de fraccionamiento, obteniendo productos sanguíneos autólogos con concentraciones plaquetarias y celulares muy distantes, también variables en cuanto a las concentraciones de los diferentes factores de crecimiento y citoquinas. Estas distinciones, tanto cualitativas como cuantitativas en la composición de los diferentes PRP, se podrían asociar a respuestas biológicas diferentes y, por tanto, influenciar de manera muy diversa el proceso de reparación tisular (Dohan Ehrenfest et al., 2014, Anitua et al., 2009, Andia et al., 2012).

En esta tesis doctoral se ha empleado PRGF (Plasma rico en factores de crecimiento), un tipo de PRP, cuya metodología de obtención se describió por el Dr. Eduardo Anitua y su grupo de colaboradores en el centro BTI® Biotechnology Institute de Vitoria. Este término (PRGF) fue empleado por primera vez por Eduardo Anitua en 1999, quien lo definió como una fracción de plasma autólogo con una concentración plaquetaria ligeramente superior a la basal, libre de leucocitos y eritrocitos, aislada mediante un proceso de centrifugación único y un posterior pipeteo fraccionado, y en la que se utiliza citrato sódico como anticoagulante y cloruro de calcio como activador plaquetario (Anitua, 1999).

Toda esta rigurosidad científica y metodológica le ha permitido obtener las certificaciones sanitarias europeas (marcado CE) y norteamericanas (FDA Approval), para su desarrollo como medicamento.

Una de las principales diferencias del PRGF con respecto a otros PRP, es que el PRGF no contiene leucocitos, ya que durante el proceso de pipeteo no se aspira la capa leucocitaria. Esto es muy importante, ya que dentro de los leucocitos, los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) contienen moléculas diseñadas para matar los microorganismos y éstas pueden dañar seriamente los tejidos del cuerpo. Por ejemplo, los PMNs son importantes productores de MMP, principalmente MMP-8 y MMP-9, que pueden dificultar la regeneración de tejido dañado. Los PMN también producen radicales libres y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que pueden destruir no sólo microorganismos, sino también las células circundantes (Anitua et al., 2012a). Otra de las características del PRGF es que presenta una concentración moderada de plaquetas, 2 ó 3 veces la concentración de la sangre periférica, lo cual ha sido relacionado con un óptimo efecto biológico, ya que concentraciones de plaquetas más bajas

pueden conducir a efectos subóptimos, mientras que concentraciones más altas podrían tener un efecto inhibitorio (Anitua et al., 2009, Weibrich et al., 2004, Anitua et al., 2012a).

Entre los efectos que el PRGF tiene sobre las células, destacan:

- Estimulación de la producción de vasos sanguíneos.
- Influyen en la multiplicación y la migración de células adyacentes.
- Promueven la diferenciación de células madre hacia la estirpe celular requerida.
- Favorecen la síntesis de la matriz extracelular.
- Evitan la multiplicación de bacterias.
- Modulan la inflamación, disminuyendo el dolor.

En nuestro estudio, coincidiendo con otros autores de medicina humana, hemos obtenido resultados muy favorables en la aplicación de PRGF para el tratamiento de articulaciones osteoartrosicas (Anitua et al., 2014, Wang-Saegusa et al., 2011, Vaquerizo et al., 2013).

Hay que destacar que los estudios que se encuentran en la base de datos *PubMed* realizados con PRGF para el tratamiento de la OA en la especie canina, únicamente son los realizados por nuestro equipo de investigadores (Cuervo et al., 2014, Vilar et al., 2014, Vilar et al., 2013), ya que aunque sí que hay estudios realizados en esta especie, se ha utilizado otra metodología de obtención del PRP con resultados igualmente satisfactorios (Kazemi et al., 2014).

La aplicación del PRP en las articulaciones osteoartrosicas produce una aceleración de los procesos fisiológicos de regeneración y reparación que ocurren de manera fisiológica en los tejidos tras una lesión. Este PRP tiene el potencial de cubrir los defectos que se dan en el cartílago osteoartrosico para mejorar así la reparación del mismo, atenuando los síntomas de la patología y mejorando la función articular, pudiendo darse en algún caso unos pocos o mínimos efectos adversos (Xie et al., 2014).

Este proceso se basa sobre todo en el efecto que ejercen estos factores o citocinas anabólicas produciendo una acción condroprotectora y condroregenerativa. Específicamente, estos factores estimulan los condrocitos y las MSC del entorno provocando una proliferación de los mismos, además promueven la síntesis de condrocitos a través de agreganos y colágeno tipo II, conducen a la diferenciación condrogénica de las MSC, previenen la apoptosis de condrocitos y MSC, y disminuyen los efectos catabólicos de citoquinas inflamatorias, tales como IL-1 β , y MMPs (Xie et al., 2014).

El efecto antiinflamatorio que tienen estos factores en la patología, es uno de los puntos clave en el tratamiento de la misma, ya que se trata de uno de los factores limitantes más importantes. Este efecto se debe a que el PRP disminuye el efecto que tiene la IL-1 β en la articulación artrósica. Además, la IL-1 β induce la activación del factor nuclear Kappa B (NF- κ B), una de las vías principales involucradas en la patogénesis de la OA. Existe un estudio en el que se ha demostrado que el PRP inhibe completamente esta vía mediante el aumento de la expresión del gen del HGF y del TNF- α (Bendinelli et al., 2010). Otro estudio también ha demostrado esta actividad antiinflamatoria y antiapoptótica de condrocitos que tiene el PRP, concretamente a través del IGF-1 y del PDGF-bb, los cuales suprimen una vía de activación de enzimas catalíticas (Src / PI3K / Akp) inducida también por la IL-1 β (Montaseri et al., 2011).

Con los resultados que hemos obtenido, coincidiendo con Anitua y colaboradores, al igual que con otros investigadores (Anitua et al., 2014, Wang-Saegusa et al., 2011), podemos decir que la evidencia clínica actual sugiere que las infiltraciones intraarticulares de PRGF en pacientes con OA son un tratamiento prometedor para las lesiones del cartílago, ya que alivian los síntomas, reducen el dolor y por lo tanto son clínicamente eficaces en el tratamiento de la patología. Este efecto es debido sobre todo a sus tres propiedades biológicas. En primer lugar, el PRP tiene un efecto anabólico en condrocitos, MSC y sinoviocitos, produciendo un aumento en la proliferación celular, MEC cartilaginosa y secreción de HA. En segundo lugar, el PRP puede actuar como un andamio celular bioactivo para llenar defectos y mejorar la regeneración del cartílago. Y en último lugar, el PRP tiene el potencial para inhibir la inflamación y aliviar los síntomas de la OA con un perfil de seguridad clínicamente aceptable (Xie et al., 2014).

Aunque la mayoría de la evidencia publicada favorece el uso del PRP para el tratamiento de la OA, esta terapia sigue siendo impredecible debido a la heterogeneidad significativa entre los estudios y la variabilidad en las preparaciones de PRP, por ese motivo en nuestro estudio hemos utilizado el PRGF, ya que se trata de una técnica validada y registrada con una efectividad demostrada y unos mínimos efectos adversos (Anitua et al., 2014).

Debemos destacar que en esta tesis doctoral hemos obtenido resultados favorables en los tres grupos de tratamiento, siendo el infiltrado con PRGF, el que ha tenido una mejoría menor en comparación con los otros grupos. Uno de los motivos a los cuales puede deberse esto, es a la pauta de aplicación del PRGF, ya que para poder compararlo con los otros grupos, únicamente hemos realizado una infiltración intraarticular única, mientras que en humana los estudios que se han realizado con el uso de PRGF para el tratamiento de lesiones

osteoartrósicas utilizan una pauta a seguir de aproximadamente 3 infiltraciones seriadas, separadas entre si unas 2-3 semanas (Wang-Saegusa et al., 2011, Vaquerizo et al., 2013).

Combinación MSC y PRP

Respecto al uso conjunto del PRP junto con las MSC, los estudios realizados con la combinación de estas terapias, tanto *in vivo* como *in vitro*, son pocos y recientes.

En la parte *in vitro* de nuestro estudio, hemos observado que el uso de PRGF en combinación con las CMG en el medio de cultivo, favorece la proliferación y la adherencia de las MSC, dando lugar a un mayor rendimiento celular (Rodríguez-Jiménez F.J et al., 2012). Estos resultados apoyan los obtenidos durante el estudio *in vivo* con los animales, ya que observamos que el uso de CMG en combinación con PRGF potencia el efecto de las CMG, observándose resultados más favorable que los obtenidos únicamente con el uso de PRGF.

En el estudio *in vitro* realizado por Bernardo y colaboradores también se obtuvieron resultados acordes con los nuestros, estos observaron una potenciación del efecto del PRP sobre el cultivo de las MSC. El estudio se llevo a cabo con un concentrado de plaquetas como sustituto del suero bovino fetal en cultivos de MSC, obteniendo resultados muy favorables con este suplemento plaquetario. Observaron que el PRP añadido al medio de cultivo conserva el efecto inmunorregulador de las MSC. Además, actúa disminuyendo la actividad citotóxica

inducida por alo-antígenos, favorece la diferenciación a favor de CD4+ en subconjuntos de células T, y aumentan la secreción temprana de IL-10, así como un aumento notable de la producción de IL-6. El PRP en el medio también demostró resistencia celular a la transformación espontánea en las células tumorales, mediante el cariotipo molecular y el mantenimiento de la morfología normal/fenotipo después de un cultivo prolongado (Bernardo et al., 2007).

En otro estudio realizado *in vitro* por Chieragato y colaboradores, se observó que un cultivo suplementado compuesto con un 3% de plasma pobre en plaquetas humano (HPPP) con un cóctel de citoquinas formado por EGF, bFGF y PDGF-BB, mejora la proliferación de las CMG en comparación con un medio suplementado con FBS. Además se demostró que la adición de PRP para el suplemento descrito o únicamente el PRP aumenta la diferenciación de las MSC a los linajes adipogénico y osteogénico (Chieragato et al., 2011).

In vitro ha quedado demostrado que el PRP estimula la migración, adhesión y proliferación de las MSC, mejora su diferenciación condrogénica además de estimular significativamente la síntesis de GAG por parte de los condrocitos tendiendo a aumentar el nivel de col-II (Zhu et al., 2013b).

Todos estos resultados nos hacen pensar que al igual que el comportamiento de las MSC cultivadas con PRP producen un beneficio en cuanto su crecimiento y calidad, la asociación de estos productos *in vivo* obtendrá un mayor beneficio que la utilización de los mismos por separado. En esta tesis doctoral, en el estudio *in vivo*, también hemos obtenido resultados muy satisfactorios con el uso de PRGF junto con CMG. Los animales tratados con la combinación de estos productos obtuvieron una mejora significativa en la funcionalidad de las articulaciones, en comparación con los animales tratados únicamente con PRGF. Estos resultados coinciden con los de Broeckx y colaboradores, los cuales realizaron un estudio clínico en lesiones ortopédicas en caballos, observando una mejora clínica significativa en los animales tratados con una combinación de PRP y MSC (Broeckx et al., 2014).

En un estudio realizado en humana por Koh y colaboradores en 2014, con pacientes que presentaban una deformidad angular en las articulaciones de la rodilla tratada mediante una osteotomía tibial (OT), compararon dos grupos de estudio, el primero tratado mediante OT+PRP, y el segundo con OT+PRP+MSC. El grupo que fue tratado con OT+PRP+MSC obtuvo mejores resultados en la escala de valoración del dolor KOOS y en la VAS. Además, una vez retirada la placa de la OT mediante artroscopia, se observó que el 50% de los pacientes que

llevaban MSC además del PRP presentaban una cobertura del defecto, mientras que en el grupo tratado con PRP esta cobertura solo llegaba al 10% de los pacientes (Koh et al., 2014).

Estos resultados apoyan nuestros resultados, sobre que el PRP en combinación con las MSC producen una reparación mucho más rápida y funcional de los defectos, debido al efecto sinérgico que se produce con la combinación de ambas terapias. Debemos resaltar que en nuestro estudio, los resultados obtenidos tienen diferencias significativas entre el grupo tratado con PRGF y los grupos tratados únicamente con CMG y con la combinación de CMG+PRGF. Estas diferencias no se observan entre los grupos tratados con CMG y con CMG+PRGF a lo largo del estudio. Nuestra hipótesis es que el PRGF en combinación con las CMG potencia el efecto de las mismas manteniéndose durante más tiempo los efectos beneficiosos. De manera que, al haber realizado el estudio sólo hasta los 6 meses, los resultados obtenidos en ambos grupos son aproximadamente igual de beneficiosos, sin embargo creemos que la diferencia entre estos dos grupos aparecerá a más largo plazo, ya que como hemos comentado con anterioridad la calidad del crecimiento en el medio de las CMG es mayor con la presencia de PRGF que cuando se cultivan solas.

Variables del estudio

Los resultados de nuestro estudio clínico aleatorizado, indican que una única inyección intraarticular de CMG o de CMG+PRGF, es significativamente más eficaz que una inyección intraarticular de PRGF en la reducción del dolor, la mejora de la limitación funcional y la calidad de vida de perros con OA. Para el conocimiento del grupo investigador, hay que destacar que el presente estudio es el primero que demostró que los tres tratamientos aplicados reportaron buenos resultados desde el primer mes post-tratamiento, hasta los seis meses posteriores al mismo, aunque los mejores resultados se observaron a los 6 meses en los pacientes tratados con CMG o con una combinación de las mismas con PRGF.

Los datos obtenidos en el presente estudio apoyan el uso de estas terapias como tratamiento para la OA.

Escala Bioarth

Dentro de la escala bioarth, uno de sus puntos clave, es la valoración radiológica de las extremidades afectadas.

La radiografía convencional es uno de los métodos de evaluación de la EDA, y se utiliza como una técnica simple por su disponibilidad y accesibilidad, aunque existe controversia en cuanto a su utilidad como método de valoración para evaluar la respuesta a diversos tratamientos (Braun y Gold, 2012).

Existen estudios como los de Toghraie y colaboradores, en los cuales se observó que la OA en conejos tratados con CMG mostró cambios radiográficos 20 semanas después de la infiltración (Toghraie et al., 2012). Contrariamente al estudio anterior, en nuestro estudio, no observamos una evolución radiológica de la patología en ninguno de los 3 grupos de estudio, es decir, radiográficamente la OA se mantuvo estable a lo largo de los 6 meses que duró el estudio. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en otros estudios (Kon et al., 2013, Silva et al., 2013). Silva y colaboradores, por ejemplo, realizaron un estudio también en la especie canina, en el cual no observaron diferencias significativas en el examen radiográfico entre el grupo de animales tratados con PRP y el grupo control tratado con nutraceuticos después de una cirugía del ligamento cruzado anterior (Silva et al., 2013).

Una razón para explicar nuestros resultados, podría estar relacionada con las limitaciones técnicas para detectar y evaluar la progresión de la OA mediante radiografía convencional. Nosotros evaluamos y puntuamos de manera ciega las radiografías de los diferentes grupos, sin obtener diferencias significativas. Estos resultados no significan necesariamente que no existiesen cambios a nivel de la estructura del cartílago, simplemente con la radiografía convencional no podemos llegar a valorar estos cambios. Para poder demostrar esto, se debería haber llevado a cabo un estudio de imágenes por RM, la cual es uno de los métodos más avanzados para evaluar estas estructuras con mayor detalle, o bien haber realizado biopsias de cartílago de las articulaciones afectadas para un posterior análisis histopatológico de las mismas (Roemer et al., 2011a, Centeno et al., 2008). Estas evaluaciones complementarias no se realizaron debido a las complicaciones que implicaba para los propietarios en el caso de las biopsias de cartílago, y a la falta de medios en los diferentes centros en el caso de la RM.

Otro de los puntos a tener en cuenta en la escala bioarth, es la limitación funcional de los animales. En esta valorábamos parámetros relacionados con la funcionalidad de las

articulaciones afectadas, como cojera, resistencia a subir escaleras, y dificultad para levantarse entre otros. Como ya hemos mencionado anteriormente, en esta patología, debido a la degeneración y desgaste que tiene lugar en las articulaciones, disminuye la funcionalidad de las mismas, limitando el poder realizar funciones o trabajos cotidianos. En los tres grupos de estudio, hemos visto una mejora de estos parámetros en relación al tiempo basal, obteniendo mejores resultados a los 6 meses posteriores al tratamiento, en los grupos tratados con CMG y CMG en combinación con PRGF, en comparación con el grupo tratado únicamente con PRGF, en el cual también se ha observado una mejoría, pero menor que en los grupos anteriores.

Hemos obtenido muy buenos resultados también, en la valoración de la movilidad articular. En la EDA, existe una disminución del rango de movilidad de las articulaciones afectadas, a la vez que se da una atrofia de la musculatura circundante produciendo una disminución de la funcionalidad que tiene un efecto perjudicial sobre la capacidad de llevar una vida normal (Juni et al., 2006). Nuestros resultados muestran una mejora de cada uno de estos parámetros en los diversos grupos de estudio, aumentando el rango de movilidad de las articulaciones evaluadas, a la vez que disminuye el dolor de las mismas, siendo significativamente más favorables los resultados obtenidos a los 6 meses en los grupos tratados con CMG, y CMG junto con PRGF.

Existen diversos estudios, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, que han obtenido resultados similares a los nuestros, en pacientes tratados con CMG, PRP o la combinación de ambos tratamientos, utilizado escalas de valoración o cuestionarios diferentes al que hemos utilizado en nuestro caso, pero cuyo fin es valorar los mismos parámetros (Black et al., 2007, Black et al., 2008, Rayegani et al., 2014, Vilar et al., 2014, Vilar et al., 2013, Guercio et al., 2012, Davatchi et al., 2011).

Respecto al tratamiento con CMG, unos de estos ejemplos, son los estudios realizados por Black y colaboradores, en la especie canina, en los cuales evaluaron la efectividad de la aplicación de CMG en perros con OA, obteniendo resultados muy favorables a los 6 meses posteriores al tratamiento, disminuyendo la cojera, el dolor a la manipulación y aumentando el rango de movilidad entre otros parámetros evaluados (Black et al., 2008, Black et al., 2007).

Guercio y colaboradores también aplicaron CMG en perros con EDA en codo en los cuales observaron una mejora de la funcionalidad articular y una reducción de la cojera (Guercio et al., 2012).

En medicina humana, uno de estos ejemplos, sería el estudio realizado por Orozco y colaboradores en el cual trataron pacientes que padecían OA de rodilla mediante MSC

infiltradas intraarticularmente, produciéndose una mejora en los signos clínicos y funcionalidad articular (Orozco et al., 2013).

En cuanto al uso exclusivo PRP, en un estudio realizado en la especie canina, donde evaluaban parámetros como cojera y dolor en pacientes con OA, se observó una disminución de los mismos 12 semanas tras haber realizado una única infiltración de PRP (Fahie et al., 2013).

Otro estudio realizado en medicina humana en pacientes con OA, escogieron un grupo control, el cual realizaba únicamente ejercicios terapéuticos para combatir la enfermedad, y lo compararon con otro grupo en el cual además de los ejercicios, se realizó dos infiltraciones de PRP con un intervalo de 4 semanas entre ellas. Los resultados de este estudio, demostraron que en los pacientes tratados con PRP, se produjo una disminución del dolor y la rigidez articular, a la vez que mejoró la calidad de vida de los pacientes (Rayegani et al., 2014).

Por último, respecto al uso de PRP junto con CMG, un estudio realizado por Koh y Choi, en el que trataron a pacientes que padecían OA con una infiltración intraarticular de CMG en combinación con PRP y un desbridamiento artroscópico, comparándolos con un grupo control que solo recibió PRP junto con el desbridamiento artroscópico. En este estudio observaron una mejora en ambos grupos, siendo mayor en el grupo que recibió además del desbridamiento artroscópico y el PRP, las CMG. Estos resultados no llegaron a ser significativos en comparación con el grupo control a los 3 meses posteriores al tratamiento (Koh y Choi, 2012). Esto puede ser debido a que son resultados valorados a corto plazo, es decir, están evaluados a los 3 meses del tratamiento. Seguramente con una valoración más tardía o posterior, estos resultados podrían tener diferencias significativas, como en nuestro estudio, demostrando que el efecto de las CMG junto con el PRP es más prolongado en el tiempo que únicamente el uso del PRP.

VAS y cuestionario de la satisfacción del propietario

El principal problema de la OA es el dolor, siendo el motivo más frecuente de consulta tanto en humana como en veterinaria (Wang-Saegusa et al., 2011, Kapoor et al., 2011, Wieland et al., 2005). Además, los pacientes también presentan rigidez, fatiga, limitaciones, malestar, trastornos del sueño, ansiedad y la disminución de la calidad de vida, lo que dificulta mucho el día a día de los mismos, dando lugar a una disminución exacerbada de la actividad física una vez se ha establecido la patología (Lane et al., 2011).

En cuanto a la valoración del dolor en la OA, existen diversas escalas subjetivas para cuantificar el mismo, como la escala WOMAC (*The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*), el cuestionario de salud SF (*Short Form*), la escala KOOS (*Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score*), y la escala VAS entre otras (Angst et al., 2001, Schein et al., 2008, Davis et al., 2009, Hudson et al., 2004).

En nuestro estudio, hemos valorado el dolor de manera subjetiva mediante la escala VAS, tanto por parte del propietario como por parte del veterinario. La escala VAS se ha utilizado en estudios previos y es uno de los métodos más aceptados para evaluar el dolor en la OA (Hudson et al., 2004, Fahie et al., 2013). Aún así debemos tener en cuenta que en nuestro caso, son el propietario y el veterinario del animal los que valoran el dolor que perciben en él, no el propio paciente, que sería como se realiza en medicina humana. Hemos observado que los animales de los tres grupos presentaron una mejoría significativa en las puntuaciones de dolor desde el primer mes posterior al tratamiento que se mantuvo hasta los 6 meses, evaluado tanto por parte del propietario como por parte del veterinario. Hay que destacar que en el grupo tratado con PRFG, la disminución del dolor fue algo menos intensa que en los otros dos grupos, existiendo diferencias significativas entre grupos a los 6 meses en la valoración realizada por el veterinario, pero no en la realizada por los propietarios.

Aún así, podemos decir que con los tres tipos de terapias, tanto CMG, como PRGF, como con la combinación de los dos anteriores, logramos alcanzar una de las metas más importantes en el tratamiento de la OA que es la reducción del dolor experimentado por los pacientes en la articulación afectada (Wang-Saegusa et al., 2011, Pak, 2011).

Existen diversos trabajos ya publicados en los cuales también se ha visto una reducción de la VAS en pacientes que padecían OA, y habían sido tratados con este tipo de terapias (Koh y Choi, 2012, Wang-Saegusa et al., 2011, Centeno et al., 2008). Uno de estos ejemplos, es el estudio realizado por Koh y Choi, el cual hemos mencionado anteriormente, donde se trató a pacientes que padecían OA con una infiltración intraarticular de CMG en combinación con PRP y un desbridamiento artroscópico, comparándolos con un grupo control que solo recibió PRP junto con el desbridamiento artroscópico. En este estudio se obtuvo una mejora de la VAS en ambos grupos, sin existir diferencias significativas entre ellos, como ocurrió en nuestro estudio en la valoración realizada a los 6 meses por parte de los propietarios (Koh y Choi, 2012).

Además de la disminución de la VAS, otra manera de valorar el efecto beneficioso logrado con la diversas terapias en mediante los cuestionarios realizados a los propietarios sobre la

satisfacción ante el tratamiento (Malek et al., 2012), la ausencia de efectos secundarios y la disminución en la necesidad de medicación rutinaria (Vaquerizo et al., 2013).

En cuanto al grado de satisfacción por parte de los propietarios, hemos obtenido un alto grado desde el primer mes post tratamiento que se mantuvo hasta el final del estudio. En la encuesta que realizábamos a cada uno de los propietarios, se tenían en cuenta parámetros como evolución de la cojera, eficacia del tratamiento, respuesta al mismo, y calidad de vida de la mascota. Ya desde el primer mes posterior al tratamiento, obtuvimos una elevada puntuación en los tres grupos de estudio que se mantuvo hasta los 6 meses. Nuestros resultados coinciden con otros estudios en los cuales valoran también el grado de satisfacción de los pacientes mediante diferentes cuestiones (Gobbi et al., 2014, Skowronski et al., 2012, Tsai et al., 2014).

Uno de estos ejemplos es el estudio realizado por Gobbi y colaboradores, en el cual uno de los métodos de valoración de la eficacia al tratamiento de OA de rodilla con PRP es la escala KOOS. Dentro de esta escala uno de los puntos a valorar es la calidad de vida de los pacientes. Como en nuestro estudio, Gobbi y colaboradores observaron una mejora de la calidad de vida de los pacientes tratados con PRP (Gobbi et al., 2014).

En otro estudio realizado en humana en cual trataron pacientes con lesiones en el cartílago mediante la aplicación de MSC, también observaron una mejora en la escala KOOS, lo que significa que con esta terapia mejoró la calidad de vida de los pacientes evaluados, resultados que coinciden con nuestro estudio (Skowronski et al., 2012).

En medicina veterinaria, un estudio realizado por Tsai y colaboradores, en el cual trataron a perros de propietarios que padecían OA, con CMG porcinas, también observaron una mejora significativa en el cuestionario realizado a los propietarios en el cual valoraron parámetros muy similares a los nuestros como cojera de la mascota o calidad de vida de los pacientes, corroborando nuestra hipótesis de la efectividad de las MSC en el tratamiento de la OA (Tsai et al., 2014).

En cuanto a la necesidad de tomar analgésicos de forma rutinaria, se ha visto que estas terapias disminuyen la necesidad de las mismas, siendo beneficioso para los pacientes ya que disminuye los posibles efectos secundarios asociados a estos fármacos (Vaquerizo et la., 2013). EN nuestro estudio el número de pacientes que necesitó utilizar analgesia de rescate fue mínimo en los tres grupos sin existir diferencias entre ellos, disminuyendo de forma general la rutina que tenían estos pacientes, en cuanto a la toma diaria o temporal de AINEs antes de su inclusión en el estudio. En cuanto a los efectos secundarios, no hubo ninguno que pudiese

indicar un problema de la terapia aplicada, tanto por la obtención de los tratamientos (extracción de sangre y biopsia del tejido adiposo) como por su aplicación (artrocentesis).

Plataforma de fuerza

Una forma objetiva de valorar la eficacia de los diversos tratamientos, es mediante el uso de la plataforma de fuerza. Como ya hemos mencionado, ésta evalúa parámetros cinéticos como el PVF y el IV. El PVF cuantifica la máxima fuerza que ejerce la extremidad cuando se produce el apoyo de la misma durante la marcha, y el IV evalúa la distribución de fuerzas a través del tiempo (Vilar et al., 2013).

La plataforma de fuerza es uno de los métodos más utilizados tanto en medicina veterinaria como en medicina humana para evaluar la funcionalidad articular, o la respuesta a diversos tratamientos sobre la misma (Malek et al., 2012, Vilar et al., 2013, Vilar et al., 2014, Fahie et al., 2013, Stan et al., 2013, Hudson et al., 2004).

Uno de los muchos ejemplos que podemos encontrar en medicina veterinaria, es el estudio realizado por Malek y colaboradores, en el cual utilizan la plataforma de fuerza en la especie canina para valorar la efectividad de diversos tratamientos analgésicos en pacientes que

padecen OA (Malek et al., 2012). O en medicina humana donde, por ejemplo, Stan y colaboradores utilizan la plataforma de fuerza para valorar la artroplastia de rodilla como terapia resolutive de la OA (Stan et al., 2013).

El análisis funcional de la marcha, puede estar influenciado por el dolor que presenta el paciente en la extremidad afectada, por este motivo, éste valor podría ser evaluado como una medida sustituta del dolor en la extremidad (Poole et al., 2010).

También hay que señalar, sin embargo, que puede ser difícil de interpretar medidas cinemáticas en modelos muy inestables ya que los cambios pueden estar relacionados con una alteración en la función articular más que con el dolor musculoesquelético en sí. Una forma de eliminar esta variable del dolor, podría realizarse mediante una anestesia intraarticular de la articulación afectada, para desacoplar la mecánica de la marcha, de la fisiología del dolor y poder interpretar de manera más objetiva los resultados (Poole et al., 2010).

En nuestro estudio, valoramos 8 pacientes que se trataron en la Universidad de las Palmas de Gran Canaria mediante el uso de CMG+PRGF, y se compraron con un grupo control de animales sanos. Hay que destacar que únicamente realizamos la valoración en esos pacientes porque no todos los centros poseían en sus instalaciones el equipo necesario para realizar esta valoración cinética.

Nuestros resultados mostraron una mejoría en estos dos parámetros (PVF e IV), llegando a igualar, en el caso del IV, o incluso mejorar PVF, los resultados del grupo control de animales sanos a los 6 meses de estudio. Con estos resultados, podemos llegar a la conclusión de que las CMG junto con PRGF presentan un importante potencial terapéutico para el uso clínico en el tratamiento de la OA.

Coincidiendo con nuestros resultados, un estudio llevado a cabo por Fahie y colaboradores, demostró la eficacia de una única infiltración de PRP en perros con OA, comparándolos con un grupo control de perros a los cuales infiltró SSF. Una vez evaluados todos los animales, observó una mejora en el PVF de los animales tratados con PRP, por lo que confirmó que el uso de PRP es una terapia efectiva para el tratamiento de la EDA.

En otro estudio llevado a cabo por Tsai y colaboradores en el cual trataron perros con OA mediante CMG porcinas, también llevaron a cabo una análisis cinético mediante la plataforma de fuerza. En este estudio, al igual que en el nuestro, evaluaron los dos parámetros PVF e IV, observándose una mejora en ambos a las 12 semanas posteriores al tratamiento, corroborando

la efectividad de la terapia en esta patología, apoyando de la misma manera nuestros resultados (Tsai et al., 2014).

Biomarcadores

Como ya hemos comentado anteriormente, la OA se define como una patología no inflamatoria y degenerativa de cartílago articular, con esclerosis subcondral e hipertrofia marginal del hueso (May, 1994). En esta patología, existe una sobreproducción de sustancias destructivas y mediadores inflamatorios, que dan lugar a un balance a favor del catabolismo del cartílago articular (Kapoor et al., 2011). Se altera la composición del colágeno, y disminuye el contenido de PG en la articulación. Estos PG, contienen CS y KS, así como productos de degradación del Coll-II, los cuales se liberan, aumentando su concentración en los fluidos biológicos del organismo, como suero o líquido sinovial (Belcher et al., 1997, Hegemann et al., 2002, Leipold et al., 1989).

Todos estos cambios, se puede medir y evaluar mediante la valoración de estas moléculas, también denominadas biomarcadores, en el suero u otros fluidos de los pacientes (Ramonda et al., 2013). El uso de biomarcadores para predecir la progresión de la OA esta cada vez más extendido en la medicina actual (Poole et al., 2010). En estudios con animales, los marcadores bioquímicos o moleculares, se consideran como indicadores útiles para estudiar la dinámica de

los tejidos, con especial interés en la EDA, utilizándose cada vez más en el seguimiento del cartílago, el recambio óseo y la sinovitis (Poole et al., 2010).

Hay que tener en cuenta que el uso de biomarcadores de forma aislada es insuficiente para llevar un seguimiento de la OA, estos biomarcadores, tienen que complementarse con técnicas de diagnóstico por imagen, histología y evaluación de la sintomatología a lo largo del tiempo para llegar a un valor predictivo y determinar las relaciones de inicio de la enfermedad y la progresión de la misma, además de para estudiar los efectos de las nuevas intervenciones terapéuticas en una variedad de enfermedades articulares en diversas especies, incluido el perro (Nganvongpanit et al., 2008, Budsberg et al., 2006, Hegemann et al., 2002, Ratcliffe et al., 1994, Ratcliffe et al., 1992, Poole et al., 2010).

Debido a que el Coll-II es uno de los componentes principales del cartílago articular y, que en la OA existe una destrucción del mismo dando lugar a sus productos de degradación, en nuestro estudio optamos por valorar estos compuestos en el suero de los pacientes, concretamente el C2C, para tener otra valoración complementaria de la evolución de esta patología (Ameye et al., 2007, Henrotin et al., 2013, Hosogane et al., 2012).

El estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de la OA en el perro, pero en la literatura existe controversia en la utilidad del C2C como biomarcador de la patología. Mientras, Goranov en 2007, sugirió una posible asociación entre el estrés oxidativo y la degeneración del cartílago, con un aumento en las concentraciones de C2C en los perros que sufren de OA (Goranov, 2007), otros autores sugieren que la colagenasa que degrada específicamente el colágeno de tipo II en el cartílago articular, puede no intervenir en la fase temprana de la enfermedad, como han observado Hayashi y colaboradores en OA producidas de manera natural, secundarias a una rotura del ligamento cruzado canino (Hayashi et al., 2009). En nuestro estudio, los resultados son similares a los obtenidos por Goranov en 2007, en el que podemos ver una disminución en C2C después de la infiltración intraarticular de los diversos tratamientos.

Además del Coll-II, el AH es otro de los compuestos principales del cartílago articular, y lo encontramos distribuido ampliamente en el cuerpo. En la articulación forma parte del tejido conectivo, siendo uno de los componentes fundamentales de la matriz extracelular, además de participar también aumentando la viscosidad del líquido sinovial (Golightly et al., 2011, Hosogane et al., 2012, Knudson, 1998).

El AH o hialuronato, es otro biomarcador muy utilizado en diagnóstico y seguimiento de la evolución de la OA. Los valores de este biomarcador en suero, también son muy

controvertidos, ya que existen vertientes en las cuales dicen que aumenta conforme avanza la EDA, y otras dice que disminuye conforme progresa la patología (Arican et al., 1994, Budsberg et al., 2006, Leipold et al., 1989). Hay que destacar que en la mayoría de estudios, sobre todo en humana, han encontrado niveles más elevados de este biomarcador en pacientes con la enfermedad más avanzada.

En veterinaria existen estudios con resultados muy dispares entre ellos que han demostrado que el HA se puede utilizar como un biomarcador para la OA en perros (Arican et al., 1994, Budsberg et al., 2006, Leipold et al., 1989). En nuestro estudio, los niveles séricos de HA fueron significativamente más elevados 1, 3 y 6 meses después de la infiltración intraarticular en los tres grupos evaluados. Estos resultados son consistentes con algunos de los estudios, los cuales publicaron que el nivel de HA en perros con OA o enfermedad inflamatoria articular fue menor que en los animales normales (Nganvongpanit et al., 2008, Catterson et al., 1995, Lohmander, 1991). Pero, en controversia, otros autores han mostrado una elevación de la HA en relación con el aumento del grado de OA (Garnero et al., 2001, Sasaki et al., 2013).

Con los resultados obtenidos, y analizando los estudios que existen hasta el día de hoy sobre los biomarcadores en la OA, podemos decir que hay mucha variabilidad de datos y no se conoce de manera exacta la fisiopatología de estas moléculas y como actúan en la patología. Por este motivo, creemos que se debe estudiar mucho más en profundidad la utilidad de estas moléculas, ya que nos ayudarían a diagnosticar y valorar la patología, en la diversas fases de la enfermedad, de manera muy poco invasiva y con un coste razonable.

Ventajas y desventajas de los diversos tratamientos

Quedando demostrado el beneficio terapéutico de los tres tratamientos, hay que tener en cuenta las ventajas y desventajas de la aplicación clínica de cada una de las técnicas.

Aunque el efecto del PRGF demostró una menor duración en el tiempo, tiene la ventaja de ser sustancialmente más asequible y una medida mucho menos invasiva y, por lo tanto más sencilla para uso ambulatorio. Es importante destacar que el tratamiento con PRGF se puede optimizar con inyecciones seriadas en el tiempo para obtener mejores resultados y más prolongados en el tiempo (Andia et al., 2012).

En cuanto a las desventajas de esta técnica, hay que destacar que existe mucha variabilidad respecto a los métodos de obtención del PRP, esto podría ser uno de los motivos por los cuales existe tanta versatilidad de resultados entre estudios (Andia et al., 2010, Anitua et al., 2009). Para evitar esto, lo recomendable sería establecer unas metodologías de obtención bien estudiadas y con una composición claramente definida, además de determinar la forma de administración, el número de aplicaciones, el tiempo optimo entre aplicaciones y el volumen

ideal en cada uno de los casos, para evitar de esta manera el sesgo de variabilidad entre técnicas (Andia et al., 2010, Anitua et al., 2009).

A parte de esto, los efectos adversos observados en algunos estudios con el uso de PRP, son los que se podrían dar con cualquier tratamiento que se realice de forma intraarticular, como por ejemplo molestia en la zona, inflamación y dolor, e infección superficial en la zona de aplicación entre otros (Schepull et al., 2011), aunque en este estudio no se han observado complicaciones en ningún caso asociados a esta técnica.

En cuanto a las CMG, el principal inconveniente es la necesidad de realizar una cirugía menor bajo anestesia general para la recolección de tejido adiposo, con la ventaja de obtener un mayor beneficio terapéutico y más prolongado en el tiempo. La posibilidad de optimizar este tratamiento es la creación de un banco de células autólogas, lo que permitiría su disponibilidad sin necesidad de realizar cirugías adicionales. Esto haría que el tratamiento fuese mucho más accesible para el ámbito clínico (Fortier et al., 2011). Con miras a un futuro, incluso podríamos hablar de la creación de bancos de células heterólogas, para que cualquier paciente pudiese tener acceso a las ASC sin necesidad de someterse a ninguna cirugía previa.

Como conclusión podemos decir que los métodos mínimamente invasivos para el tratamiento de la OA en la especie canina, son atractivos tanto para los veterinarios como para los propietarios de las mascotas, sobre todo si se compara con alternativas quirúrgicas como el reemplazo protésico de la articulación.

Limitaciones del estudio

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.

Limitaciones del estudio

Entre las principales limitaciones de este estudio, podemos incluir la falta de un grupo placebo. Hay que destacar que para poder realizar un buen seguimiento de las diversas terapias, en el estudio se han utilizado animales que pertenecían a diversos propietarios, los cuales esperan un resultado positivo del tratamiento ofrecido, y estudios recientes han demostrado que una única inyección intraarticular de solución salina en los perros con OA no tiene ningún efecto en la reducción del dolor o la mejora de la funcionalidad (Fahie et al., 2013).

Además de esto, una muy buena opción para llevar a cabo un seguimiento de la patología, podría haber sido mediante la realización de resonancia magnética de cada una de las extremidades, además de biopsias del cartílago o artrocentesis seriadas para recoger el líquido sinovial de las articulaciones afectadas en cada una de las visitas. Estas evaluaciones complementarias no se realizaron debido a las complicaciones adicionales que implicaban para los propietarios.

Otro punto a tener en cuenta son las diferencias en los protocolos de obtención de las muestras, lo que hace que sea imposible cegar el tratamiento para el propietario ya que a los pacientes que se les infiltró con CMG se les realizó previamente una biopsia para la obtención de la muestra de tejido adiposo, por lo que los propietarios fueron conscientes del tratamiento que se les iba a realizar a sus animales. En cambio, la evaluación de la progresión de la enfermedad y del estado de los perros, se realizó por veterinarios que no sabían qué tratamiento se le había administrado a cada uno de los pacientes, por lo que sí que se trató de un análisis ciego.

Con todos estos datos, podemos decir que para demostrar todo el potencial de estas terapias en el tratamiento de la OA, se deben llevar a cabo más ensayos doble ciego controlados y aleatorios. Así como realizar un buen seguimiento de la patología mediante métodos avanzados de diagnóstico por imagen, como por ejemplo resonancias magnéticas o artroscopias de revisión, correlacionándolas con estudios histológicos que nos determinen el tipo de tejido que se ha formado en la zona afectada. Además estos estudios deberían incluir la determinación de marcadores biológicos o biomarcadores tanto del catabolismo como del anabolismo articular en diversos fluidos como suero o líquido sinovial.

Otra limitación que ya hemos comentado en el apartado correspondiente ha sido la imposibilidad de realizar el control objetivo sobre plataforma de fuerza a todos los pacientes para poder evaluar las diferencias entre los 3 grupos de estudio.

Conclusiones

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.

Conclusiones

De los resultados obtenidos en nuestro estudio y bajo las condiciones establecidas en nuestro trabajo, podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. En los 6 meses de duración del estudio no se observaron cambios significativos en el seguimiento radiológico de las articulaciones afectadas en ninguno de los tres grupos de tratamiento analizados, por lo que la radiología convencional puede no ser un método suficientemente sensible para valorar posibles cambios evolutivos en la OA de los pacientes en ninguno de los grupos terapéuticos propuestos.
2. Las CMG, el PRGF y la asociación de ambos, mejoran considerablemente la capacidad funcional de los pacientes, alcanzando su punto máximo a los 6 meses de evolución. No obstante los resultados son mejores en los grupos que utilizan las CMG como parte de la terapia (CMG y CMG+PRGF).
3. Los tres tratamientos estudiados aumentan significativamente el rango de movilidad articular y perímetro muscular de las articulaciones evaluadas. A los 6 meses de tratamiento la efectividad es mayor en los grupos terapéuticos con CMG (CMG, CMG+ PRGF) en comparación con el grupo de tratamiento con PRGF.

4. La percepción del dolor mejora desde el primer mes de tratamiento en la evaluación del propietario y del veterinario, independientemente del tratamiento. Esta disminución del dolor se mantiene a medio plazo, siendo muy elevada a los 6 meses, si bien tanto el veterinario como el propietario observaron menos dolor en los grupos tratados con CMG (CMG y CMG+PRGF).
5. La mejoría de los datos de carga valorados de forma objetiva en plataforma de fuerza, ponen de manifiesto que los dos tratamientos (CMG y CMG+PRGF) son efectivos desde el punto de vista funcional en el control clínico de la OA canina.
6. En los grupos de tratamiento en los cuales se emplearon CMG (CMG y CMG+PRGF) existe un aumento significativo de los dos biomarcadores analizados (C2C y HA) a los 6 meses de estudio, lo que puede interpretarse como un efecto terapéutico positivo en la evolución a corto y medio plazo de la OA canina.
7. En los cultivos celulares, al enriquecer el medio de cultivo con PRGF, se favorece la proliferación y adherencia de las células, dando lugar a un mayor rendimiento celular.
8. La utilización de una única inyección intraarticular de CMG, PRGF y la asociación de ambos tratamientos puede plantearse como un tratamiento no quirúrgico eficaz y de elección en la OA canina, obteniendo mejores resultados con la combinación de CMG y PRGF.

Resumen

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.

Resumen

La Osteoartrosis (OA) es una de las enfermedades con más prevalencia y morbilidad en la sociedad actual, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, debido sobre todo al aumento de la esperanza de vida y a la prevalencia creciente de la obesidad. Además por su gravedad e irreversibilidad, cada vez existe un mayor interés y empeño en tratar de encontrar tratamientos que alivien los síntomas y retrasen la evolución de la patología.

En los últimos años, se han buscado alternativas a los tratamientos convencionales ya que estos últimos únicamente palián la sintomatología de la enfermedad sin detener la progresión de la misma. Entre estas nuevas terapias englobadas dentro de la medicina regenerativa, encontramos el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) y las células mesenquimales, concretamente las obtenidas a partir del tejido adiposo (CMG).

El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido la evaluación del efecto de las CMG y del PRGF, así como de la combinación de ambos, en el tratamiento de la Enfermedad degenerativa articular (EDA), utilizando para ello un modelo clínico de la especie canina.

Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron 49 animales de la especie canina, con EDA en las articulaciones del codo, la cadera o la rodilla. A estos animales se les realizó previamente una exploración física completa, además de una minuciosa exploración traumatológica, y una analítica sanguínea para descartar otras enfermedades concomitantes.

Una vez comprobado que todos los animales únicamente padecían EDA, se dividieron aleatoriamente en tres grupos de estudio, dependiendo del tratamiento aplicado (CMG, CMG+PRGF y PRGF), habiendo un total de 25 articulaciones en el grupo de CMG, 23 en el grupo de CMG+PRGF, y 47 en el grupo de PRGF.

A continuación, tras la obtención del PRGF y de las CMG se realizó una infiltración intraarticular estándar a cada uno de los animales dependiendo del grupo asignado.

Además se estudió la viabilidad de las células madre evaluando las características y naturaleza de estas células, y determinando los efectos de concentraciones crecientes de PRGF en la proliferación de las mismas.

Posteriormente, a tiempo basal (antes de aplicar los tratamientos), uno, tres y seis meses tras a la aplicación de los mismos se les realizó a cada uno de los pacientes una evaluación de las variables del estudio entre las que se encuentran las variables de la escala bioarth (grado radiológico de artrosis, limitación funcional y movilidad articular), un cuestionario sobre la satisfacción ante el tratamiento, la valoración del dolor mediante la escala analógica visual (VAS) tanto por parte del propietario, como del veterinario y finalmente la extracción de suero para el posterior análisis de biomarcadores.

Además, en los animales de las Palmas de Gran Canaria, se llevó a cabo en cada una de las revisiones un análisis cinético de las extremidades afectadas mediante la plataforma de fuerza.

En el análisis de la viabilidad celular, además de obtener un crecimiento exponencial de las muestras con una curva proliferativa definida en un cultivo celular que contenía suero bovino fetal, observamos que los factores de crecimiento contenidos en PRGF pueden también ser suficientes para mejorar el rendimiento de las CMG en cultivos celulares.

Tras el análisis estadístico de las variables contenidas en la escala bioarth, observamos que el grado de artrosis se mantuvo constante a lo largo del estudio en todos los grupos, sin existir diferencias significativas entre ellos. La limitación funcional mejoró de manera significativa en

los tres grupos obteniendo mejores resultados a los 6 meses en los grupos tratados con CMG y con CMG+PRGF, lo mismo que ocurrió con la movilidad articular.

En cuanto a la valoración del dolor mediante la VAS, tanto por parte del propietario como del veterinario, existió una disminución significativa del dolor que presentaban los pacientes desde el primer mes post tratamiento manteniéndose hasta los 6 meses posteriores a la aplicación de los mismos, obteniendo resultados significativamente más favorables en el grupo tratado con CMG+PRGF al finalizar el estudio.

Respecto a las preguntas realizadas a los propietarios para determinar el grado de satisfacción que presentaban ante el tratamiento aplicado a sus mascotas, ya desde el primer mes post tratamiento se obtuvieron unos resultados muy satisfactorios, que se mantuvieron hasta el final del estudio en los 3 grupos de estudio.

En el estudio de los biomarcadores analizados en el suero de los pacientes, observamos que tanto en el grupo de CMG como en el grupo de CMG+PRGF, existió un aumento progresivo y significativo del ácido hialurónico (HA) en el tiempo, no observándose estos cambios en el grupo tratado con PRGF. Resultados similares se obtuvieron con el C2C, en el cual también observamos tanto en el grupo de CMG como en el de CMG+PRGF una disminución progresiva de este biomarcador en el tiempo, sin existir cambios significativos en el grupo de PRGF. No existieron diferencias entre grupos en ninguno de los tiempos de estudio valorados.

Por último, en el estudio de la plataforma de fuerza realizado en los animales de las Palmas de Gran Canaria se observó una mejora progresiva en las variables valoradas en el análisis cinético, alcanzando a los 6 meses de estudio los resultados significativamente más favorables en el grupo de estudio valorado.

Tras los resultados logrados en el estudio, podemos decir que la terapia con CMG y PRGF, así como la combinación de ambos tratamientos, son una nueva vía de tratamiento que intenta conseguir una reparación lo más similar al cartílago nativo, sin necesidad de optar por técnicas más agresivas y que causen un daño mayor al organismo. Hay que destacar que en determinados parámetros existen diferencias entre el grupo tratado únicamente con PRGF y los tratados con CMG y la combinación de CMG con PRGF. Nuestra sospecha es que el uso de PRGF en inyección única produce inicialmente una mejora clara del paciente, cuyo efecto está más limitado en el tiempo, por eso sería recomendable realizar una infiltración seriada de este tratamiento cuando queramos utilizarlo como terapia para la OA.

Respecto a las diferencias entre el uso únicamente de CMG, o el uso de una combinación de CMG junto con PRGF, en esta tesis doctoral no hemos obtenido muchas diferencias significativas entre ambos grupos, aunque pensamos que esto es debido a la duración del estudio, ya que si el estudio se hubiese prolongado durante más tiempo, habríamos obtenido resultados con diferencias significativas obteniendo unos valores más favorables en el grupo tratado con CMG+PRGF debido al efecto sinérgico que tienen estos tratamientos.

Summary

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.

Summary

Osteoarthritis (OA) is one of the most prevalent diseases in today's society, both in human medicine and veterinary medicine, mainly due to increased life expectancy and the growing prevalence of obesity. Besides its severity and irreversibility, an increasing interest and commitment exists in trying to find treatments to alleviate symptoms and delay the evolution of the disease.

In recent years, alternatives to conventional treatments have been sought after because the latter only palliates the symptoms of disease without halting its progression. Among these new therapies included within regenerative medicine, are Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) and mesenchymal cells, particularly those derived from adipose tissue (ADMSC).

The aim of this Thesis has been the evaluation of the effect of ADMSC and PRGF, as well as their combination in the treatment of degenerative joint disease (DJD), using a canine species clinical model.

Forty nine animals were selected, with DJD in the elbow, hip or knee. A complete physical examination was performed on these animals previously, and a thorough orthopedic examination, and blood tests to rule out other comorbidities.

Once verified that all animals were only suffering from DJD, they were randomly divided into three treatment groups, (ADMSC, ADMSC+PRGF and PRGF), having a total of 25 joints in the ADMSC group, 23 in the ADMSC+PRGF group and 47 in the PRGF group.

Then, after obtaining the PRGF and ADMSC a standard intra-articular injection was performed. The viability of the stem cells was also studied, evaluating the characteristics and nature of these cells and determining the effects of the increasing concentrations of PRGF in proliferation.

Patients were assessed, at baseline (before applying the treatments) and one, three and six months after the application studying variables including Bioath scale (degree of radiological osteoarthritis, functional limitation and joint mobility), questionnaire on satisfaction with the treatment, pain assessment by visual analogue scale (VAS) both by the owner and the Vet and finally serum extraction for subsequent analysis of biomarkers.

Also in the animals at Palmas de Gran Canaria, a kinetic analysis of the affected limbs by force platform was performed at each follow up.

In the cell viability analysis , in addition to obtaining an exponential growth in the samples with a proliferative curve defined in a cell culture containing fetal bovine serum, we observed that the growth factors contained in PRGF may also be sufficient to improve the performance of the AMSC cultures.

After statistical analysis of the variables in the BIOARTH scale, we noted that the degree of osteoarthritis remained constant throughout the study in all groups, with no significant differences between them. Functional limitation improved significantly in all three groups with better results at 6 months in the groups treated with AMSC and ADMSC+PRGF, and the same happened with joint mobility.

Regarding the questions owners were asked to determine their satisfaction with the treatment applied to their pets, from the first month post treatment very satisfactory results were observed, which remained constant throughout the study.

As for the VAS assessment, by both the owner and vet, there was a significant decrease in pain in the patients from the first month after treatment which remained until 6 months after the application thereof, obtaining significantly more favorable results in the group treated with AMDSC+PRGF group up to the end of the study.

With reference to the study of the markers in the serum, we observed that in both the ADMSC and ADMSC+PRGF, there was a progressive and significant increase of hyaluronic acid (HA) at the time and these changes were not observed in the group treated with PRGF alone. Similar results were obtained with the C2C, which we also observed in both the ADMSC group and the ADMSC+PRGF group showing a progressive decrease of this biomarker over time and existed without significant changes in the PRGF group. There were no differences between groups at any of the study times.

Finally, the force platform evaluation conducted in animals at Las Palmas de Gran Canaria, progressive improvement was observed in the variables assessed in the kinetic analysis, reaching significantly more favorable results in the study group evaluated at 6 months after treatment.

Following the results achieved in the study, we can say that therapy with ADMSC and PRGF, and the combination of both treatments, are a novel treatment attempting to achieve repair as similar to native cartilage without opting for more aggressive techniques and cause further damage to the body. It is important to note that there are differences between certain parameters in the group treated with PRGF alone and that treated with ADMSC and the combination of ADMSC with PRGF. We suspect that using a single PRGF injection initially produces a clear improvement for the patient, the effect is more limited in time, so it would be advisable to perform a serie of injections with this treatment when used as a therapy for OA.

Regarding the differences between the use of only ADMSC, or using a combination of ADMSC with PRGF, in this thesis we have not observed any significant differences between the groups, although we think that this is due to the duration of the study and believe that had the studied continued for longer, significant differences would have been obtained with more favorable values in the group treated with ADMSC+PRGF due to the synergistic effect of these treatments.

Futuras líneas de Investigación

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.

Futuras líneas de Investigación

Una vez finalizada la presente tesis doctoral y evaluadas sus limitaciones, consideramos que una de las líneas clave con más futuro en la investigación de la OA, además de continuar con las terapias regenerativas (PRGF Y CMG), sería muy interesante estudiar su evolución con el análisis de biomarcadores en los diversos fluidos del organismo, ya que son medidas no invasivas, de bajo coste y que nos pueden ofrecer gran variedad de información.

En próximos estudios, otro de los puntos a tener en cuenta, sería realizar ensayos con una mayor duración en el tiempo, para poder establecer de esta manera el efecto de los tratamientos a largo plazo.

En cuanto a la terapia con células madre, es muy interesante para un futuro próximo plantearse otras vías de administración de las mismas, en concreto la administración intravenosa, valorando de esta manera la capacidad que tienen las células de migrar al lugar de la lesión, pudiendo así aplicarse a una gran variedad de patologías.

Además de esto, sería muy atractivo llevar a cabo estudios en los cuales valoremos la utilización de células mesenquimales heterólogas, logrando así que la terapia sea más accesible para los pacientes, sin necesidad de someterse a cirugías previas.

Respecto al PRGF, en próximos estudios se debería valorar como afecta la pauta y el número de aplicaciones a la patología para corroborar que efectivamente la metodología que hemos seguido es la más adecuada para tratar esta patología en concreto.

Bibliografía

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.

Bibliografía

- ABRAMSON, S. B. 2004. Inflammation in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*, 70, 70-6.
- ACOSTA, L., CASTRO, M., FERNANDEZ, M., OLIVERES, E., GOMEZ-DEMMELE, E. & TARTARA, L. 2014. Treatment of corneal ulcers with platelet rich plasma. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 89, 48-52.
- ADAMS, G. R. 2002. Invited Review: Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. *J Appl Physiol (1985)*, 93, 1159-67.
- AFLATOONIAN, B. & MOORE, H. 2005. Human primordial germ cells and embryonic germ cells, and their use in cell therapy. *Curr Opin Biotechnol*, 16, 530-5.
- AGGARWAL, S. & PITTENGER, M. F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105, 1815-22.
- AGUNG, M., OCHI, M., YANADA, S., ADACHI, N., IZUTA, Y., YAMASAKI, T. & TODA, K. 2006. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 14, 1307-14.
- AHMAD, Z., HOWARD, D., BROOKS, R. A., WARDALE, J., HENSON, F. M., GETGOOD, A. & RUSHTON, N. 2012. The role of platelet rich plasma in musculoskeletal science. *JRSM Short Rep*, 3, 40.
- AIGNER, T., ROSE, J., MARTIN, J. & BUCKWALTER, J. 2004. Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology. *Rejuvenation Res*, 7, 134-45.
- AKEDA, K., AN, H. S., OKUMA, M., ATTAWIA, M., MIYAMOTO, K., THONAR, E. J., LENZ, M. E., SAH, R. L. & MASUDA, K. 2006. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*, 14, 1272-80.
- AKHTAR, N. & HAQQI, T. M. 2012. Current nutraceuticals in the management of osteoarthritis: a review. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 4, 181-207.
- AL RASHOUD, A. S., ABBOUD, R. J., WANG, W. & WIGDEROWITZ, C. 2013. Efficacy of low-level laser therapy applied at acupuncture points in knee osteoarthritis: a randomised double-blind comparative trial. *Physiotherapy*.

- ALAM, M. R., JI, J. R., KIM, M. S. & KIM, N. S. 2011. Biomarkers for identifying the early phases of osteoarthritis secondary to medial patellar luxation in dogs. *J Vet Sci*, 12, 273-80.
- ALESSANDRI, G., PAGANO, S., BEZ, A., BENETTI, A., POZZI, S., IANNOLO, G., BARONIO, M., INVERNICI, G., CARUSO, A., MUNERETTO, C., BISLERI, G. & PARATI, E. 2004. Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet*, 364, 1872-83.
- ALEXOPOULOS, L. G., SETTON, L. A. & GUILAK, F. 2005. The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. *Acta Biomater*, 1, 317-25.
- ALIO, J. L., COLECHA, J. R., PASTOR, S., RODRIGUEZ, A. & ARTOLA, A. 2007. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res*, 39, 124-9.
- ALLEN, B. & ARCHER, R. K. 1971. Haptoglobins in the horse. *Vet Rec*, 89, 106-9.
- ALLEN, M. J. 2012. Advances in total joint replacement in small animals. *J Small Anim Pract*, 53, 495-506.
- ALLIN, K. H., BOJESEN, S. E. & NORDESTGAARD, B. G. 2009. Baseline C-reactive protein is associated with incident cancer and survival in patients with cancer. *J Clin Oncol*, 27, 2217-24.
- ALVAREZ, M. A. 2006. *Modulación farmacológica de la inflamación sinovial en la artrosis humana*. Facultad de Medicina. Universidad autónoma de Madrid.
- AMEYE, L. G., DEBERG, M., OLIVEIRA, M., LABASSE, A., AESCHLIMANN, J. M. & HENROTIN, Y. 2007. The chemical biomarkers C2C, Coll2-1, and Coll2-1NO2 provide complementary information on type II collagen catabolism in healthy and osteoarthritic mice. *Arthritis Rheum*, 56, 3336-46.
- ANDIA, I., SANCHEZ, M. & MAFFULLI, N. 2010. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther*, 10, 1415-26.
- ANDIA, I., SANCHEZ, M. & MAFFULLI, N. 2012. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther*, 12, 7-22.
- ANDRADES, J. A., HAN, B., BECERRA, J., SORGENTE, N., HALL, F. L. & NIMNI, M. E. 1999. A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res*, 250, 485-98.
- ANGST, F., AESCHLIMANN, A., STEINER, W. & STUCKI, G. 2001. Responsiveness of the WOMAC osteoarthritis index as compared with the SF-36 in patients with osteoarthritis of the legs undergoing a comprehensive rehabilitation intervention. *Ann Rheum Dis*, 60, 834-40.
- ANITUA, E. 1999. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 14, 529-35.
- ANITUA, E. 2001. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent*, 13, 487-93; quiz 487-93.
- ANITUA, E., ANDIA, I., ARDANZA, B., NURDEN, P. & NURDEN, A. T. 2004. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 91, 4-15.
- ANITUA, E., PRADO, R., SANCHEZ, M. & GORKA, O. 2012a. Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. *Oper Tech Orthop*, 22:25-32.
- ANITUA, E., SANCHEZ, M., AGUIRRE, J. J., PRADO, R., PADILLA, S. & ORIVE, G. 2014. Efficacy and safety of plasma rich in growth factors intra-articular infiltrations in the treatment of knee osteoarthritis. *Arthroscopy*, 30, 1006-17.
- ANITUA, E., SANCHEZ, M., DE LA FUENTE, M., ZALDUENDO, M. M. & ORIVE, G. 2012b. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 20, 1657-65.
- ANITUA, E., SANCHEZ, M., NURDEN, A. T., NURDEN, P., ORIVE, G. & ANDIA, I. 2006. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*, 24, 227-34.
- ANITUA, E., SANCHEZ, M., NURDEN, A. T., ZALDUENDO, M. M., DE LA FUENTE, M., AZOFRA, J. & ANDIA, I. 2007a. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology (Oxford)*, 46, 1769-72.
- ANITUA, E., SANCHEZ, M. & ORIVE, G. 2010. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 62, 741-52.
- ANITUA, E., SANCHEZ, M., ORIVE, G. & ANDIA, I. 2007b. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*, 28, 4551-60.
- ANITUA, E., SANCHEZ, M., ORIVE, G. & ANDIA, I. 2008. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 37-41.
- ANITUA, E., SANCHEZ, M., ORIVE, G. & PADILLA, S. 2013a. A biological therapy to osteoarthritis treatment using platelet-rich plasma. *Expert Opin Biol Ther*, 13, 1161-72.
- ANITUA, E., SANCHEZ, M., ZALDUENDO, M. M., DE LA FUENTE, M., PRADO, R., ORIVE, G. & ANDIA, I. 2009. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif*, 42, 162-70.
- ANITUA, E., ZALDUENDO, M. M., ALKHRAISAT, M. H. & ORIVE, G. 2013b. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat*, 195, 461-6.

- ANOKYE-DANSO, F., TRIVEDI, C. M., JUHR, D., GUPTA, M., CUI, Z., TIAN, Y., ZHANG, Y., YANG, W., GRUBER, P. J., EPSTEIN, J. A. & MORRISEY, E. E. 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 8, 376-88.
- ANTONIADES, H. N., GALANOPOULOS, T., NEVILLE-GOLDEN, J., KIRITSY, C. P. & LYNCH, S. E. 1991. Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 565-9.
- ANTONIADES, H. N., SCHER, C. D. & STILES, C. D. 1979. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 1809-13.
- APPEL, T. R., POTZSCH, B., MULLER, J., VON LINDERN, J. J., BERGE, S. J. & REICH, R. H. 2002. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin Oral Implants Res*, 13, 522-8.
- ARCHER, C. W. & FRANCIS-WEST, P. 2003. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 401-4.
- ARGUELLES, D., CARMONA, J. U., PASTOR, J., IBORRA, A., VINALS, L., MARTINEZ, P., BACH, E. & PRADES, M. 2006. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci*, 81, 237-45.
- ARICAN, M., CARTER, S. D., MAY, C. & BENNETT, D. 1994. Hyaluronan in canine arthropathies. *J Comp Pathol*, 111, 185-95.
- ARQUERO, P. 2009. Plasma rico en plaquetas en cirugía estética. *Cir Estet Plas*, 5, 42-48.
- ARRICK, B. A., LOPEZ, A. R., ELFMAN, F., EBNER, R., DAMSKY, C. H. & DERYNCK, R. 1992. Altered metabolic and adhesive properties and increased tumorigenesis associated with increased expression of transforming growth factor beta 1. *J Cell Biol*, 118, 715-26.
- ASSOIAN, R. K., KOMORIYA, A., MEYERS, C. A., MILLER, D. M. & SPORN, M. B. 1983. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*, 258, 7155-60.
- ASTOR, D. E., HOELZLER, M. G., HARMAN, R. & BASTIAN, R. P. 2013. Patient factors influencing the concentration of stromal vascular fraction (SVF) for adipose-derived stromal cell (ASC) therapy in dogs. *Can J Vet Res*, 77, 177-82.
- ATIYEH, B. S., GUNN, S. W. & HAYEK, S. N. 2005. State of the art in burn treatment. *World J Surg*, 29, 131-48.
- ATKINSON, M. A. & EISENBARTH, G. S. 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*, 358, 221-9.
- ATRI, S. C., MISRA, J., BISHT, D. & MISRA, K. 1990. Use of homologous platelet factors in achieving total healing of recalcitrant skin ulcers. *Surgery*, 108, 508-12.
- ATTUR, M. G., DAVE, M., AKAMATSU, M., KATOH, M. & AMIN, A. R. 2002. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 1-4.
- AUGELLO, A., TASSO, R., NEGRINI, S. M., CANCEDDA, R. & PENNESI, G. 2007. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 56, 1175-86.
- AZIZ, N., FAHEY, J. L., DETELS, R. & BUTCH, A. W. 2003. Analytical performance of a highly sensitive C-reactive protein-based immunoassay and the effects of laboratory variables on levels of protein in blood. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10, 652-7.
- AZNAR LUCEA, J. & MARTINEZ, M. 2012. [Ethical reflections on cell reprogramming]. *Cuad Bioet*, 23, 287-99.
- BALIUS, R. 2005. Patología Muscular en el Deporte. In: MASSON (ed.). Barcelona.
- BARNES, G. L., KOSTENIUK, P. J., GERSTENFELD, L. C. & EINHORN, T. A. 1999. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res*, 14, 1805-15.
- BARZILAY, R., MELAMED, E. & OFFEN, D. 2009. Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: making transdifferentiation possible. *Stem Cells*, 27, 2509-15.
- BAU, B., MCKENNA, L. A., SOEDER, S., FAN, Z., PECHT, A. & AIGNER, T. 2004. Hepatocyte growth factor/scatter factor is not a potent regulator of anabolic and catabolic gene expression in adult human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 316, 984-90.
- BAUER, D. C., HUNTER, D. J., ABRAMSON, S. B., ATTUR, M., CORR, M., FELSON, D., HEINEGARD, D., JORDAN, J. M., KEPLER, T. B., LANE, N. E., SAXNE, T., TYREE, B. & KRAUS, V. B. 2006. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis Cartilage*, 14, 723-7.
- BAUER, J. E. 2007. Responses of dogs to dietary omega-3 fatty acids. *J Am Vet Med Assoc*, 231, 1657-61.
- BAZZONI, G., DEJANA, E. & DEL MASCHIO, A. 1991. Platelet-neutrophil interactions. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica*, 76, 491-9.
- BECA, T., HERNÁNDEZ, G., MORANTE, S. & BASCONES, A. 2007. Platelet Rich Plasma. A review of literature. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 19.
- BEDSON, J. & CROFT, P. R. 2008. The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: a systematic search and summary of the literature. *BMC Musculoskelet Disord*, 9, 116.

- BELCHER, C., YAQUB, R., FAWTHROP, F., BAYLISS, M. & DOHERTY, M. 1997. Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Ann Rheum Dis*, 56, 299-307.
- BENDELE, A. M. 2001. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 1, 363-76.
- BENDINELLI, P., MATTEUCCI, E., DOGLIOTTI, G., CORSI, M. M., BANFI, G., MARONI, P. & DESIDERIO, M. A. 2010. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF-kappaB inhibition via HGF. *J Cell Physiol*, 225, 757-66.
- BENITO, M. J., VEALE, D. J., FITZGERALD, O., VAN DEN BERG, W. B. & BRESNIHAN, B. 2005. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 64, 1263-7.
- BENNETT, D., ECKERSALL, P. D., WATERSTON, M., MARCHETTI, V., ROTA, A., MCCULLOCH, E. & SBRANA, S. 2013. The effect of robenacoxib on the concentration of C-reactive protein in synovial fluid from dogs with osteoarthritis. *BMC Vet Res*, 9, 42.
- BENNETT, D., ZAINAL ARIFFIN, S. M. & JOHNSTON, P. 2012. Osteoarthritis in the cat: 1. how common is it and how easy to recognise? *J Feline Med Surg*, 14, 65-75.
- BENNETT, N. T. & SCHULTZ, G. S. 1993a. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg*, 165, 728-37.
- BENNETT, N. T. & SCHULTZ, G. S. 1993b. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg*, 166, 74-81.
- BENNETT, S. P., GRIFFITHS, G. D., SCHOR, A. M., LEESE, G. P. & SCHOR, S. L. 2003. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg*, 90, 133-46.
- BERNARDO, M. E., AVANZINI, M. A., PEROTTI, C., COMETA, A. M., MORETTA, A., LENTA, E., DEL FANTE, C., NOVARA, F., DE SILVESTRI, A., AMENDOLA, G., ZUFFARDI, O., MACCARIO, R. & LOCATELLI, F. 2007. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*, 211, 121-30.
- BHANOT, S. & ALEX, J. C. 2002. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg*, 18, 27-33.
- BHOSALE, A. M. & RICHARDSON, J. B. 2008. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*, 87, 77-95.
- BIEBACK, K. & KLUTER, H. 2007. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2, 310-23.
- BIELECKI, T. M., GAZDZIK, T. S., ARENDT, J., SZCZEPANSKI, T., KROL, W. & WIELKOSZYNSKI, T. 2007. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br*, 89, 417-20.
- BIERIE, B. & MOSES, H. L. 2006. TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17, 29-40.
- BIGHAM-SADEGH, A., MIRSHOKRAEI, P., KARIMI, I., ORYAN, A., APARVIZ, A. & SHAFIEI-SARVESTANI, Z. 2012. Effects of adipose tissue stem cell concurrent with greater omentum on experimental long-bone healing in dog. *Connect Tissue Res*, 53, 334-42.
- BIGONY, L. 2008. Arthroscopic surgery: a historical perspective. *Orthop Nurs*, 27, 349-54; quiz 355-6.
- BILIC, G., ZEISBERGER, S. M., MALLIK, A. S., ZIMMERMANN, R. & ZISCH, A. H. 2008. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant*, 17, 955-68.
- BLACK, C., CLAR, C., HENDERSON, R., MACEACHERN, C., MCNAMEE, P., QUAYYUM, Z., ROYLE, P. & THOMAS, S. 2009. The clinical effectiveness of glucosamine and chondroitin supplements in slowing or arresting progression of osteoarthritis of the knee: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*, 13, 1-148.
- BLACK, L. L., GAYNOR, J., ADAMS, C., DHUPA, S., SAMS, A. E., TAYLOR, R., HARMAN, S., GINGERICH, D. A. & HARMAN, R. 2008. 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*, 9, 192-200.
- BLACK, L. L., GAYNOR, J., GAHRING, D., ADAMS, C., ARON, D., HARMAN, S., GINGERICH, D. A. & HARMAN, R. 2007. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther*, 8, 272-84.
- BLACK, R. A., RAUCH, C. T., KOZLOSKY, C. J., PESCHON, J. J., SLACK, J. L., WOLFSON, M. F., CASTNER, B. J., STOCKING, K. L., REDDY, P., SRINIVASAN, S., NELSON, N., BOIANI, N., SCHOOLEY, K. A., GERHART, M., DAVIS, R., FITZNER, J. N., JOHNSON, R. S., PAXTON, R. J., MARCH, C. J. & CERRETTI, D. P. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385, 729-33.
- BLOM, A. B., VAN LENT, P. L., LIBREGTS, S., HOLTHUYSEN, A. E., VAN DER KRAAN, P. M., VAN ROOIJEN, N. & VAN DEN BERG, W. B. 2007. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum*, 56, 147-57.
- BONASSAR, L. J. & TRIPPEL, S. B. 1997. Interaction of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I in the regulation of growth plate chondrocytes. *Exp Cell Res*, 234, 1-6.

- BONEWALD, L. F. & MUNDY, G. R. 1990. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res*, 261-76.
- BONGSO, A. 2006. Blastocyst culture for deriving human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*, 331, 13-22.
- BOWEN-POPE, D. F., VAN KOPPEN, A. & SCHATTEMAN, G. 1991. Is PDGF really important? Testing the hypotheses. *Trends Genet*, 7, 413-8.
- BRADHAM, D. M., IGARASHI, A., POTTER, R. L. & GROTENDORST, G. R. 1991. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol*, 114, 1285-94.
- BRANDAU, S., JAKOB, M., HEMEDA, H., BRUDEREK, K., JANESCHIK, S., BOOTZ, F. & LANG, S. 2010. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J Leukoc Biol*, 88, 1005-15.
- BRAUN, H. J. & GOLD, G. E. 2012. Diagnosis of osteoarthritis: imaging. *Bone*, 51, 278-88.
- BRENN, D., RICHTER, F. & SCHAIBLE, H. G. 2007. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat: an inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum*, 56, 351-9.
- BREW, K., DINAKARPANDIAN, D. & NAGASE, H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1477, 267-83.
- BRITTBURG, M., TALLHEDEN, T., SJOGREN-JANSSON, B., LINDAHL, A. & PETERSON, L. 2001. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop Relat Res*, 337-48.
- BROECKX, S., SULS, M., BEERTS, C., VANDENBERGHE, A., SEYS, B., WUERTZ-KOZAK, K., DUCHATEAU, L. & SPAAS, J. H. 2014. Allogenic Mesenchymal Stem Cells as a Treatment for Equine Degenerative Joint Disease: a Pilot Study. *Curr Stem Cell Res Ther*.
- BRUDER, S. P., FINK, D. J. & CAPLAN, A. I. 1994. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*, 56, 283-94.
- BRUYN, G. A., MOLLER, I., KLAUSER, A. & MARTINOLI, C. 2012. Soft tissue pathology: regional pain syndromes, nerves and ligaments. *Rheumatology (Oxford)*, 51 Suppl 7, vii22-5.
- BUBNOV, R., YEVSEENKO, V. & SEMENIV, I. 2013. Ultrasound guided injections of platelets rich plasma for muscle injury in professional athletes. Comparative study. *Med Ultrason*, 15, 101-5.
- BUCKWALTER, J. A., MANKIN, H. J. & GRODZINSKY, A. J. 2005. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect*, 54, 465-80.
- BUDSBERG, S. C., LENZ, M. E. & THONAR, E. J. 2006. Serum and synovial fluid concentrations of keratan sulfate and hyaluronan in dogs with induced stifle joint osteoarthritis following cranial cruciate ligament transection. *Am J Vet Res*, 67, 429-32.
- BURGESS, A. W. 1989. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Br Med Bull*, 45, 401-24.
- BURNSTOCK, G. 2002. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 364-73.
- BURR, D. B. 2004. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 12 Suppl A, S20-30.
- BURSTEIN, D., GRAY, M., MOSHER, T. & DARDZINSKI, B. 2009. Measures of molecular composition and structure in osteoarthritis. *Radiol Clin North Am*, 47, 675-86.
- BYERS, P. H., WALLIS, G. A. & WILLING, M. C. 1991. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J Med Genet*, 28, 433-42.
- CABRAL, W. A. & MARINI, J. C. 2004. High proportion of mutant osteoblasts is compatible with normal skeletal function in mosaic carriers of osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 74, 752-60.
- CAHAN, P. & DALEY, G. Q. 2013. Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 357-68.
- CAKIR, S., HEPGULER, S., OZTURK, C., KORKMAZ, M., ISLETEN, B. & ATAMAZ, F. C. 2013. Efficacy of Therapeutic Ultrasound for the Management of Knee Osteoarthritis: A Randomized, Controlled, and Double-Blind Study. *Am J Phys Med Rehabil*.
- CALVO, E., PALACIOS, I., DELGADO, E., RUIZ-CABELLO, J., HERNANDEZ, P., SANCHEZ-PERNAUTE, O., EGIDO, J. & HERRERO-BEAUMONT, G. 2001. High-resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 9, 463-72.
- CAMAFEITA, L. E. 2011. *Aplicación de técnicas de genómica y proteómica a la búsqueda de alteraciones moleculares en células madre mesenquimales y condrocitos de pacientes con artrosis de rodilla*. Universidad autónoma de Madrid.
- CANALIS, E. 1992. Clinical review 35: Growth factors and their potential clinical value. *J Clin Endocrinol Metab*, 75, 1-4.
- CANALIS, E., MCCARTHY, T. & CENTRELLA, M. 1988. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest*, 81, 277-81.
- CAPLAN, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9, 641-50.
- CAPLAN, A. I. 1995. Osteogenesis imperfecta, rehabilitation medicine, fundamental research and mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res*, 31, S9-14.

- CAPLAN, A. I. & DENNIS, J. E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 98, 1076-84.
- CARMELIET, P. & COLLEN, D. 1999. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol*, 237, 133-58.
- CARRANZA-BENCANO, A., GARCIA-PAINO, L., ARMAS PADRON, J. R. & CAYUELA DOMINGUEZ, A. 2000. Neochondrogenesis in repair of full-thickness articular cartilage defects using free autogenous periosteal grafts in the rabbit. A follow-up in six months. *Osteoarthritis Cartilage*, 8, 351-8.
- CASPI, D., SNEL, F. W., BATT, R. M., BENNETT, D., RUTTEMAN, G. R., HARTMAN, E. G., BALTZ, M. L., GRUYS, E. & PEPYS, M. B. 1987. C-reactive protein in dogs. *Am J Vet Res*, 48, 919-21.
- CASSELLA, M. A., MOSNA, F., MICHELETTI, A., LISI, V., TAMASSIA, N., CONT, C., CALZETTI, F., PELLETIER, M., PIZZOLO, G. & KRAMPERA, M. 2011. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells*, 29, 1001-11.
- CATERSON, B., HUGHES, C. E., ROUGHLEY, P. & MORT, J. S. 1995. Anabolic and catabolic markers of proteoglycan metabolism in osteoarthritis. *Acta Orthop Scand Suppl*, 266, 121-4.
- CENTEELLA, T., OLIVA, E. & GARCÍA, J. 2005. Tratamiento de las heridas infectadas tras cirugía cardíaca con la utilización de plasma rico en factores de crecimiento: resultados preliminares. *Anales de Cirugía Cardíaca y Vasculat*, 11, 208- 213.
- CENTENO, C. J., BUSSE, D., KISIDAY, J., KEOHAN, C., FREEMAN, M. & KARLI, D. 2008. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician*, 11, 343-53.
- CENTRELLA, M., MASSAGUE, J. & CANALIS, E. 1986. Human platelet-derived transforming growth factor-beta stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology*, 119, 2306-12.
- CHAN, T. W., DALINKA, M. K., STEINBERG, M. E. & KRESSEL, H. Y. 1991. MRI appearance of femoral head osteonecrosis following core decompression and bone grafting. *Skeletal Radiol*, 20, 103-7.
- CHANDRASEKHAR, S., HARVEY, A. K. & STACK, S. T. 1993. Degradative and repair responses of cartilage to cytokines and growth factors occur via distinct pathways. *Agents Actions Suppl*, 39, 121-5.
- CHANG, T., TANG, K., TAO, X., CAO, H., LI, H., CHEN, Q., CHEN, L., ZHOU, J., ZHOU, B. & XU, J. 2010. [Treatment of early avascular necrosis of femoral head by core decompression combined with autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 24, 739-43.
- CHAO, K. C., CHAO, K. F., FU, Y. S. & LIU, S. H. 2008. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One*, 3, e1451.
- CHEN, C., TAMBE, D. T., DENG, L. & YANG, L. 2013. Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte. *Am J Physiol Cell Physiol*, 305, C1202-8.
- CHEN, C. T., BURTON-WURSTER, N., BORDEN, C., HUEFFER, K., BLOOM, S. E. & LUST, G. 2001. Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. *J Orthop Res*, 19, 703-11.
- CHEN, F. H. & TUAN, R. S. 2008. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther*, 10, 223.
- CHEN, H. C., SHAH, S., STABLER, T. V., LI, Y. J. & KRAUS, V. B. 2008. Biomarkers associated with clinical phenotypes of hand osteoarthritis in a large multigenerational family: the CARRIAGE family study. *Osteoarthritis Cartilage*, 16, 1054-9.
- CHEN, H. T., LEE, M. J., CHEN, C. H., CHUANG, S. C., CHANG, L. F., HO, M. L., HUNG, S. H., FU, Y. C., WANG, Y. H., WANG, H. I., WANG, G. J., KANG, L. & CHANG, J. K. 2012. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med*, 16, 582-93.
- CHEN, M., LAM, B. K., LUSTER, A. D., ZARINI, S., MURPHY, R. C., BAIR, A. M., SOBERMAN, R. J. & LEE, D. M. 2010. Joint tissues amplify inflammation and alter their invasive behavior via leukotriene B4 in experimental inflammatory arthritis. *J Immunol*, 185, 5503-11.
- CHEN, S., LIU, Z., TIAN, N., ZHANG, J., YEI, F., DUAN, B., ZHU, Z., LIN, S. & KWAN, T. W. 2006a. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol*, 18, 552-6.
- CHEN, S. L., FANG, W. W., YE, F., LIU, Y. H., QIAN, J., SHAN, S. J., ZHANG, J. J., CHUNHUA, R. Z., LIAO, L. M., LIN, S. & SUN, J. P. 2004. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 94, 92-5.
- CHEN, T. H., CHEN, L., HSIEH, M. S., CHANG, C. P., CHOU, D. T. & TSAI, S. H. 2006b. Evidence for a protective role for adiponectin in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*, 1762, 711-8.
- CHERRY, A. B. & DALEY, G. Q. 2012. Reprogramming cellular identity for regenerative medicine. *Cell*, 148, 1110-22.
- CHIEREGATO, K., CASTEGNARO, S., MADEO, D., ASTORI, G., PEGORARO, M. & RODEGHIERO, F. 2011. Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue. *Cytotherapy*, 13, 933-43.
- CHO, H. S., SONG, I. H., PARK, S. Y., SUNG, M. C., AHN, M. W. & SONG, K. E. 2011. Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich plasma and its influence on human mesenchymal stem cells. *Korean J Lab Med*, 31, 212-8.

- CHO, J. K., KIM, Y. H., PARK, I. Y., SHIN, J. C., OH, M. K., PARK, S. J., KIM, N. H. & KIM, I. S. 2009. Polymorphism of haptoglobin in patients with premature rupture of membrane. *Yonsei Med J*, 50, 132-6.
- CHOPRA, R. & ANASTASSIADES, T. 1998. Specificity and synergism of polypeptide growth factors in stimulating the synthesis of proteoglycans and a novel high molecular weight anionic glycoprotein by articular chondrocyte cultures. *J Rheumatol*, 25, 1578-84.
- CHRISTENSEN, R., BARTELS, E. M., ASTRUP, A. & BLIDDAL, H. 2007. Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*, 66, 433-9.
- CHU, Q., LOPEZ, M., HAYASHI, K., IONESCU, M., BILLINGHURST, R. C., JOHNSON, K. A., POOLE, A. R. & MARKEL, M. D. 2002. Elevation of a collagenase generated type II collagen neoepitope and proteoglycan epitopes in synovial fluid following induction of joint instability in the dog. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 662-9.
- CHUMA, H., MIZUTA, H., KUDO, S., TAKAGI, K. & HIRAKI, Y. 2004. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*, 12, 834-42.
- CHUNG, C. S., FUJITA, N., KAWAHARA, N., YUI, S., NAM, E. & NISHIMURA, R. 2013. A Comparison of Neurosphere Differentiation Potential of Canine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Vet Med Sci*.
- CICHA, I. & GOPPELT-STRUEBE, M. 2009. Connective tissue growth factor: context-dependent functions and mechanisms of regulation. *Biofactors*, 35, 200-8.
- CID, M. C., GRANT, D. S., HOFFMAN, G. S., AUERBACH, R., FAUCI, A. S. & KLEINMAN, H. K. 1993. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest*, 91, 977-85.
- CIVININI, R., NISTRÌ, L., MARTINI, C., REDL, B., RISTORI, G. & INNOCENTI, M. 2013. Growth factors in the treatment of early osteoarthritis. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 10, 26-9.
- CLEMETT, D. & GOA, K. L. 2000. Celecoxib: a review of its use in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acute pain. *Drugs*, 59, 957-80.
- COHEN, S. 1962. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*, 237, 1555-62.
- CONROZIER, T., CARLIER, M. C., MATHIEU, P., COLSON, F., DEBARD, A. L., RICHARD, S., FAVRET, H., BIENVENU, J. & VIGNON, E. 2000. Serum levels of YKL-40 and C reactive protein in patients with hip osteoarthritis and healthy subjects: a cross sectional study. *Ann Rheum Dis*, 59, 828-31.
- CONROZIER, T., CHAPPUIS-CELLIER, C., RICHARD, M., MATHIEU, P., RICHARD, S. & VIGNON, E. 1998. Increased serum C-reactive protein levels by immunonephelometry in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis. *Rev Rhum Engl Ed*, 65, 759-65.
- COOPER, C., SNOW, S., MCALINDON, T. E., KELLINGRAY, S., STUART, B., COGGON, D. & DIEPPE, P. A. 2000. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 43, 995-1000.
- COPLEY, M. R., BEER, P. A. & EAVES, C. J. 2012. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell*, 10, 690-7.
- CORCIONE, A., BENVENUTO, F., FERRETTI, E., GIUNTI, D., CAPPIELLO, V., CAZZANTI, F., RISSO, M., GUALANDI, F., MANCARDI, G. L., PISTOIA, V. & UCCELLI, A. 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107, 367-72.
- COWAN, C. A., ATIENZA, J., MELTON, D. A. & EGGAN, K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309, 1369-73.
- CREANEY, L. & HAMILTON, B. 2008. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med*, 42, 314-20.
- CRISMAN, M. V., SCARRATT, W. K. & ZIMMERMAN, K. L. 2008. Blood proteins and inflammation in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 24, 285-97, vi.
- CROSSLEY, R., COLOMA, A. & RÍOS, C. 2010. Determinación de proteína C-reactiva en hembras caninas con tumores mamarios benignos y malignos. *Arch Med Vet*, 42, 101-105.
- CUERVO, B., RUBIO, M., SOPENA, J., DOMINGUEZ, J. M., VILAR, J., MORALES, M., CUGAT, R. & CARRILLO, J. M. 2014. Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *Int J Mol Sci*, 15, 13437-60.
- CUI, Q., XIAO, Z., LI, X., SALEH, K. J. & BALIAN, G. 2006. Use of genetically engineered bone-marrow stem cells to treat femoral defects: an experimental study. *J Bone Joint Surg Am*, 88 Suppl 3, 167-72.
- CULLINANE, A. B., O'CALLAGHAN, P., MCDERMOTT, K., KEOHANE, C. & CLEARY, P. E. 2002. Effects of autologous platelet concentrate and serum on retinal wound healing in an animal model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 240, 35-41.
- CURROS-CRIADO, M. M. & HERRERO, J. F. 2007. The antinociceptive effect of systemic gabapentin is related to the type of sensitization-induced hyperalgesia. *J Neuroinflammation*, 4, 15.
- DAMIA, E. 2012. *Estudio experimental sobre la influencia del plasma rico en factores de crecimiento en la concentración sérica del factor de crecimiento insulínico tipo I y la proteína c-reactiva en la especie canina* Universidad Cardenal Herrera- CEU.

- DAMON, S. E., HAUGK, K. L., BIRNBAUM, R. S. & QUINN, L. S. 1998. Retrovirally mediated overexpression of insulin-like growth factor binding protein 4: evidence that insulin-like growth factor is required for skeletal muscle differentiation. *J Cell Physiol*, 175, 109-20.
- DANKBAR, B., NEUGEBAUER, K., WUNRAU, C., TIBESKU, C. O., SKWARA, A., PAP, T. & FUCHS-WINKELMANN, S. 2007. Hepatocyte growth factor induction of macrophage chemoattractant protein-1 and osteophyte-inducing factors in osteoarthritis. *J Orthop Res*, 25, 569-77.
- DAVATCHI, F., ABDOLLAHI, B. S., MOHYEDDIN, M., SHAHRAM, F. & NIKBIN, B. 2011. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis*, 14, 211-5.
- DAVIDSON, R. K., WATERS, J. G., KEVORKIAN, L., DARRAH, C., COOPER, A., DONELL, S. T. & CLARK, I. M. 2006. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther*, 8, R124.
- DAVIS, A. M., PERRUCCIO, A. V., CANIZARES, M., HAWKER, G. A., ROOS, E. M., MAILLEFERT, J. F. & LOHMANDER, L. S. 2009. Comparative, validity and responsiveness of the HOOS-PS and KOOS-PS to the WOMAC physical function subscale in total joint replacement for osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 17, 843-7.
- DE ANDRES, M. C., MANEIRO, E., MARTIN, M. A., ARENAS, J. & BLANCO, F. J. 2013. Nitric oxide compounds have different effects profiles on human articular chondrocyte metabolism. *Arthritis Res Ther*, 15, R115.
- DE BARI, C., DELL'ACCIO, F., KARYSTINOU, A., GUILLOT, P. V., FISK, N. M., JONES, E. A., MCGONAGLE, D., KHAN, I. M., ARCHER, C. W., MITSIADIS, T. A., DONALDSON, A. N., LUYTEN, F. P. & PITZALIS, C. 2008. A biomarker-based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*, 58, 240-50.
- DE BARI, C., DELL'ACCIO, F., TYLZANOWSKI, P. & LUYTEN, F. P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 44, 1928-42.
- DE BARI, C., DELL'ACCIO, F., VANDENABEELE, F., VERMEESCH, J. R., RAYMACKERS, J. M. & LUYTEN, F. P. 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol*, 160, 909-18.
- DE CAESTECKER, M. 2004. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15, 1-11.
- DE LA MATA, J. 2013. Platelet rich plasma. A new treatment tool for the rheumatologist? *Reumatol Clin*, 9, 166-71.
- DEANGELIS, P. L. 1999. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cell Mol Life Sci*, 56, 670-82.
- DEBERG, M., LABASSE, A., CHRISTGAU, S., CLOOS, P., BANG HENRIKSEN, D., CHAPELLE, J. P., ZEGELS, B., REGINSTER, J. Y. & HENROTIN, Y. 2005. 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 Cartilage*, 13, 258-65.
- DERYNCK, R., JARRETT, J. A., CHEN, E. Y., EATON, D. H., BELL, J. R., ASSOIAN, R. K., ROBERTS, A. B., SPORN, M. B. & GOEDDEL, D. V. 1985. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*, 316, 701-5.
- DEUEL, T. F., HUANG, J. S., PROFFITT, R. T., BAENZIGER, J. U., CHANG, D. & KENNEDY, B. B. 1981. Human platelet-derived growth factor. Purification and resolution into two active protein fractions. *J Biol Chem*, 256, 8896-9.
- DHILLON, R. S., SCHWARZ, E. M. & MALONEY, M. D. 2012. Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Res Ther*, 14, 219.
- DI CESARE, P. & ABRAMSON, S. 2005. Pathogenesis of osteoarthritis. In: HARRIS, E., BUDD, R., FIRESTEIN, G., GENOVESE, M., SERGENT, J., RUDDY, S. & SLEDGE, C. (eds.) *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: Elsevier.
- DI NICOLA, M., CARLO-STELLA, C., MAGNI, M., MILANESI, M., LONGONI, P. D., MATTEUCCI, P., GRISANTI, S. & GIANNI, A. M. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99, 3838-43.
- DIEKMAN, B. O. & GUILAK, F. 2013. Stem cell-based therapies for osteoarthritis: challenges and opportunities. *Curr Opin Rheumatol*, 25, 119-26.
- DIEPPE, P. A. & LOHMANDER, L. S. 2005. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet*, 365, 965-73.
- DING, D. C., SHYU, W. C., CHIANG, M. F., LIN, S. Z., CHANG, Y. C., WANG, H. J., SU, C. Y. & LI, H. 2007. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model. *Neurobiol Dis*, 27, 339-53.
- DJOUAD, F., BONY, C., HAUPL, T., UZE, G., LAHLOU, N., LOUIS-PLENCE, P., APPARAILLY, F., CANOVAS, F., REME, T., SANY, J., JORGENSEN, C. & NOEL, D. 2005. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther*, 7, R1304-15.
- DOBRYSZYCKA, W. 1997. Biological functions of haptoglobin—new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 35, 647-54.
- DOHAN EHRENFEST, D. M., ANDIA, I., ZUMSTEIN, M. A., ZHANG, C. Q., PINTO, N. R. & BIELECKI, T. 2014. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use

- in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J*, 4, 3-9.
- DOMINGUEZ, J. M. 2014. Caracterización de los diferentes tipos de preparación del PRP. *IV Jornadas Fundación García Cugat de Investigación Biomédica*. Salou, Tarragona.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- DORRONSORO, A., FERNANDEZ-RUEDA, J., FECHTER, K., FERRIN, I., SALCEDO, J. M., JAKOBSSON, E. & TRIGUEROS, C. 2013. Human Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Bone Marrow Res*, 2013, 203643.
- DOUGADOS, M. 2005. Clinical features of osteoarthritis. In: HARRIS, E., BUDD, R., FIRESTEIN, G., GENOVESE, M., SERGENT, J., RUDDY, S. & SLEDGE, C. (eds.) *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: Elsevier.
- DRAGOMIR, A. D., KRAUS, V. B., RENNER, J. B., LUTA, G., CLARK, A., VILIM, V., HOCHBERG, M. C., HELMICK, C. G. & JORDAN, J. M. 2002. Serum cartilage oligomeric matrix protein and clinical signs and symptoms of potential pre-radiographic hip and knee pathology. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 687-91.
- DRENGK, A., ZAPF, A., STURMER, E. K., STURMER, K. M. & FROSCH, K. H. 2009. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*, 189, 317-26.
- DRIVER, V. R., HANFT, J., FYLLING, C. P. & BERIOU, J. M. 2006. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy Wound Manage*, 52, 68-70, 72, 74 passim.
- DUAN, C. 2002. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *J Endocrinol*, 175, 41-54.
- DUFF, G. W. 1994. Cytokines and acute phase proteins in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl*, 100, 9-19.
- EDELMAN, E. R., MATHIOWITZ, E., LANGER, R. & KLAGSBRUN, M. 1991. Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 12, 619-26.
- EGERMANN, M., GERHARDT, C., BARTH, A., MAESTRONI, G. J., SCHNEIDER, E. & ALINI, M. 2011. Pinealectomy affects bone mineral density and structure--an experimental study in sheep. *BMC Musculoskelet Disord*, 12, 271.
- EGLOFF, C., HUGLE, T. & VALDERRABANO, V. 2012. Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis. *Swiss Med Wkly*, 142, w13583.
- EMA, H., MORITA, Y. & SUDA, T. 2014. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, 42, 74-82 e2.
- EMA, H., SUDO, K., SEITA, J., MATSUBARA, A., MORITA, Y., OSAWA, M., TAKATSU, K., TAKAKI, S. & NAKAUCHI, H. 2005. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Dev Cell*, 8, 907-14.
- EMADEDIN, M., AGHDAMI, N., TAGHIYAR, L., FAZELI, R., MOGHADASALI, R., JAHANGIR, S., FARJAD, R. & BAGHABAN ESLAMINEJAD, M. 2012. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Arch Iran Med*, 15, 422-8.
- ENDE, N., CHEN, R. & REDDI, A. S. 2004. Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 325, 665-9.
- ENGERT, J. C., BERGLUND, E. B. & ROSENTHAL, N. 1996. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol*, 135, 431-40.
- EPPLEY, B. L., WOODDELL, J. E. & HIGGINS, J. 2004. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 114, 1502-8.
- ESPANHA, M. M. 2010. [Articular cartilage: structure and histochemical composition]. *Acta Reumatol Port*, 35, 424-33.
- EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-6.
- EYRE, D. R., WEIS, M. A. & WU, J. J. 2006. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater*, 12, 57-63.
- FAHIE, M. A., ORTOLANO, G. A., GUERCIO, V., SCHAFFER, J. A., JOHNSTON, G., AU, J., HETTLICH, B. A., PHILLIPS, T., ALLEN, M. J. & BERTONE, A. L. 2013. A randomized controlled trial of the efficacy of autologous platelet therapy for the treatment of osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 243, 1291-7.
- FAN, J., VARSHNEY, R. R., REN, L., CAI, D. & WANG, D. A. 2009. Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 15, 75-86.
- FANG, J., ZHENG, N., WANG, Y., CAO, H., SUN, S., DAI, J., LI, Q. & ZHANG, Y. 2013. Understanding Acupuncture Based on ZHENG Classification from System Perspective. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 956967.
- FARRAG, T. Y., LEHAR, M., VERHAEGEN, P., CARSON, K. A. & BYRNE, P. J. 2007. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope*, 117, 157-65.
- FEITOSA, M. L., FADEL, L., BELTRAO-BRAGA, P. C., WENCESLAU, C. V., KERKIS, I., KERKIS, A., BIRGEL JUNIOR, E. H., MARTINS, J. F., MARTINS DDOS, S., MIGLINO, M. A. & AMBROSIO, C. E. 2010. Successful transplant of

- mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head: preliminary results. *Acta Cir Bras*, 25, 416-22.
- FELSON, D. T., LAWRENCE, R. C., DIEPPE, P. A., HIRSCH, R., HELMICK, C. G., JORDAN, J. M., KINGTON, R. S., LANE, N. E., NEVITT, M. C., ZHANG, Y., SOWERS, M., MCALINDON, T., SPECTOR, T. D., POOLE, A. R., YANOVSKI, S. Z., ATESHIAN, G., SHARMA, L., BUCKWALTER, J. A., BRANDT, K. D. & FRIES, J. F. 2000. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med*, 133, 635-46.
- FERNANDEZ, J. A. 2012. *Evaluación de la reparación tendinosa tras la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento en un modelo experimental de rotura de tendón de aquiles en oveja*. Universidad de Córdoba.
- FERNANDEZ-COSTA, C., CALAMIA, V., FERNANDEZ-PUENTE, P., CAPELO-MARTINEZ, J. L., RUIZ-ROMERO, C. & BLANCO, F. J. 2012. Sequential depletion of human serum for the search of osteoarthritis biomarkers. *Proteome Sci*, 10, 55.
- FERNANDEZ-NEBRO, A., MARSAL, S., CHATHAM, W. & RAHMAN, A. 2012. Systemic lupus erythematosus: genomics, mechanisms, and therapies. *Clin Dev Immunol*, 2012, 926931.
- FERNIHOUGH, J., GENTRY, C., MALCANGIO, M., FOX, A., REDISKE, J., PELLAS, T., KIDD, B., BEVAN, S. & WINTER, J. 2004. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain*, 112, 83-93.
- FERRARA, N. 2002. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*, 29, 10-4.
- FERRARI, M., ZIA, S., VALBONESI, M., HENRIQUET, F., VENERE, G., SPAGNOLO, S., GRASSO, M. A. & PANZANI, I. 1987. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs*, 10, 47-50.
- FILARDO, G., KON, E., BUDA, R., TIMONCINI, A., DI MARTINO, A., CENACCHI, A., FORNASARI, P. M., GIANNINI, S. & MARCACCI, M. 2011. Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 19, 528-35.
- FILARDO, G., PRESTI, M. L., KON, E. & MARCACCI, M. 2010. Nonoperative biological treatment approach for partial Achilles tendon lesion. *Orthopedics*, 33, 120-3.
- FLORYAN, K. M. & BERGHOFF, W. J. 2004. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN J*, 80, 668-74, quiz 675-8.
- FOLDAGER, C. B. 2013. Advances in autologous chondrocyte implantation and related techniques for cartilage repair. *Dan Med J*, 60, B4600.
- FORTIER, L. A., BARKER, J. U., STRAUSS, E. J., MCCARREL, T. M. & COLE, B. J. 2011. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*, 469, 2706-15.
- FORTIER, L. A. & TRAVIS, A. J. 2011. Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Res Ther*, 2, 9.
- FORTIN, P. R., PENROD, J. R., CLARKE, A. E., ST-PIERRE, Y., JOSEPH, L., BELISLE, P., LIANG, M. H., FERLAND, D., PHILLIPS, C. B., MAHOMED, N., TANZER, M., SLEDGE, C., FOSSEL, A. H. & KATZ, J. N. 2002. Timing of total joint replacement affects clinical outcomes among patients with osteoarthritis of the hip or knee. *Arthritis Rheum*, 46, 3327-30.
- FRASER, J. K., WULUR, I., ALFONSO, Z. & HEDRICK, M. H. 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 24, 150-4.
- FRASER, J. R., LAURENT, T. C. & LAURENT, U. B. 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*, 242, 27-33.
- FRECHETTE, J. P., MARTINEAU, I. & GAGNON, G. 2005. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res*, 84, 434-9.
- FRENKEL, S. R. & DI CESARE, P. E. 2004. Scaffolds for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng*, 32, 26-34.
- FRIEDENSTEIN, A. J., DERIGLASOVA, U. F., KULAGINA, N. N., PANASUK, A. F., RUDAKOWA, S. F., LURIA, E. A. & RUADKOW, I. A. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*, 2, 83-92.
- FRUHBECK, G., GOMEZ-AMBROSI, J., MURUZABAL, F. J. & BURRELL, M. A. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280, E827-47.
- FUKUDA, A., KATO, K., HASEGAWA, M., HIRATA, H., SUDO, A., OKAZAKI, K., TSUTA, K., SHIKINAMI, Y. & UCHIDA, A. 2005. Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 26, 4301-8.
- GABAY, C. & KUSHNER, I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 340, 448-54.
- GAISSMAIER, C., FRITZ, J., KRACKHARDT, T., FLESCH, I., AICHER, W. K. & ASHAMMAKHI, N. 2005. Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials*, 26, 1953-60.
- GAISSMAIER, C., KOH, J. L. & WEISE, K. 2008. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury*, 39 Suppl 1, S88-96.
- GALVIN, K. M., DONOVAN, M. J., LYNCH, C. A., MEYER, R. I., PAUL, R. J., LORENZ, J. N., FAIRCHILD-HUNTRESS, V., DIXON, K. L., DUNMORE, J. H., GIMBRONE, M. A., JR., FALB, D. & HUSZAR, D. 2000. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet*, 24, 171-4.

- GANGJI, V., DE MAERTELAER, V. & HAUZEUR, J. P. 2011. Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study. *Bone*, 49, 1005-9.
- GANGJI, V., HAUZEUR, J. P., MATOS, C., DE MAERTELAER, V., TOUNGOUZ, M. & LAMBERMONT, M. 2004. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg Am*, 86-A, 1153-60.
- GARCIA-OLMO, D., GARCIA-ARRANZ, M., HERREROS, D., PASCUAL, I., PEIRO, C. & RODRIGUEZ-MONTES, J. A. 2005. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*, 48, 1416-23.
- GARG, S., MADKAIKAR, M. & GHOSH, K. 2013. Investigating cell surface markers on normal hematopoietic stem cells in three different niche conditions. *Int J Stem Cells*, 6, 129-33.
- GARNERO, P. & DELMAS, P. D. 2003. Biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 15, 641-6.
- GARNERO, P., PIPERNO, M., GINEYTS, E., CHRISTGAU, S., DELMAS, P. D. & VIGNON, E. 2001. Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis*, 60, 619-26.
- GEHRING, S., HOERAUF, H., LAQUA, H., KIRCHNER, H. & KLUTER, H. 1999. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*, 39, 144-8.
- GELBER, A. C. 2014. In the clinic. Osteoarthritis. *Ann Intern Med*, 161, ITC1-16.
- GENTRY, P. 2000. Platelet biology. In: FELDMAN, B., ZINKL, J. & JAIN, N. (eds.) *Schlam's veterinary haematology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- GEORGE, J. N. 2000. Platelets. *Lancet*, 355, 1531-9.
- GHARBI, M., DEBERG, M. & HENROTIN, Y. 2011. Application for proteomic techniques in studying osteoarthritis: a review. *Front Physiol*, 2, 90.
- GHARBI, M., SANCHEZ, C., MAZZUCHELLI, G., DE PAUW, E. & HENROTIN, Y. 2013. Identification of differential pattern of protein expression in canine osteoarthritis serum after anterior cruciate ligament transection: a proteomic analysis. *Vet J*, 197, 848-53.
- GIANNINI, S., VANNINI, F., TIMONCINI, A., GHERMANDI, R. & RUFFILLI, A. 2008. The treatment of severe chondropaties of the knee with autologous platelet rich plasma injections: Preliminary results. *Osteoarthritis Cartilage*, 16, S126-S127.
- GIATSIDIS, G., DALLA VENEZIA, E. & BASSETTO, F. 2013. The role of gene therapy in regenerative surgery: updated insights. *Plast Reconstr Surg*, 131, 1425-35.
- GILSANZ, F., ESCALANTE, F., AURAY, C. & OLBES, A. G. 2001. Treatment of leg ulcers in beta-thalassaemia intermedia: use of platelet-derived wound healing factors from the patient's own platelets. *Br J Haematol*, 115, 710.
- GIMBLE, J. M., KATZ, A. J. & BUNNELL, B. A. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 100, 1249-60.
- GIUSTINA, A. & VELDHIJ, J. D. 1998. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev*, 19, 717-97.
- GIZA, E. & HOWELL, S. 2013. Allograft juvenile articular cartilage transplantation for treatment of talus osteochondral defects. *Foot Ankle Spec*, 6, 141-4.
- GLASSON, S. S., ASKEW, R., SHEPPARD, B., CARITO, B. A., BLANCHET, T., MA, H. L., FLANNERY, C. R., KANKI, K., WANG, E., PELUSO, D., YANG, Z., MAJUMDAR, M. K. & MORRIS, E. A. 2004. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum*, 50, 2547-58.
- GLEIZES, P. E., MUNGER, J. S., NUNES, I., HARPEL, J. G., MAZZIERI, R., NOGUERA, I. & RIFKIN, D. B. 1997. TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells*, 15, 190-7.
- GNECCHI, M., ZHANG, Z., NI, A. & DZAU, V. J. 2008. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*, 103, 1204-19.
- GOBBI, A., LAD, D. & KARNATZIKOS, G. 2014. The effects of repeated intra-articular PRP injections on clinical outcomes of early osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*.
- GODLEY, D. R. 2013. Assessment, diagnosis, and treatment of developmental dysplasia of the hip. *JAAPA*, 26, 54-8.
- GOLDRING, M. B. 2012. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 4, 269-85.
- GOLDRING, M. B. & MARCU, K. B. 2009. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*, 11, 224.
- 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. 2011. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*, 21, 202-20.
- GOLDRING, M. B., TSUCHIMOCCHI, K. & IJIRI, K. 2006. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem*, 97, 33-44.
- GOLDRING, S. R. & GOLDRING, M. B. 2004. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*, S27-36.
- GOLDSACK, A. 2005. *Determinación de proteína C-reactiva pre y post quirúrgica en hembras caninas sometidas a ovariectomía*. Universidad Santo Tomás.

- GOLIGHTLY, Y. M., MARSHALL, S. W., KRAUS, V. B., RENNER, J. B., VILLAVECES, A., CASTEEL, C. & JORDAN, J. M. 2011. Biomarkers of incident radiographic knee osteoarthritis: do they vary by chronic knee symptoms? *Arthritis Rheum*, 63, 2276-83.
- GONZALEZ, M. A., GONZALEZ-REY, E., RICO, L., BUSCHER, D. & DELGADO, M. 2009. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*, 60, 1006-19.
- GONZALEZ-REY, E., GONZALEZ, M. A., VARELA, N., O'VALLE, F., HERNANDEZ-CORTES, P., RICO, L., BUSCHER, D. & DELGADO, M. 2010. 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*, 69, 241-8.
- GORANOV, N. V. 2007. Serum markers of lipid peroxidation, antioxidant enzymatic defense, and collagen degradation in an experimental (Pond-Nuki) canine model of osteoarthritis. *Vet Clin Pathol*, 36, 192-5.
- GOSPODAROWICZ, D., NEUFELD, G. & SCHWEIGERER, L. 1987. Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J Cell Physiol Suppl*, Suppl 5, 15-26.
- GOTHERSTROM, C., WESTGREN, M., SHAW, S. W., ASTROM, E., BISWAS, A., BYERS, P. H., MATTAR, C. N., GRAHAM, G. E., TASLIMI, J., EWALD, U., FISK, N. M., YEOH, A. E., LIN, J. L., CHENG, P. J., CHOOLANI, M., LE BLANC, K. & CHAN, J. K. 2014. Pre- and postnatal transplantation of fetal mesenchymal stem cells in osteogenesis imperfecta: a two-center experience. *Stem Cells Transl Med*, 3, 255-64.
- GOVINDEN, R. & BHOOLA, K. D. 2003. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther*, 98, 257-65.
- GRAGEDA, E. 2004. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent*, 13, 301-9.
- GRAGEDA, E., LOZADA, J. L., BOYNE, P. J., CAPLANIS, N. & MCMILLAN, P. J. 2005. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. *J Oral Implantol*, 31, 2-17.
- GRANDE, D. A., SINGH, I. J. & PUGH, J. 1987. Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *Anat Rec*, 218, 142-8.
- GRATWOHL, A., BALDOMERO, H., HORISBERGER, B., SCHMID, C., PASSWEG, J. & URBANO-ISPIZUA, A. 2002. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood*, 100, 2374-86.
- GRIFFIN, T. M., HUEBNER, J. L., KRAUS, V. B. & GUILAK, F. 2009. Extreme obesity due to impaired leptin signaling in mice does not cause knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 60, 2935-44.
- GUDBERGSEN, H., BOESEN, M., LOHMANDER, L. S., CHRISTENSEN, R., HENRIKSEN, M., BARTELS, E. M., CHRISTENSEN, P., RINDEL, L., AABOE, J., DANNESKIOLD-SAMSOE, B., RIECKE, B. F. & BLIDDAL, H. 2012. Weight loss is effective for symptomatic relief in obese subjects with knee osteoarthritis independently of joint damage severity assessed by high-field MRI and radiography. *Osteoarthritis Cartilage*, 20, 495-502.
- GUERCIO, A., DI MARCO, P., CASELLA, S., CANNELLA, V., RUSSOTTO, L., PURPARI, G., DI BELLA, S. & PICCIONE, G. 2012. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol Int*, 36, 189-94.
- GUERMAZI, A., BURSTEIN, D., CONAGHAN, P., ECKSTEIN, F., HELLIO LE GRAVERAND-GASTINEAU, M. P., KEEN, H. & ROEMER, F. W. 2008. Imaging in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 34, 645-87.
- GUERMAZI, A., HAYASHI, D., ECKSTEIN, F., HUNTER, D. J., DURYEA, J. & ROEMER, F. W. 2013. Imaging of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 39, 67-105.
- GUERNE, P. A., SUBLET, A. & LOTZ, M. 1994. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol*, 158, 476-84.
- GUEVREMONT, M., MARTEL-PELLETIER, J., MASSICOTTE, F., TARDIF, G., PELLETIER, J. P., RANGER, P., LAJEUNESSE, D. & REBOUL, P. 2003. Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage. *J Bone Miner Res*, 18, 1073-81.
- GUILAK, F., RATCLIFFE, A., LANE, N., ROSENWASSER, M. P. & MOW, V. C. 1994. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res*, 12, 474-84.
- GUILLLOT, P. V., ABASS, O., BASSETT, J. H., SHEFELBINE, S. J., BOU-GHARIOS, G., CHAN, J., KURATA, H., WILLIAMS, G. R., POLAK, J. & FISK, N. M. 2008. Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. *Blood*, 111, 1717-25.
- GUO, X., WANG, C., ZHANG, Y., XIA, R., HU, M., DUAN, C., ZHAO, Q., DONG, L., LU, J. & QING SONG, Y. 2004. Repair of large articular cartilage defects with implants of autologous mesenchymal stem cells seeded into beta-tricalcium phosphate in a sheep model. *Tissue Eng*, 10, 1818-29.
- HAGHIGHAT, A., AKHAVAN, A., HASHEMI-BENI, B., DEIHIMI, P., YADEGARI, A. & HEIDARI, F. 2011. Adipose derived stem cells for treatment of mandibular bone defects: An autologous study in dogs. *Dent Res J (Isfahan)*, 8, S51-7.
- HANG, D., WANG, Q., GUO, C., CHEN, Z. & YAN, Z. 2012. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with VEGF165 transgenic bone marrow mesenchymal stem cells in mongrel dogs. *Cells Tissues Organs*, 195, 495-506.

- HANGODY, L. & FULES, P. 2003. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 2, 25-32.
- HANNA, J., WERNIG, M., MARKOULAKI, S., SUN, C. W., MEISSNER, A., CASSADY, J. P., BEARD, C., BRAMBRINK, T., WU, L. C., TOWNES, T. M. & JAENISCH, R. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 318, 1920-3.
- HANNA, J. H., SAHA, K. & JAENISCH, R. 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, 143, 508-25.
- HANSEN, R. A., HARRIS, M. A., PLUHAR, G. E., MOTTA, T., BREVARD, S., OGILVIE, G. K., FETTMAN, M. J. & ALLEN, K. G. 2008. Fish oil decreases matrix metalloproteinases in knee synovia of dogs with inflammatory joint disease. *J Nutr Biochem*, 19, 101-8.
- HAQ, I., MURPHY, E. & DACRE, J. 2003. Osteoarthritis. *Postgrad Med J*, 79, 377-83.
- HARE, J. M. & CHAPARRO, S. V. 2008. Cardiac regeneration and stem cell therapy. *Curr Opin Organ Transplant*, 13, 536-42.
- HARE, J. M., TRAVERSE, J. H., HENRY, T. D., DIB, N., STRUMPF, R. K., SCHULMAN, S. P., GERSTENBLITH, G., DEMARIA, A. N., DENKTAS, A. E., GAMMON, R. S., HERMILLER, J. B., JR., REISMAN, M. A., SCHAER, G. L. & SHERMAN, W. 2009. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 54, 2277-86.
- HARTWIG, J. & ITALIANO, J., JR. 2003. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost*, 1, 1580-6.
- HASEEB, A. & HAQQI, T. M. 2013. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Immunol*, 146, 185-96.
- HATSUSHIKA, D., MUNETA, T., NAKAMURA, T., HORIE, M., KOGA, H., NAKAGAWA, Y., TSUJI, K., HISHIKAWA, S., KOBAYASHI, E. & SEKIYA, I. 2014. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis Cartilage*.
- HAUGEN, I. K., LILLEGRAVEN, S., SLATKOWSKY-CHRISTENSEN, B., HAAVARDSHOLM, E. A., SESSENG, S., KVIENT, T. K., VAN DER HEIJDE, D. & BOYESEN, P. 2011. Hand osteoarthritis and MRI: development and first validation step of the proposed Oslo Hand Osteoarthritis MRI score. *Ann Rheum Dis*, 70, 1033-8.
- HAUSCHILD, G., MERTEN, H. A., BADER, A., UHR, G., DEIVICK, A., MEYELINDENBERG, A. & FEHR, M. 2005. Bioartificial bone grafting: Tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of beta-tricalciumphosphate and platelet rich plasma--a case report. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 18, 52-4.
- HAYASHI, K., KIM, S. Y., LANSLOWNE, J. L., KAPATKIN, A. & DEJARDIN, L. M. 2009. Evaluation of a collagenase generated osteoarthritis biomarker in naturally occurring canine cruciate disease. *Vet Surg*, 38, 117-21.
- HEGEDUS, B., VIHAROS, L., GERVAIN, M. & GALFI, M. 2009. The effect of low-level laser in knee osteoarthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Photomed Laser Surg*, 27, 577-84.
- HEGEMANN, N., KOHN, B., BRUNNBERG, L. & SCHMIDT, M. F. 2002. Biomarkers of joint tissue metabolism in canine osteoarthritic and arthritic joint disorders. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 714-21.
- HENROTIN, Y., ADDISON, S., KRAUS, V. & DEBERG, M. 2007. Type II collagen markers in osteoarthritis: what do they indicate? *Curr Opin Rheumatol*, 19, 444-50.
- HENROTIN, Y., CHEVALIER, X., DEBERG, M., BALBLANC, J. C., RICLETTE, P., MULLEMAN, D., MAILLET, B., RANNOU, F., PIROTH, C., MATHIEU, P. & CONROZIER, T. 2013. Early decrease of serum biomarkers of type II collagen degradation (Coll2-1) and joint inflammation (Coll2-1 NO(2)) by hyaluronic acid intra-articular injections in patients with knee osteoarthritis: a research study part of the Biovisco study. *J Orthop Res*, 31, 901-7.
- HENROTIN, Y., LAMBERT, C., COUCHOUREL, D., RIPOLL, C. & CHIOTELLI, E. 2011. Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products. *Osteoarthritis Cartilage*, 19, 1-21.
- HENROTIN, Y., MARTEL-PELLETIER, J., MSIKA, P., GUILLOU, G. B. & DEBERG, M. 2012. Usefulness of specific OA biomarkers, Coll2-1 and Coll2-1NO2, in the anterior cruciate ligament OA canine model. *Osteoarthritis Cartilage*, 20, 787-90.
- HERMIDA, T. 2010. *Estudio descriptivo de las células madre mesenquimales en la articulación artrósica y su aplicación en terapia celular para reparar cartilago articular humano*. Universidade da Coruña.
- HERNIGOU, P., POIGNARD, A., ZILBER, S. & ROUARD, H. 2009. Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian J Orthop*, 43, 40-5.
- HESS, D. C. & BORLONGAN, C. V. 2008. Cell-based therapy in ischemic stroke. *Expert Rev Neurother*, 8, 1193-201.
- HILL, P. A., REYNOLDS, J. J. & MEIKLE, M. C. 1995. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology*, 136, 124-31.
- HIRAKI, Y., INOUE, H., KATO, Y., FUKUYA, M. & SUZUKI, F. 1987. Combined effects of somatomedin-like growth factors with fibroblast growth factor or epidermal growth factor in DNA synthesis in rabbit chondrocytes. *Mol Cell Biochem*, 76, 185-93.
- HOFFMAN, L. M. & CARPENTER, M. K. 2005. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 23, 699-708.

- HOM, D. B., LINZIE, B. M. & HUANG, T. C. 2007. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. *Arch Facial Plast Surg*, 9, 174-83.
- HONSAWEK, S., YUKTANANDANA, P., TANAVALLEE, A., CHIRATHAWORN, C., ANOMASIRI, W., UDOMSINPRASERT, W., SAETAN, N., SUANTAWEE, T. & TANTAVISUT, S. 2012. Plasma and synovial fluid connective tissue growth factor levels are correlated with disease severity in patients with knee osteoarthritis. *Biomarkers*, 17, 303-8.
- HOOGDUIJN, M. J., ROEMELING-VAN RHIJN, M., ENGELA, A. U., KOREVAAR, S. S., MENSAH, F. K., FRANQUESA, M., DE BRUIN, R. W., BETJES, M. G., WEIMAR, W. & BAAN, C. C. 2013. Mesenchymal stem cells induce an inflammatory response after intravenous infusion. *Stem Cells Dev*, 22, 2825-35.
- HORI, Y., GU, X., XIE, X. & KIM, S. K. 2005. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. *PLoS Med*, 2, e103.
- HORWITZ, E. M., PROCKOP, D. J., FITZPATRICK, L. A., KOO, W. W., GORDON, P. L., NEEL, M., SUSSMAN, M., ORCHARD, P., MARX, J. C., PYERITZ, R. E. & BRENNER, M. K. 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, 5, 309-13.
- HORWITZ, E. M., PROCKOP, D. J., GORDON, P. L., KOO, W. W., FITZPATRICK, L. A., NEEL, M. D., MCCARVILLE, M. E., ORCHARD, P. J., PYERITZ, R. E. & BRENNER, M. K. 2001. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*, 97, 1227-31.
- HOSOGANE, N., WATANABE, K., TSUJI, T., MIYAMOTO, T., ISHII, K., NIKI, Y., NAKAMURA, M., TOYAMA, Y., CHIBA, K. & MATSUMOTO, M. 2012. Serum cartilage metabolites as biomarkers of degenerative lumbar scoliosis. *J Orthop Res*, 30, 1249-53.
- HOWES, R., BOWNESS, J. M., GROTENDORST, G. R., MARTIN, G. R. & REDDI, A. H. 1988. Platelet-derived growth factor enhances demineralized bone matrix-induced cartilage and bone formation. *Calcif Tissue Int*, 42, 34-8.
- HSIAO, F. S., CHENG, C. C., PENG, S. Y., HUANG, H. Y., LIAN, W. S., JAN, M. L., FANG, Y. T., CHENG, E. C., LEE, K. H., CHENG, W. T., LIN, S. P. & WU, S. C. 2010. Isolation of therapeutically functional mouse bone marrow mesenchymal stem cells within 3 h by an effective single-step plastic-adherent method. *Cell Prolif*, 43, 235-48.
- [HTTP://BTI-BIOTECHNOLOGYINSTITUTE.COM](http://BTI-BIOTECHNOLOGYINSTITUTE.COM) 2014.
- [HTTP://SECURE.CDN.ARTHREX.COM](http://SECURE.CDN.ARTHREX.COM) 2012.
- [HTTP://WWW.HARVESTTECH.COM/HARVEST-PRP](http://WWW.HARVESTTECH.COM/HARVEST-PRP). 2012.
- [HTTP://WWW.SECQUIRE.COM/INDEX4.HTM](http://WWW.SECQUIRE.COM/INDEX4.HTM). 2013.
- HU, Y., GUO, Q., JIAO, C., MEI, Y., JIANG, D., WANG, J. & ZHENG, Z. 2013. Treatment of large cystic medial osteochondral lesions of the talus with autologous osteoperiosteal cylinder grafts. *Arthroscopy*, 29, 1372-9.
- HUANG, K., ZHANG, C., ZHANG, X. W., BAO, J. P. & WU, L. D. 2011. Effect of dehydroepiandrosterone on aggrecanase expression in articular cartilage in a rabbit model of osteoarthritis. *Mol Biol Rep*, 38, 3569-72.
- HUANG, P., LI, S., HAN, M., XIAO, Z., YANG, R. & HAN, Z. C. 2005. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care*, 28, 2155-60.
- HUANG, S. J., FU, R. H., SHYU, W. C., LIU, S. P., JONG, G. P., CHIU, Y. W., WU, H. S., TSOU, Y. A., CHENG, C. W. & LIN, S. Z. 2013. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant*, 22, 701-9.
- HUDSON, J. T., SLATER, M. R., TAYLOR, L., SCOTT, H. M. & KERWIN, S. C. 2004. Assessing repeatability and validity of a visual analogue scale questionnaire for use in assessing pain and lameness in dogs. *Am J Vet Res*, 65, 1634-43.
- HUEBNER, J. L. & KRAUS, V. B. 2006. Assessment of the utility of biomarkers of osteoarthritis in the guinea pig. *Osteoarthritis Cartilage*, 14, 923-30.
- HUEY, D. J., HU, J. C. & ATHANASIOU, K. A. 2012. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science*, 338, 917-21.
- HUGHES, S. E. 1997. Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J Histochem Cytochem*, 45, 1005-19.
- HUI, J. H., CHEN, F., THAMBYAH, A. & LEE, E. H. 2004. Treatment of chondral lesions in advanced osteochondritis dissecans: a comparative study of the efficacy of chondrocytes, mesenchymal stem cells, periosteal graft, and mosaicplasty (osteochondral autograft) in animal models. *J Pediatr Orthop*, 24, 427-33.
- HULTEN, C., GRONLUND, U., HIRVONEN, J., TULAMO, R. M., SUOMINEN, M. M., MARHAUG, G. & FORSBERG, M. 2002. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Vet J*, 34, 699-704.
- HULTH, A., JOHNNELL, O., MIYAZONO, K., LINDBERG, L., HEINEGARD, D. & HELDIN, C. H. 1996. Effect of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB on articular cartilage in rats. *J Orthop Res*, 14, 547-53.
- HUNTER, D. J. 2011. Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 25, 801-14.

- HUNTER, D. J., ARDEN, N., CONAGHAN, P. G., ECKSTEIN, F., GOLD, G., GRAINGER, A., GUERMAZI, A., HARVEY, W., JONES, G., HELLIO LE GRAVERAND, M. P., LAREDO, J. D., LO, G., LOSINA, E., MOSHER, T. J., ROEMER, F. & ZHANG, W. 2011a. Definition of osteoarthritis on MRI: results of a Delphi exercise. *Osteoarthritis Cartilage*, 19, 963-9.
- HUNTER, D. J. & FELSON, D. T. 2006. Osteoarthritis. *BMJ*, 332, 639-42.
- HUNTER, D. J., GUERMAZI, A., LO, G. H., GRAINGER, A. J., CONAGHAN, P. G., BOUDREAU, R. M. & ROEMER, F. W. 2011b. Evolution of semi-quantitative whole joint assessment of knee OA: MOAKS (MRI Osteoarthritis Knee Score). *Osteoarthritis Cartilage*, 19, 990-1002.
- HURTER, K., SPRENG, D., RYTZ, U., SCHAWALDER, P., OTT-KNUSEL, F. & SCHMOKEL, H. 2005. Measurements of C-reactive protein in serum and lactate dehydrogenase in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Vet J*, 169, 281-5.
- IAGNOCCO, A., MEENAGH, G., RIENTE, L., FILIPPUCCI, E., DELLE SEDIE, A., SCIRE, C. A., CECCARELLI, F., MONTECUCCO, C., GRASSI, W., BOMBARDIERI, S. & VALESINI, G. 2010. Ultrasound imaging for the rheumatologist XXIX. Sonographic assessment of the knee in patients with osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 28, 643-6.
- IMPELLIZERI, J. A., TETRICK, M. A. & MUIR, P. 2000. Effect of weight reduction on clinical signs of lameness in dogs with hip osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc*, 216, 1089-91.
- INOUE, R., ISHIBASHI, Y., TSUDA, E., YAMAMOTO, Y., MATSUZAKA, M., TAKAHASHI, I., DANJO, K., UMEDA, T., NAKAJI, S. & TOH, S. 2011. Knee osteoarthritis, knee joint pain and aging in relation to increasing serum hyaluronan level in the Japanese population. *Osteoarthritis Cartilage*, 19, 51-7.
- INSAUSTI, C. L., BLANQUER, M., BLEDA, P., INIESTA, P., MAJADO, M. J., CASTELLANOS, G. & MORALEDA, J. M. 2010. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol*, 25, 91-8.
- ISHIJIMA, M., KUROSAWA, H., KANEKO, H. & KANEKO, K. 2011a. Biomarkers in osteoarthritis. In: BAGCHI, D., MORIYAMA, H. & RAYCHAUDHURI, S. (eds.) *In Arthritis: Pathophysiology, Prevention, and Therapeutics*. Taylor & Francis Group.
- ISHIJIMA, M., WATARI, T., NAITO, K., KANEKO, H., FUTAMI, I., YOSHIMURA-ISHIDA, K., TOMONAGA, A., YAMAGUCHI, H., YAMAMOTO, T., NAGAOKA, I., KUROSAWA, H., POOLE, R. A. & KANEKO, K. 2011b. Relationships between biomarkers of cartilage, bone, synovial metabolism and knee pain provide insights into the origins of pain in early knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 13, R22.
- IVKOVIC, S., YOON, B. S., POPOFF, S. N., SAFADI, F. F., LIBUDA, D. E., STEPHENSON, R. C., DALUISKI, A. & LYONS, K. M. 2003. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development*, 130, 2779-91.
- IZADPANAH, R., TRYGG, C., PATEL, B., KRIEDT, C., DUFOUR, J., GIMBLE, J. M. & BUNNELL, B. A. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*, 99, 1285-97.
- JACKSON, W. M., LOZITO, T. P., DJOUAD, F., KUHN, N. Z., NESTI, L. J. & TUAN, R. S. 2011. Differentiation and regeneration potential of mesenchymal progenitor cells derived from traumatized muscle tissue. *J Cell Mol Med*, 15, 2377-88.
- JACOBSEN, S., JENSEN, J. C., FREI, S., JENSEN, A. L. & THOEFNER, M. B. 2005. Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine Vet J*, 37, 552-6.
- JAMES, C. B. & UHL, T. L. 2001. A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate. *J Athl Train*, 36, 413-9.
- JEROME, C., MISSBACH, M. & GAMSE, R. 2011. Balicatib, a cathepsin K inhibitor, stimulates periosteal bone formation in monkeys. *Osteoporos Int*, 22, 3001-11.
- JIANG, S., HAIDER, H., IDRIS, N. M., SALIM, A. & ASHRAF, M. 2006. Supportive interaction between cell survival signaling and angiocompetent factors enhances donor cell survival and promotes angiomyogenesis for cardiac repair. *Circ Res*, 99, 776-84.
- JO, C. H., AHN, H. J., KIM, H. J., SEONG, S. C. & LEE, M. C. 2007. Surface characterization and chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells derived from synovium. *Cytotherapy*, 9, 316-27.
- 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., RA, J. C., OH, S. & YOON, K. S. 2014. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: A proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells*.
- JOBLING, A. I., NGUYEN, M., GENTLE, A. & MCBRIEN, N. A. 2004. Isoform-specific changes in scleral transforming growth factor-beta expression and the regulation of collagen synthesis during myopia progression. *J Biol Chem*, 279, 18121-6.
- JOHNSON, K., JUNG, A., MURPHY, A., ANDREYEV, A., DYKENS, J. & TERKELTAUB, R. 2000. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum*, 43, 1560-70.
- JOHNSON, L. L. & PITTSLEY, A. 2006. Arthroscopic Abrasion Arthroplasty a review. *Basic Science, Clinical Repair and Reconstruction of Articular Cartilage Defects: Current Status and Prospects*. First Edition ed. Bologna, Italy: Timeo Editore- Bologna.

- JOHNSTON, S. A., MCLAUGHLIN, R. M. & BUDSBERG, S. C. 2008. Nonsurgical management of osteoarthritis in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 38, 1449-70, viii.
- JONES, B. A. & PEI, M. 2012. Synovium-derived stem cells: a tissue-specific stem cell for cartilage engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 18, 301-11.
- JONES, E. A., CRAWFORD, A., ENGLISH, A., HENSHAW, K., MUNDY, J., CORSCADDEN, D., CHAPMAN, T., EMERY, P., HATTON, P. & MCGONAGLE, D. 2008. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis Rheum*, 58, 1731-40.
- JORGENSEN, C. 2013. Mesenchymal stem cells: uses in osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 80, 565-7.
- JU, Y. J., MUNETA, T., YOSHIMURA, H., KOGA, H. & SEKIYA, I. 2008. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. *Cell Tissue Res*, 332, 469-78.
- JUE, D. M., SHIM, B. S. & KANG, Y. S. 1983. Inhibition of prostaglandin synthase activity of sheep seminal vesicular gland by human serum haptoglobin. *Mol Cell Biochem*, 51, 141-7.
- JUNI, P., REICHENBACH, S. & DIEPPE, P. 2006. Osteoarthritis: rational approach to treating the individual. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20, 721-40.
- KANEKO, H., ISHIJIMA, M., DOI, T., FUTAMI, I., LIU, L., SADATSUKI, R., YUSUP, A., HADA, S., KUBOTA, M., KAWASAKI, T., SAITA, Y., TAKAZAWA, Y., IKEDA, H., KUROSAWA, H. & KANEKO, K. 2013. Reference intervals of serum hyaluronic acid corresponding to the radiographic severity of knee osteoarthritis in women. *BMC Musculoskelet Disord*, 14, 34.
- KANG, B. J., RYU, H. H., PARK, S. S., KOYAMA, Y., KIKUCHI, M., WOO, H. M., KIM, W. H. & KWEON, O. K. 2012. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci*, 13, 299-310.
- KANG, E. H., LEE, Y. J., KIM, T. K., CHANG, C. B., CHUNG, J. H., SHIN, K., LEE, E. Y., LEE, E. B. & SONG, Y. W. 2010. Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Res Ther*, 12, R231.
- KANG, M. H. & PARK, H. M. 2014. Evaluation of adverse reactions in dogs following intravenous mesenchymal stem cell transplantation. *Acta Vet Scand*, 56, 16.
- KAPOOR, M., MARTEL-PELLETIER, J., LAJEUNESSE, D., PELLETIER, J. P. & FAHMI, H. 2011. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 7, 33-42.
- KASEMKIJWATTANA, C., MENETREY, J., BOSCH, P., SOMOGYI, G., MORELAND, M. S., FU, F. H., BURANAPANITKIT, B., WATKINS, S. S. & HUARD, J. 2000. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin Orthop Relat Res*, 272-85.
- KASSOLIS, J. D., ROSEN, P. S. & REYNOLDS, M. A. 2000. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol*, 71, 1654-61.
- KASTEN, P., VOGEL, J., BEYEN, I., WEISS, S., NIEMEYER, P., LEO, A. & LUGINBUHL, R. 2008a. Effect of platelet-rich plasma on the in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference. *J Biomater Appl*, 23, 169-88.
- KASTEN, P., VOGEL, J., GEIGER, F., NIEMEYER, P., LUGINBUHL, R. & SZALAY, K. 2008b. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials*, 29, 3983-92.
- KATOH, N. & NAKAGAWA, H. 1999. Detection of haptoglobin in the high-density lipoprotein and the very high-density lipoprotein fractions from sera of calves with experimental pneumonia and cows with naturally occurring fatty liver. *J Vet Med Sci*, 61, 119-24.
- KATRITSIS, D. G., SOTIROPOULOU, P. A., KARVOUNI, E., KARABINOS, I., KOROVELIS, S., PEREZ, S. A., VORIDIS, E. M. & PAPAMICHAIL, M. 2005. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv*, 65, 321-9.
- KATZ, J. N., BROWNLEE, S. A. & JONES, M. H. 2014. The role of arthroscopy in the management of knee osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 28, 143-156.
- KAUX, J. F., DRION, P. V., COLIGE, A., PASCON, F., LIBERTIAUX, V., HOFFMANN, A., JANSSEN, L., HEYERS, A., NUSGENS, B. V., LE GOFF, C., GOTHOT, A., CESCOTTO, S., DEFRAIGNE, J. O., RICKERT, M. & CRIELAARD, J. M. 2012. Effects of platelet-rich plasma (PRP) on the healing of Achilles tendons of rats. *Wound Repair Regen*, 20, 748-56.
- KAWAMURA, M. & URIST, M. R. 1988. Growth factors, mitogens, cytokines, and bone morphogenetic protein in induced chondrogenesis in tissue culture. *Dev Biol*, 130, 435-42.
- KAWASE, T., OKUDA, K., SAITO, Y. & YOSHIE, H. 2005. In vitro evidence that the biological effects of platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor-beta or platelet-derived growth factor. *J Periodontol*, 76, 760-7.
- KAYAKABE, M., TSUTSUMI, S., WATANABE, H., KATO, Y. & TAKAGISHI, K. 2006. Transplantation of autologous rabbit BM-derived mesenchymal stromal cells embedded in hyaluronic acid gel sponge into osteochondral defects of the knee. *Cytotherapy*, 8, 343-53.
- KAZEMI, D., FAKHRIJOU, A., DIZAJI, V. M. & ALISHAHI, M. K. 2014. Effect of autologous platelet rich fibrin on the healing of experimental articular cartilage defects of the knee in an animal model. *Biomed Res Int*, 2014, 486436.

- KENT, J. E. & GOODALL, J. 1991. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. *Equine Vet J*, 23, 59-66.
- KERN, S., EICHLER, H., STOEVE, J., KLUTER, H. & BIEBACK, K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24, 1294-301.
- KEVY, S. V. & JACOBSON, M. S. 2004. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol*, 36, 28-35.
- KIESWETTER, K., SCHWARTZ, Z., ALDERETE, M., DEAN, D. D. & BOYAN, B. D. 1997. Platelet derived growth factor stimulates chondrocyte proliferation but prevents endochondral maturation. *Endocrine*, 6, 257-64.
- KIM, J. Y., JEON, H. B., YANG, Y. S., OH, W. & CHANG, J. W. 2010. Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models. *World J Stem Cells*, 2, 34-8.
- KIM, S. G., KIM, W. K., PARK, J. C. & KIM, H. J. 2002. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*, 60, 1018-25.
- KJELGAARD-HANSEN, M., JENSEN, A. L. & KRISTENSEN, A. T. 2003. Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet Clin Pathol*, 32, 81-7.
- KLIMIUK, P. A., SIERAKOWSKI, S., LATOSIEWICZ, R., CYLWIK, B., SKOWRONSKI, J. & CHWIECKO, J. 2002. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in different histological variants of rheumatoid synovitis. *Rheumatology (Oxford)*, 41, 78-87.
- KLINGER, M. H. 1997. Platelets and inflammation. *Anat Embryol (Berl)*, 196, 1-11.
- KNUDSON, W. 1998. The role of CD44 as a cell surface hyaluronan receptor during tumor invasion of connective tissue. *Front Biosci*, 3, d604-15.
- KOBAYASHI, M., SQUIRES, G. R., MOUSA, A., TANZER, M., ZUKOR, D. J., ANTONIOU, J., FEIGE, U. & POOLE, A. R. 2005. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 52, 128-35.
- KOBLAS, T., HARMAN, S. M. & SAUDEK, F. 2005. The application of umbilical cord blood cells in the treatment of diabetes mellitus. *Rev Diabet Stud*, 2, 228-34.
- KOGA, H., SHIMAYA, M., MUNETA, T., NIMURA, A., MORITO, T., HAYASHI, M., SUZUKI, S., JU, Y. J., MOCHIZUKI, T. & SEKIYA, I. 2008. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther*, 10, R84.
- KOH, S. H., KIM, K. S., CHOI, M. R., JUNG, K. H., PARK, K. S., CHAI, Y. G., ROH, W., HWANG, S. J., KO, H. J., HUH, Y. M., KIM, H. T. & KIM, S. H. 2008. Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. *Brain Res*, 1229, 233-48.
- KOH, Y. G. & CHOI, Y. J. 2012. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *Knee*, 19, 902-7.
- KOH, Y. G., JO, S. B., KWON, O. R., SUH, D. S., LEE, S. W., PARK, S. H. & CHOI, Y. J. 2013. Mesenchymal stem cell injections improve symptoms of knee osteoarthritis. *Arthroscopy*, 29, 748-55.
- KOH, Y. G., KWON, O. R., KIM, Y. S. & CHOI, Y. J. 2014. 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*.
- KOLIOS, G. & MOODLEY, Y. 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85, 3-10.
- KON, E., BUDA, R., FILARDO, G., DI MARTINO, A., TIMONCINI, A., CENACCHI, A., FORNASARI, P. M., GIANNINI, S. & MARCACCI, M. 2010. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18, 472-9.
- KON, E., FILARDO, G., DELCOGLIANO, M., PRESTI, M. L., RUSSO, A., BONDI, A., DI MARTINO, A., CENACCHI, A., FORNASARI, P. M. & MARCACCI, M. 2009. Platelet-rich plasma: new clinical application: a pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury*, 40, 598-603.
- KON, E., FILARDO, G., DI MARTINO, A. & MARCACCI, M. 2011. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 19, 516-27.
- KON, E., FILARDO, G., MATTEO, B. D. & MARCACCI, M. 2013. PRP For the Treatment of Cartilage Pathology. *Open Orthop J*, 7, 120-8.
- KÖNIG, H. & LIEBICH, H. 2008. Introducción. In: KÖNIG, H. & LIEBICH, H. (eds.) *Anatomía de los animales domésticos. Aparato locomotor*. 2ª ed. Montevideo, Uruguay: Editorial médica panamericana.
- KORBLING, M., DE LIMA, M. J., THOMAS, E., KHANNA, A., NAJJAR, A. M., GU, J., GELOVANI, J. G. & BROADDUS, R. 2008. Fusion of circulating blood cells with solid-organ tissue cells in clinical stem cell transplants: a potential therapeutic model? *Regen Med*, 3, 157-64.
- KORBLING, M. & ESTROV, Z. 2003. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*, 349, 570-82.
- KOTLARZ, H., GUNNARSSON, C. L., FANG, H. & RIZZO, J. A. 2009. Insurer and out-of-pocket costs of osteoarthritis in the US: evidence from national survey data. *Arthritis Rheum*, 60, 3546-53.
- KOVACS, K., VELICH, N., HUSZAR, T., FENYVES, B., SUBA, Z. & SZABO, G. 2005. Histomorphometric and densitometric evaluation of the effects of platelet-rich plasma on the remodeling of beta-tricalcium phosphate in beagle dogs. *J Craniofac Surg*, 16, 150-4.

- KRAUSE, D. S., FACKLER, M. J., CIVIN, C. I. & MAY, W. S. 1996. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87, 1-13.
- KRAUSE, D. S., THEISE, N. D., COLLECTOR, M. I., HENEGARIU, O., HWANG, S., GARDNER, R., NEUTZEL, S. & SHARKIS, S. J. 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105, 369-77.
- KUDO, J. 1982. [Effects of acute phase reactive proteins on lymphocyte functions]. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 73, 571-84.
- KUKANICH, B. & PAPICH, M. G. 2004. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyltramadol in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 27, 239-46.
- KUMAR, S., CONNOR, J. R., DODDS, R. A., HALSEY, W., VAN HORN, M., MAO, J., SATHE, G., MUI, P., AGARWAL, P., BADGER, A. M., LEE, J. C., GOWEN, M. & LARK, M. W. 2001. Identification and initial characterization of 5000 expressed sequenced tags (ESTs) each from adult human normal and osteoarthritic cartilage cDNA libraries. *Osteoarthritis Cartilage*, 9, 641-53.
- KUO, T. K., HO, J. H. & LEE, O. K. 2009. Mesenchymal stem cell therapy for nonmusculoskeletal diseases: emerging applications. *Cell Transplant*, 18, 1013-28.
- KURODA, R., ISHIDA, K., MATSUMOTO, T., AKISUE, T., FUJIOKA, H., MIZUNO, K., OHGUSHI, H., WAKITANI, S. & KUROSAKA, M. 2007. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage*, 15, 226-31.
- KURODA, R., USAS, A., KUBO, S., CORSI, K., PENG, H., ROSE, T., CUMMINS, J., FU, F. H. & HUARD, J. 2006. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum*, 54, 433-42.
- KURTZ, S., ONG, K., LAU, E., MOWAT, F. & HALPERN, M. 2007. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am*, 89, 780-5.
- KUSHNER, I., GEWURZ, H. & BENSON, M. D. 1981. C-reactive protein and the acute-phase response. *J Lab Clin Med*, 97, 739-49.
- KWON, D. R., PARK, G. Y. & LEE, S. U. 2012. The effects of intra-articular platelet-rich plasma injection according to the severity of collagenase-induced knee osteoarthritis in a rabbit model. *Ann Rehabil Med*, 36, 458-65.
- LAM, Q. L. & LU, L. 2007. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol*, 4, 1-13.
- LANDESBERG, R., MOSES, M. & KARPATKIN, M. 1998. Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg*, 56, 1116-7.
- LANDESBERG, R., ROY, M. & GLICKMAN, R. S. 2000. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg*, 58, 297-300; discussion 300-1.
- LANE, N. E., BRANDT, K., HAWKER, G., PEEVA, E., SCHREYER, E., TSUJI, W. & HOCHBERG, M. C. 2011. OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 19, 478-82.
- LANE, N. E. & NEVITT, M. C. 2002. Osteoarthritis, bone mass, and fractures: how are they related? *Arthritis Rheum*, 46, 1-4.
- LANGE, C., CAKIROGLU, F., SPIESS, A. N., CAPPALLO-OBERMANN, H., DIERLAMM, J. & ZANDER, A. R. 2007. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 213, 18-26.
- LANSDOWN, A. B. 2002. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair Regen*, 10, 271-85.
- LASCELLES, B. D., GAYNOR, J. S., SMITH, E. S., ROE, S. C., MARCELLIN-LITTLE, D. J., DAVIDSON, G., BOLAND, E. & CARR, J. 2008. Amantadine in a multimodal analgesic regimen for alleviation of refractory osteoarthritis pain in dogs. *J Vet Intern Med*, 22, 53-9.
- LAU, L. F. & LAM, S. C. 1999. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res*, 248, 44-57.
- LAURENT, T. C., LAURENT, U. B. & FRASER, J. R. 1996. Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann Med*, 28, 241-53.
- LAVASANI, M., THOMPSON, S. D., POLLETT, J. B., USAS, A., LU, A., STOLZ, D. B., CLARK, K. A., SUN, B., PEULT, B. & HUARD, J. 2014. Human muscle-derived stem/progenitor cells promote functional murine peripheral nerve regeneration. *J Clin Invest*.
- LAWRENCE, D. A. 2001. Latent-TGF-beta: an overview. *Mol Cell Biochem*, 219, 163-70.
- LAWRENCE, R. C., FELSON, D. T., HELMICK, C. G., ARNOLD, L. M., CHOI, H., DEYO, R. A., GABRIEL, S., HIRSCH, R., HOCHBERG, M. C., HUNDER, G. G., JORDAN, J. M., KATZ, J. N., KREMERS, H. M. & WOLFE, F. 2008. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum*, 58, 26-35.
- LE BLANC, K. 2003. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 5, 485-9.
- LEARMONTH, I. D., YOUNG, C. & RORABECK, C. 2007. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*, 370, 1508-19.
- LECHNER, A. & HABENER, J. F. 2003. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284, E259-66.
- LEE, A. S., ELLMAN, M. B., YAN, D., KROIN, J. S., COLE, B. J., VAN WIJNEN, A. J. & IM, H. J. 2013. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*, 527, 440-7.

- LEE, H. J., LEE, J. K., LEE, H., SHIN, J. W., CARTER, J. E., SAKAMOTO, T., JIN, H. K. & BAE, J. S. 2010. The therapeutic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 481, 30-5.
- LEE, J. H., ORT, T., MA, K., PICHA, K., CARTON, J., MARSTERS, P. A., LOHMANDER, L. S., BARIBAUD, F., SONG, X. Y. & BLAKE, S. 2009. Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, 17, 613-20.
- LEE, J. Y., QU-PETERSEN, Z., CAO, B., KIMURA, S., JANKOWSKI, R., CUMMINS, J., USAS, A., GATES, C., ROBBINS, P., WERNIG, A. & HUARD, J. 2000. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol*, 150, 1085-100.
- LEE, K. B., HUI, J. H., SONG, I. C., ARDANY, L. & LEE, E. H. 2007. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. *Stem Cells*, 25, 2964-71.
- LEE, R. H., SEO, M. J., REGER, R. L., SPEES, J. L., PULIN, A. A., OLSON, S. D. & PROCKOP, D. J. 2006. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 17438-43.
- LEIPOLD, H. R., GOLDBERG, R. L. & LUST, G. 1989. Canine serum keratan sulfate and hyaluronate concentrations. Relationship to age and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 32, 312-21.
- LEITNER, G. C., GRUBER, R., NEUMULLER, J., WAGNER, A., KLOIMSTEIN, P., HOCKER, P., KORMOCZI, G. F. & BUCHTA, C. 2006. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang*, 91, 135-9.
- LEONG, D. J., HARDIN, J. A., COBELLI, N. J. & SUN, H. B. 2011a. Mechanotransduction and cartilage integrity. *Ann N Y Acad Sci*, 1240, 32-7.
- LEONG, D. J., LI, Y. H., GU, X. I., SUN, L., ZHOU, Z., NASSER, P., LAUDIER, D. M., IQBAL, J., MAJESKA, R. J., SCHAFFLER, M. B., GOLDRING, M. B., CARDOSO, L., ZAIDI, M. & SUN, H. B. 2011b. Physiological loading of joints prevents cartilage degradation through CITED2. *FASEB J*, 25, 182-91.
- LEVEN, R. M. 2000. Megakaryocytes. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G., JAIN, N. C. & AL, E. (eds.) *Schlam's veterinary haematology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- LEWIN, G. R. & BARDE, Y. A. 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 19, 289-317.
- LI, D. R. & CAI, J. H. 2012. Methods of isolation, expansion, differentiating induction and preservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl)*, 125, 4504-10.
- LI, X., AFIF, H., CHENG, S., MARTEL-PELLETIER, J., PELLETIER, J. P., RANGER, P. & FAHMI, H. 2005. Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol*, 32, 887-95.
- LI, X., ELLMAN, M., MUDDASANI, P., WANG, J. H., CS-SZABO, G., VAN WIJNEN, A. J. & IM, H. J. 2009. Prostaglandin E2 and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 60, 513-23.
- LI, Z. H., LIAO, W., CUI, X. L., ZHAO, Q., LIU, M., CHEN, Y. H., LIU, T. S., LIU, N. L., WANG, F., YI, Y. & SHAO, N. S. 2011. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int J Med Sci*, 8, 74-83.
- LI, Z. H., LIAO, W., ZHAO, Q., HUAN, T., FENG, P., WEI, X., YI, Y. & SHAO, N. S. 2014. Effect of Cbfa1 on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells under hypoxia condition. *Int J Clin Exp Med*, 7, 540-8.
- LIANXU, C., HONGTI, J. & CHANGLONG, Y. 2006. NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 14, 367-76.
- LIAO, C. D., ZHANG, F., GUO, R. M., ZHONG, X. M., ZHU, J., WEN, X. H. & SHEN, J. 2012. Peripheral nerve repair: monitoring by using gadofluorine M-enhanced MR imaging with chitosan nerve conduits with cultured mesenchymal stem cells in rat model of neurotmesis. *Radiology*, 262, 161-71.
- LIAO, W., ZHONG, J., YU, J., XIE, J., LIU, Y., DU, L., YANG, S., LIU, P., XU, J., WANG, J., HAN, Z. & HAN, Z. C. 2009. Therapeutic benefit of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rat: implications of anti-inflammation and angiogenesis. *Cell Physiol Biochem*, 24, 307-16.
- LICHTENFELS, M., COLOME, L., SEBBEN, A. D. & BRAGA-SILVA, J. 2013. Effect of Platelet Rich Plasma and Platelet Rich Fibrin on sciatic nerve regeneration in a rat model. *Microsurgery*, 33, 383-90.
- LIM, J. H., BYEON, Y. E., RYU, H. H., JEONG, Y. H., LEE, Y. W., KIM, W. H., KANG, K. S. & KWEON, O. K. 2007. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J Vet Sci*, 8, 275-82.
- LIND, M., SCHUMACKER, B., SOBALLE, K., KELLER, J., MELSEN, F. & BUNGER, C. 1993. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand*, 64, 553-6.
- LINDHORST, E., VAIL, T. P., GUILAK, F., WANG, H., SETTON, L. A., VILIM, V. & KRAUS, V. B. 2000. Longitudinal characterization of synovial fluid biomarkers in the canine meniscectomy model of osteoarthritis. *J Orthop Res*, 18, 269-80.
- LINGARAJ, K., POH, C. K. & WANG, W. 2010. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during articular cartilage growth and re-expressed in osteoarthritis. *Ann Acad Med Singapore*, 39, 399-403.
- LISIANYI, M. I. 2013. [Mesenchymal stem cells and their immunological properties]. *Fiziol Zh*, 59, 126-34.

- LIU, C., SHI, X. G., LIU, Y. J., WANG, Z. G. & WEI, M. 2013. [Analysis on arthroscopic debridement and visco supplement for the treatment of degenerative osteoarthropathy of ankle]. *Zhongguo Gu Shang*, 26, 115-8.
- LIU, X., SHEN, W., YANG, Y. & LIU, G. 2011. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells transfected with hepatocyte growth factor transplanted in rat kidney with unilateral ureteral obstruction. *J Pediatr Surg*, 46, 537-45.
- LIU, Y., MU, R., WANG, S., LONG, L., LIU, X., LI, R., SUN, J., GUO, J., ZHANG, X., GUO, J., YU, P., LI, C., LIU, X., HUANG, Z., WANG, D., LI, H., GU, Z., LIU, B. & LI, Z. 2010. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 12, R210.
- LIU, Y., SHU, X. Z. & PRESTWICH, G. D. 2006. Osteochondral defect repair with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an injectable, in situ, cross-linked synthetic extracellular matrix. *Tissue Eng*, 12, 3405-16.
- LJUNG, A., SKOOG, V., WIDENFALK, B., REN, Z., NISTER, M. & OHLSEN, L. 1995. Expression of platelet-derived growth factor beta receptor in chondrogenesis of perichondrial transplants. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 29, 289-95.
- LOHMANDER, L. S. 1991. Markers of cartilage metabolism in arthrosis. A review. *Acta Orthop Scand*, 62, 623-32.
- LOHMANDER, L. S. 2004. Markers of altered metabolism in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*, 70, 28-35.
- LOPA, S., COLOMBINI, A., SANSONE, V., PREIS, F. W. & MORETTI, M. 2013. Influence on chondrogenesis of human osteoarthritic chondrocytes in co-culture with donor-matched mesenchymal stem cells from infrapatellar fat pad and subcutaneous adipose tissue. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 26, 23-31.
- LOPA, S., COLOMBINI, A., STANCO, D., DE GIROLAMO, L., SANSONE, V. & MORETTI, M. 2014. Donor-matched mesenchymal stem cells from knee infrapatellar and subcutaneous adipose tissue of osteoarthritic donors display differential chondrogenic and osteogenic commitment. *Eur Cell Mater*, 27, 298-311.
- LÓPEZ, J., ISLAS, A. & MERINO, V. 1998. Efecto de estímulos inflamatorios locales y sistémicos en la proteína C-reactiva, fibrinógeno y leucograma de caninos. *Agro-Ciencia*, 14, 121-126.
- LOPEZ-ARMADA, M. J., CARAMES, B., LIRES-DEAN, M., CILLERO-PASTOR, B., RUIZ-ROMERO, C., GALDO, F. & BLANCO, F. J. 2006. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 14, 660-9.
- LOPEZ-ARMADA, M. J., VAAMONDE-GARCIA, C., CARAMES, B., LIRES-DEAN, M., CILLERO-PASTOR, B. & BLANCO GARCIA, F. J. 2007. [Evidence of inflammatory mechanisms in osteoarthritis]. *Reumatol Clin*, 3 Suppl 3, S23-7.
- LOSINA, E., WEINSTEIN, A. M., REICHMANN, W. M., BURBINE, S. A., SOLOMON, D. H., DAIGLE, M. E., ROME, B. N., CHEN, S. P., HUNTER, D. J., SUTER, L. G., JORDAN, J. M. & KATZ, J. N. 2013. Lifetime risk and age at diagnosis of symptomatic knee osteoarthritis in the US. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 65, 703-11.
- LOTZ, M., MARTEL-PELLETIER, J., CHRISTIANSEN, C., BRANDI, M. L., BRUYERE, O., CHAPURLAT, R., COLLETTE, J., COOPER, C., GIACOVELLI, G., KANIS, J. A., KARSDAL, M. A., KRAUS, V., LEMS, W. F., MEULENBELT, I., PELLETIER, J. P., RAYNAULD, J. P., REITER-NIESERT, S., RIZZOLI, R., SANDELL, L. J., VAN SPIL, W. E. & REGINSTER, J. Y. 2013. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Ann Rheum Dis*, 72, 1756-63.
- LOWERY, G. L., KULKARNI, S. & PENNISI, A. E. 1999. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone*, 25, 47S-50S.
- LU, T. W., WEI, I. P., LIU, Y. H., HSU, W. C., WANG, T. M., CHANG, C. F. & LIN, J. G. 2010. Immediate effects of acupuncture on gait patterns in patients with knee osteoarthritis. *Chin Med J (Engl)*, 123, 165-72.
- LU, Y., MARKEL, M. D., SWAIN, C. & KAPLAN, L. D. 2006. Development of partial thickness articular cartilage injury in an ovine model. *J Orthop Res*, 24, 1974-82.
- LUBKOWSKA, A., DOLEGOWSKA, B. & BANFI, G. 2012. Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. *J Biol Regul Homeost Agents*, 26, 3S-22S.
- LUMELSKY, N., BLONDEL, O., LAENG, P., VELASCO, I., RAVIN, R. & MCKAY, R. 2001. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*, 292, 1389-94.
- LUO, G., CHENG, W., HE, W., WANG, X., TAN, J., FITZGERALD, M., LI, X. & WU, J. 2010. Promotion of cutaneous wound healing by local application of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Wound Repair Regen*, 18, 506-13.
- MA, D. & MAO, T. 2012. [Cell-based approaches to promote bone regeneration in distraction osteogenesis]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 26, 1512-5.
- MACFARLANE, R. J., GRAHAM, S. M., DAVIES, P. S., KORRES, N., TSOUCHNICA, H., HELIOTIS, M., MANTALARIS, A. & TSIRIDIS, E. 2013. Anti-inflammatory role and immunomodulation of mesenchymal stem cells in systemic joint diseases: potential for treatment. *Expert Opin Ther Targets*, 17, 243-54.
- MADEIRA, A., POMMET, J. M., PROCHIANTZ, A. & ALLINQUANT, B. 2005. SET protein (TAF1beta, I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain. *FASEB J*, 19, 1905-7.
- MADONNA, R., CEVIK, C., NASSER, M. & DE CATERINA, R. 2012. Hepatocyte growth factor: molecular biomarker and player in cardioprotection and cardiovascular regeneration. *Thromb Haemost*, 107, 656-61.

- MAJO, F., ROCHAT, A., NICOLAS, M., JAOUDE, G. A. & BARRANDON, Y. 2008. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, 456, 250-4.
- MAKIMURA, S. & SUZUKI, N. 1982. Quantitative determination of bovine serum Haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Nihon Juigaku Zasshi*, 44, 15-21.
- MALEK, S., SAMPLE, S. J., SCHWARTZ, Z., NEMKE, B., JACOBSON, P. B., COZZI, E. M., SCHAEFER, S. L., BLEEDORN, J. A., HOLZMAN, G. & MUIR, P. 2012. Effect of analgesic therapy on clinical outcome measures in a randomized controlled trial using client-owned dogs with hip osteoarthritis. *BMC Vet Res*, 8, 185.
- MALGIERI, A., KANTZARI, E., PATRIZI, M. P. & GAMBARDELLA, S. 2010. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med*, 3, 248-69.
- MAN, D., PLOSKER, H. & WINLAND-BROWN, J. E. 2001. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg*, 107, 229-37; discussion 238-9.
- MANFARDINI, C., MAUMUS, M., GABUSI, E., PIACENTINI, A., FILARDO, G., PEYRAFITTE, J. A., JORGENSEN, C., BOURIN, P., FLEURY-CAPPELLESSO, S., FACCHINI, A., NOEL, D. & LISIGNOLI, G. 2013. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis Rheum*, 65, 1271-81.
- MANICOURT, D. H., CORNU, O., LENZ, M. E., DRUETZ-VAN EGEREN, A. & THONAR, E. J. 1995. Rapid and sustained rise in the serum level of hyaluronan after anterior cruciate ligament transection in the dog knee joint. *J Rheumatol*, 22, 262-9.
- MANISCALCO, P., GAMBERA, D., LUNATI, A., VOX, G., FOSSOMBRONI, V., BERETTA, R. & CRAINZ, E. 2008. The "Cascade" membrane: a new PRP device for tendon ruptures. Description and case report on rotator cuff tendon. *Acta Biomed*, 79, 223-6.
- MANNAIONI, P. F., DI BELLO, M. G. & MASINI, E. 1997. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res*, 46, 4-18.
- MARICAR, N., CALLAGHAN, M. J., FELSON, D. T. & O'NEILL, T. W. 2013. Predictors of response to intra-articular steroid injections in knee osteoarthritis--a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*, 52, 1022-32.
- MARIEE, I. C., GRONE, A. & THEYSE, L. F. 2014. The role of osteonecrosis in canine coronoid dysplasia: Arthroscopic and histopathological findings. *Vet J*, 200, 382-6.
- MARLOVITS, S., MOUSAVI, M., GABLER, C., ERDOS, J. & VECSEI, V. 2004. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. *Eur Spine J*, 13 Suppl 1, S102-6.
- MARONE, M., DE RITIS, D., BONANNO, G., MOZZETTI, S., RUTELLA, S., SCAMBIA, G. & PIERELLI, L. 2002. Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. *Leuk Lymphoma*, 43, 493-501.
- MARTEL-PELLETIER, J., MINEAU, F., FAHMI, H., LAUFER, S., REBOUL, P., BOILEAU, C., LAVIGNE, M. & PELLETIER, J. P. 2004. Regulation of the expression of 5-lipoxygenase-activating protein/5-lipoxygenase and the synthesis of leukotriene B(4) in osteoarthritic chondrocytes: role of transforming growth factor beta and eicosanoids. *Arthritis Rheum*, 50, 3925-33.
- MARTEL-PELLETIER, J., WILDI, L. M. & PELLETIER, J. P. 2012. Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone*, 51, 297-311.
- MARTINELLO, T., BRONZINI, I., MACCATROZZO, L., MOLLO, A., SAMPALLES, M., MASCARELLO, F., DECAMINADA, M. & PATRUNO, M. 2011. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci*, 91, 18-24.
- MARTINEZ-SUBIELA, S., TECLES, F. & CERON, J. J. 2003. Critical differences of acute phase proteins in canine serum samples. *Vet J*, 166, 233-7.
- MARTÍNEZ-SUBIELA, S., TECLES, F. & PARRA, M. 2001. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. *Ann Vet. Murcia*, 97-114.
- MARTÍNEZ-ZAPATA, M., MARTÍ-CARVAJAL, A. & SOLÁ, I. 2009. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion*, 49, 144-156.
- MARTINI, L., FINI, M., GIAVARESI, G. & GIARDINO, R. 2001. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med*, 51, 292-9.
- MARX, R. E. 2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*, 10, 225-8.
- MARX, R. E. 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, 62, 489-96.
- MARX, R. E., CARLSON, E. R., EICHSTAEDT, R. M., SCHIMMELE, S. R., STRAUSS, J. E. & GEORGEFF, K. R. 1998. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85, 638-46.
- MAS GARRIGA, X. 2014. [Definition, etiology, classification and presentation forms]. *Aten Primaria*, 46 Suppl 1, 3-10.
- MASCARIN, N. C., VANCINI, R. L., ANDRADE, M. L., MAGALHAES EDE, P., DE LIRA, C. A. & COIMBRA, I. B. 2012. Effects of kinesiotherapy, ultrasound and electrotherapy in management of bilateral knee osteoarthritis: prospective clinical trial. *BMC Musculoskelet Disord*, 13, 182.
- MATSUSAKI, M., OCHI, M., UCHIO, Y., SHU, N., KURIOKA, H., KAWASAKI, K. & ADACHI, N. 1998. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation and phenotype expression of chondrocytes embedded in collagen gel. *Gen Pharmacol*, 31, 759-64.
- MATYAS, J. R., ATLEY, L., IONESCU, M., EYRE, D. R. & POOLE, A. R. 2004. Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 50, 543-52.

- MAUMUS, M., MANFERDINI, C., TOUPET, K., PEYRAFITTE, J. A., FERREIRA, R., FACCHINI, A., GABUSI, E., BOURIN, P., JORGENSEN, C., LISIGNOLI, G. & NOEL, D. 2013. Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Res*, 11, 834-44.
- MAY, S. 1994. *Degenerative joint disease (osteoarthritis), osteoarthrosis, secondary joint disease*, Manual of Small Animal Arthrology, British Small Animal Veterinary Association Bournemouth.
- MAYR, H. O., RUESENSCHMIDT, M., SEIL, R., DEJOUR, D., BERNSTEIN, A., SUEDKAMP, N. & STOEHR, A. 2013. Indications for and results of arthroscopy in the arthritic knee: a European survey. *Int Orthop*, 37, 1263-71.
- MAZZUCCO, L., BALBO, V., CATTANA, E. & BORZINI, P. 2008. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex. *Vox Sang*, 94, 202-8.
- MAZZUCCO, L., BALBO, V., CATTANA, E., GUASCHINO, R. & BORZINI, P. 2009. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. *Vox Sang*, 97, 110-8.
- MEHTA, S. & WATSON, J. T. 2008. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma*, 22, 432-8.
- MEI-DAN, O., CARMONT, M., KOTS, E., BARCHILON, V., NYSKA, M. & MANN, G. 2010. Early return to play following complete rupture of the medial collateral ligament of the elbow using preparation rich in growth factors: a case report. *J Shoulder Elbow Surg*, 19, e1-5.
- MELCHIORRI, C., MELICONI, R., FRIZZIERO, L., SILVESTRI, T., PULSATELLI, L., MAZZETTI, I., BORZI, R. M., UGUCCIONI, M. & FACCHINI, A. 1998. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 41, 2165-74.
- MENETREY, J., KASEMKIJWTANA, C., DAY, C. S., BOSCH, P., VOGT, M., FU, F. H., MORELAND, M. S. & HUARD, J. 2000. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br*, 82, 131-7.
- MERASHLY, M. & UTHMAN, I. 2012. Management of knee osteoarthritis: an evidence-based review of treatment options. *J Med Liban*, 60, 237-42.
- MIGNATTI, P. & RIFKIN, D. B. 1991. Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism? *J Cell Biochem*, 47, 201-7.
- MIKA, J., CLANTON, T. O., PRETZEL, D., SCHNEIDER, G., AMBROSE, C. G. & KINNE, R. W. 2011. Surgical preparation for articular cartilage regeneration without penetration of the subchondral bone plate: in vitro and in vivo studies in humans and sheep. *Am J Sports Med*, 39, 624-31.
- MIKI, T., LEHMANN, T., CAI, H., STOLZ, D. B. & STROM, S. C. 2005. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 23, 1549-59.
- MILANO, G., SANNA PASSINO, E., DERIU, L., CAREDDU, G., MANUNTA, L., MANUNTA, A., SACCOMANNO, M. F. & FABBRICIANI, C. 2010. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage*, 18, 971-80.
- MILLINGTON-WARD, S., ALLERS, C., TUOHY, G., CONGET, P., ALLEN, D., MCMAHON, H. P., KENNA, P. F., HUMPHRIES, P. & FARRAR, G. J. 2002. Validation in mesenchymal progenitor cells of a mutation-independent ex vivo approach to gene therapy for osteogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*, 11, 2201-6.
- MILLWARD-SADLER, S. J. & SALTER, D. M. 2004. Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng*, 32, 435-46.
- MINAS, T., VON KEUDELL, A., BRYANT, T. & GOMOLL, A. H. 2014. The John Insall Award: A Minimum 10-year Outcome Study of Autologous Chondrocyte Implantation. *Clin Orthop Relat Res*, 472, 41-51.
- MISHRA, A., TUMMALA, P., KING, A., LEE, B., KRAUS, M., TSE, V. & JACOBS, C. R. 2009. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods*, 15, 431-5.
- MIYAURA, C., INADA, M., SUZAWA, T., SUGIMOTO, Y., USHIKUBI, F., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S. & SUDA, T. 2000. Impaired bone resorption to prostaglandin E2 in prostaglandin E receptor EP4-knockout mice. *J Biol Chem*, 275, 19819-23.
- MIZUNO, H. 2009. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*, 76, 56-66.
- MIZUNO, H., TOBITA, M. & UYSAL, A. C. 2012. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 30, 804-10.
- MOBASHERI, A. & HENROTIN, Y. 2010. Identification, validation and qualification of biomarkers for osteoarthritis in humans and companion animals: mission for the next decade. *Vet J*, 185, 95-7.
- MOHAN, S. & BAYLINK, D. J. 1991. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res*, 30-48.
- MOKBEL, A. N., EL TOOKHY, O. S., SHAMAA, A. A., RASHED, L. A., SABRY, D. & EL SAYED, A. M. 2011. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC Musculoskelet Disord*, 12, 259.
- MOLD, C., RODGERS, C. P., KAPLAN, R. L. & GEWURZ, H. 1982. Binding of human C-reactive protein to bacteria. *Infect Immun*, 38, 392-5.
- MOLLOY, T., WANG, Y. & MURRELL, G. 2003. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*, 33, 381-94.

- MONFORT, J., GARCIA-GIRALT, N., LOPEZ-ARMADA, M. J., MONLLAU, J. C., BONILLA, A., BENITO, P. & BLANCO, F. J. 2006. Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation. *Arthritis Res Ther*, 8, R149.
- MONTASERI, A., BUSCH, F., MOBASHERI, A., BUHRMANN, C., ALDINGER, C., RAD, J. S. & SHAKIBAEI, M. 2011. IGF-1 and PDGF-bb suppress IL-1beta-induced cartilage degradation through down-regulation of NF-kappaB signaling: involvement of Src/PI-3K/AKT pathway. *PLoS One*, 6, e28663.
- MOOJEN, D. J., EVERTS, P. A., SCHURE, R. M., OVERDEVEST, E. P., VAN ZUNDERT, A., KNAPE, J. T., CASTELEIN, R. M., CREEMERS, L. B. & DHERT, W. J. 2008. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res*, 26, 404-10.
- MOR, A., ABRAMSON, S. B. & PILLINGER, M. H. 2005. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*, 115, 118-28.
- MORREY, B. F. 2012. Ligament injury and the use of hinged external fixators at the elbow. *Instr Course Lect*, 61, 215-25.
- MORTELLARO, C. M. 2003. Pathophysiology of osteoarthritis. *Vet Res Commun*, 27 Suppl 1, 75-8.
- MOSELEY, J. B., O'MALLEY, K., PETERSEN, N. J., MENKE, T. J., BRODY, B. A., KUYKENDALL, D. H., HOLLINGSWORTH, J. C., ASHTON, C. M. & WRAY, N. P. 2002. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*, 347, 81-8.
- MUIR, P., SCHAMBERGER, G. M., MANLEY, P. A. & HAO, Z. 2005. Localization of cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase in synovium and cranial cruciate ligament in dogs with cruciate disease. *Vet Surg*, 34, 239-46.
- MULLER-SIEBURG, C. E., SIEBURG, H. B., BERNITZ, J. M. & CATTAROSSO, G. 2012. Stem cell heterogeneity: implications for aging and regenerative medicine. *Blood*, 119, 3900-7.
- MURAT, N., KARADAM, B., OZKAL, S., KARATOSUN, V. & GIDENER, S. 2007. [Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the Mankin score]. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 41, 233-7.
- MURATA, H. & MIYAMOTO, T. 1993. Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. *Br Vet J*, 149, 277-83.
- MURATA, H., SHIMADA, N. & YOSHIOKA, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, 168, 28-40.
- MURPHY, J. M., FINK, D. J., HUNZIKER, E. B. & BARRY, F. P. 2003. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 48, 3464-74.
- MURPHY, L. & HELMICK, C. G. 2012. The impact of osteoarthritis in the United States: a population-health perspective. *Am J Nurs*, 112, S13-9.
- MURRAY, C. J., VOS, T., LOZANO, R., NAGHAVI, M., FLAXMAN, A. D., MICHAUD, C., EZZATI, M., SHIBUYA, K., SALOMON, J. A., ABDALLA, S., ABOYANS, V., ABRAHAM, J., ACKERMAN, I., AGGARWAL, R., AHN, S. Y., ALI, M. K., ALVARADO, M., ANDERSON, H. R., ANDERSON, L. M., ANDREWS, K. G., ATKINSON, C., BADDOUR, L. M., BAHALIM, A. N., BARKER-COLLO, S., BARRERO, L. H., BARTELS, D. H., BASANEZ, M. G., BAXTER, A., BELL, M. L., BENJAMIN, E. J., BENNETT, D., BERNABE, E., BHALLA, K., BHANDARI, B., BIKBOV, B., BIN ABDULHAK, A., BIRBECK, G., BLACK, J. A., BLENCOWE, H., BLORE, J. D., BLYTH, F., BOLLIGER, I., BONAVENTURE, A., BOUFOUS, S., BOURNE, R., BOUSSINESQ, M., BRAITHWAITE, T., BRAYNE, C., BRIDGETT, L., BROOKER, S., BROOKS, P., BRUGHA, T. S., BRYAN-HANCOCK, C., BUCELLO, C., BUCHBINDER, R., BUCKLE, G., BUDKE, C. M., BURCH, M., BURNEY, P., BURSTEIN, R., CALABRIA, B., CAMPBELL, B., CANTER, C. E., CARABIN, H., CARAPETIS, J., CARMONA, L., CELLA, C., CHARLSON, F., CHEN, H., CHENG, A. T., CHOU, D., CHUGH, S. S., COFFENG, L. E., COLAN, S. D., COLQUHOUN, S., COLSON, K. E., CONDON, J., CONNOR, M. D., COOPER, L. T., CORRIERE, M., CORTINOVIS, M., DE VACCARO, K. C., COUSER, W., COWIE, B. C., CRIQUI, M. H., CROSS, M., DABHADKAR, K. C., DAHIYA, M., DAHODWALA, N., DAMSERE-DERRY, J., DANAEI, G., DAVIS, A., DE LEO, D., DEGENHARDT, L., DELLAVALLE, R., DELOSSANTOS, A., DENENBERG, J., DERRETT, S., DES JARLAIS, D. C., DHARMARATNE, S. D., et al. 2012. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380, 2197-223.
- NAGASE, T., MUNETA, T., JU, Y. J., HARA, K., MORITO, T., KOGA, H., NIMURA, A., MOCHIZUKI, T. & SEKIYA, I. 2008. Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 58, 1389-98.
- NAGAYA, N., KANGAWA, K., ITOH, T., IWASE, T., MURAKAMI, S., MIYAHARA, Y., FUJII, T., UEMATSU, M., OHGUSHI, H., YAMAGISHI, M., TOKUDOME, T., MORI, H., MIYATAKE, K. & KITAMURA, S. 2005. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 112, 1128-35.
- NAIK, S. R. & WALA, S. M. 2014. Arthritis, a complex connective and synovial joint destructive autoimmune disease: Animal models of arthritis with varied etiopathology and their significance. *J Postgrad Med*, 60, 309-17.
- NAKAI, T., TAMAKI, M., NAKAMURA, T., NAKAI, T., ONISHI, A. & HASHIMOTO, K. 2013. Controlling pain after total knee arthroplasty using a multimodal protocol with local periarticular injections. *J Orthop*, 10, 92-4.
- NAKAMURA, M., TAKAHASHI, M., OHNO, K., KOSHINO, A., NAKASHIMA, K., SETOGUCHI, A., FUJINO, Y. & TSUJIMOTO, H. 2008. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci*, 70, 127-31.

- NASH, T. J., HOWLETT, C. R., MARTIN, C., STEELE, J., JOHNSON, K. A. & HICKLIN, D. J. 1994. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone*, 15, 203-8.
- NAUTA, A. J., KRUISSELBRINK, A. B., LURVINK, E., WILLEMZE, R. & FIBBE, W. E. 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 177, 2080-7.
- NEFF, M. W. & RINE, J. 2006. A fetching model organism. *Cell*, 124, 229-31.
- NELSON, F., BILLINGHURST, R. C., PIDOUX, I., REINER, A., LANGWORTHY, M., MCDERMOTT, M., MALOGNE, T., SITLER, D. F., KILAMBI, N. R., LENCZNER, E. & POOLE, A. R. 2006. Early post-traumatic osteoarthritis-like changes in human articular cartilage following rupture of the anterior cruciate ligament. *Osteoarthritis Cartilage*, 14, 114-9.
- NEOGI, T., FELSON, D., NIU, J., NEVITT, M., LEWIS, C. E., ALIABADI, P., SACK, B., TORNER, J., BRADLEY, L. & ZHANG, Y. 2009. Association between radiographic features of knee osteoarthritis and pain: results from two cohort studies. *BMJ*, 339, b2844.
- NEUPANE, M., CHANG, C. C., KIUPEL, M. & YUZBASIAN-GURKAN, V. 2008. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 14, 1007-15.
- NGANVONGPANIT, K., ITTHIARBHA, A., ONG-CHAI, S. & KONGTAWELERT, P. 2008. Evaluation of serum chondroitin sulfate and hyaluronan: biomarkers for osteoarthritis in canine hip dysplasia. *J Vet Sci*, 9, 317-25.
- NINDL, B. C., ALEMANY, J. A., KELLOGG, M. D., ROOD, J., ALLISON, S. A., YOUNG, A. J. & MONTAIN, S. J. 2007. Utility of circulating IGF-I as a biomarker for assessing body composition changes in men during periods of high physical activity superimposed upon energy and sleep restriction. *J Appl Physiol (1985)*, 103, 340-6.
- NISHIDA, K., DOI, T., MATSUO, M., ISHIWARI, Y., TSUJIGIWA, H., YOSHIDA, A., SHIBAHARA, M. & INOUE, H. 2001. Involvement of nitric oxide in chondrocyte cell death in chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage*, 9, 232-7.
- NISHIMORI, M., DEIE, M., KANAYA, A., EXHAM, H., ADACHI, N. & OCHI, M. 2006. Repair of chronic osteochondral defects in the rat. A bone marrow-stimulating procedure enhanced by cultured allogenic bone marrow mesenchymal stromal cells. *J Bone Joint Surg Br*, 88, 1236-44.
- NIXON, A. J., LILLICH, J. T., BURTON-WURSTER, N., LUST, G. & MOHAMMED, H. O. 1998. Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultured with insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta. *J Orthop Res*, 16, 531-41.
- NOEL, D., DJOUAD, F. & JORGENSE, C. 2002. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs*, 3, 1000-4.
- NOTH, U., STEINERT, A. F. & TUAN, R. S. 2008. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 4, 371-80.
- NUTTALL, M. E., PATTON, A. J., OLIVERA, D. L., NADEAU, D. P. & GOWEN, M. 1998. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res*, 13, 371-82.
- O'BRIEN, J. A. & RIZZIERI, D. A. 2013. Leukemic stem cells: a review. *Cancer Invest*, 31, 215-20.
- OCARINO NDE, M., BOELONI, J. N., JORGETTI, V., GOMES, D. A., GOES, A. M. & SERAKIDES, R. 2010. Intra-bone marrow injection of mesenchymal stem cells improves the femur bone mass of osteoporotic female rats. *Connect Tissue Res*, 51, 426-33.
- OH, H. J., PARK, E. J., LEE, S. Y., SOH, J. W., KONG, I. S., CHOI, S. W., RA, J. C., KANG, S. K. & LEE, B. C. 2012. Comparison of cell proliferation and epigenetic modification of gene expression patterns in canine foetal fibroblasts and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*, 45, 438-44.
- OH, S. H., MUZZONIGRO, T. M., BAE, S. H., LAPLANTE, J. M., HATCH, H. M. & PETERSEN, B. E. 2004. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest*, 84, 607-17.
- OH, S. K., PAVLOTSKY, N. & TAUBER, A. I. 1990. Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J Leukoc Biol*, 47, 142-8.
- OKUDA, K., KAWASE, T., MOMOSE, M., MURATA, M., SAITO, Y., SUZUKI, H., WOLFF, L. F. & YOSHIE, H. 2003. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*, 74, 849-57.
- OLBY, N. 2010. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40, 791-807.
- OLDERSHAW, R. A. 2012. Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future. *Int J Exp Pathol*, 93, 389-400.
- OLIVIERO, F., RAMONDA, R. & PUNZI, L. 2010. New horizons in osteoarthritis. *Swiss Med Wkly*, 140, w13098.
- OMBRELLINO, M., WANG, H., YANG, H., ZHANG, M., VISHNUBHAKAT, J., FRAZIER, A., SCHER, L. A., FRIEDMAN, S. G. & TRACEY, K. J. 2001. Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock*, 15, 181-5.
- OMOTO, S., NISHIDA, K., YAMAAI, Y., SHIBAHARA, M., NISHIDA, T., DOI, T., ASAHARA, H., NAKANISHI, T., INOUE, H. & TAKIGAWA, M. 2004. Expression and localization of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24/CCN2) in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 12, 771-8.

- ONISHI, T., INOKUMA, H. & OHNO, K. 2000. C-reactive protein concentrations in normal and diseased dogs; measured by laser nephelometric immunoassay. *J Jpn Vet Med Assoc*, 53, 595-601.
- ONYANGO, I. G. & KHAN, S. M. 2006. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 3, 339-49.
- ORLIC, D., HILL, J. M. & ARAI, A. E. 2002. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res*, 91, 1092-102.
- ORLIC, D., KAJSTURA, J., CHIMENTI, S., JAKONIUK, I., ANDERSON, S. M., LI, B., PICKEL, J., MCKAY, R., NADAL-GINARD, B., BODINE, D. M., LERI, A. & ANVERSA, P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410, 701-5.
- OROZCO, L., MUNAR, A., SOLER, R., ALBERCA, M., SOLER, F., HUGUET, M., SENTIS, J., SANCHEZ, A. & GARCIA-SANCHO, J. 2013. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation*, 95, 1535-41.
- OTERO, M., LAGO, R., LAGO, F., REINO, J. J. & GUALILLO, O. 2005. Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis Res Ther*, 7, R581-91.
- OYAMA, T., NISHIMOTO, S., TSUGAWA, T. & SHIMIZU, F. 2004. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg*, 62, 555-8.
- PAK, J. 2011. 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*, 5, 296.
- PAK, J. 2012. Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. *Pain Physician*, 15, 75-85.
- PAPALEONTIOU, M., HENDERSON, C. R., JR., TURNER, B. J., MOORE, A. A., OLKHOVSKAYA, Y., AMANFO, L. & REID, M. C. 2010. Outcomes associated with opioid use in the treatment of chronic noncancer pain in older adults: a systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc*, 58, 1353-69.
- PARK, Y. G., HAN, S. B., SONG, S. J., KIM, T. J. & HA, C. W. 2012. Platelet-rich plasma therapy for knee joint problems: review of the literature, current practice and legal perspectives in Korea. *Knee Surg Relat Res*, 24, 70-8.
- PARTSCH, G., SCHWARZER, C., NEUMULLER, J., DUNKY, A., PETERA, P., BROLL, H., ITTNER, G. & JANTSCH, S. 1989. Modulation of the migration and chemotaxis of PMN cells by hyaluronic acid. *Z Rheumatol*, 48, 123-8.
- PAVELKA, K., FOREJTOVA, S., OLEJAROVA, M., GATTEROVA, J., SENOLT, L., SPACEK, P., BRAUN, M., HULEJOVA, M., STOVICKOVA, J. & PAVELKOVA, A. 2004. Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 12, 277-83.
- PEAT, G., THOMAS, E., DUNCAN, R., WOOD, L., HAY, E. & CROFT, P. 2006. Clinical classification criteria for knee osteoarthritis: performance in the general population and primary care. *Ann Rheum Dis*, 65, 1363-7.
- PEERBOOMS, J. C., SLUIMER, J., BRUIJN, D. J. & GOSENS, T. 2010. Positive effect of an autologous platelet concentrate in lateral epicondylitis in a double-blind randomized controlled trial: platelet-rich plasma versus corticosteroid injection with a 1-year follow-up. *Am J Sports Med*, 38, 255-62.
- PELLETIER, J. P. & MARTEL-PELLETIER, J. 1994. [Role of synovial inflammation, cytokines and IGF-1 in the physiopathology of osteoarthritis]. *Rev Rhum Ed Fr*, 61, 103S-108S.
- PENG, J., WEN, C., WANG, A., WANG, Y., XU, W., ZHAO, B., ZHANG, L., LU, S., QIN, L., GUO, Q., DONG, L. & TIAN, J. 2011. Micro-CT-based bone ceramic scaffolding and its performance after seeding with mesenchymal stem cells for repair of load-bearing bone defect in canine femoral head. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 96, 316-25.
- PENG, L., JIA, Z., YIN, X., ZHANG, X., LIU, Y., CHEN, P., MA, K. & ZHOU, C. 2008. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev*, 17, 761-73.
- PEPYS, M. B. & BALTZ, M. L. 1983. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol*, 34, 141-212.
- PERBAL, B. 2004. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet*, 363, 62-4.
- PEREIRA, R. F., O'HARA, M. D., LAPTEV, A. V., HALFORD, K. W., POLLARD, M. D., CLASS, R., SIMON, D., LIVEZEY, K. & PROCKOP, D. J. 1998. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1142-7.
- PESCADOR, D. 2011. *Ingeniería Tisular Para El Tratamiento De Las Lesiones Osteocondrales*. Tesis dirigida por: García Briñón J, Martín Sánchez-Guijo F, Blanco Blanco JF. Universidad De Salamanca. PhD, Universidad de Salamanca.
- PETERSEN, H. H., NIELSEN, J. P. & HEEGAARD, P. M. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*, 35, 163-87.
- PHILIPPOU, A., MARIDAKI, M., HALAPAS, A. & KOUTSILIERIS, M. 2007. The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. *In Vivo*, 21, 45-54.
- PIERMATTEI, D., FLO, G. & DECAMP, C. 2007. Artrología. In: PIERMATTEI, D. (ed.) *Manual de Ortopedia y Reparación de Fracturas en Pequeños Animales*. 4ª ed. Buenos Aires, República Argentina: Inter-Médica.
- PIETRZAK, W. S. & EPPLEY, B. L. 2005. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg*, 16, 1043-54.

- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S. & MARSHAK, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- PLAYFORD, R. J. & MACDONALD, C. E. 1997. Growth factors in saliva. *Lancet*, 350, 369.
- POOLE, A. R. 2003. Biochemical/immunochemical biomarkers of osteoarthritis: utility for prediction of incident or progressive osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 29, 803-18.
- POOLE, A. R. 2005. Cartilage in health and disease. In: KOOPMAN WJ, M. L. (ed.) *Textbook of Rheumatology*. 3.a ed. Baltimore.
- POOLE, A. R., IONESCU, M., FITZCHARLES, M. A. & BILLINGHURST, R. C. 2004. The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases. *J Immunol Methods*, 294, 145-53.
- POOLE, R., BLAKE, S., BUSCHMANN, M., GOLDRING, S., LAVERTY, S., LOCKWOOD, S., MATYAS, J., MCDUGALL, J., PRITZKER, K., RUDOLPHI, K., VAN DEN BERG, W. & YAKSH, T. 2010. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 18 Suppl 3, S10-6.
- PRESLE, N., POTTIE, P., DUMOND, H., GUILLAUME, C., LAPICQUE, F., PALLU, S., MAINARD, D., NETTER, P. & TERLAIN, B. 2006. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis Cartilage*, 14, 690-5.
- PRICE, D. D., BUSH, F. M., LONG, S. & HARKINS, S. W. 1994. A comparison of pain measurement characteristics of mechanical visual analogue and simple numerical rating scales. *Pain*, 56, 217-26.
- PRICE, D. D., MCGRATH, P. A., RAFII, A. & BUCKINGHAM, B. 1983. The validation of visual analogue scales as ratio scale measures for chronic and experimental pain. *Pain*, 17, 45-56.
- PRIETO-MONTAÑA, J. & J., R. 2009. La artrosis como enfermedad genética. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 53, 271-277.
- PRIGOZHINA, T. B., KHITRIN, S., ELKIN, G., EIZIK, O., MORECKI, S. & SLAVIN, S. 2008. Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation. *Exp Hematol*, 36, 1370-6.
- PRITZKER, K. P., GAY, S., JIMENEZ, S. A., OSTERGAARD, K., PELLETIER, J. P., REVELL, P. A., SALTER, D. & VAN DEN BERG, W. B. 2006. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*, 14, 13-29.
- PROSPER, F., GAVIRA, J. J., HERREROS, J., RABAGO, G., LUQUIN, R., MORENO, J., ROBLES, J. E. & REDONDO, P. 2006. [Cell transplant and regenerative therapy with stem cells]. *An Sist Sanit Navar*, 29 Suppl 2, 219-34.
- PRUNET-MARCASSUS, B., COUSIN, B., CATON, D., ANDRE, M., PENICAUD, L. & CASTEILLA, L. 2006. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res*, 312, 727-36.
- PUE, C. A., MORTENSEN, R. F., MARSH, C. B., POPE, H. A. & WEWERS, M. D. 1996. Acute phase levels of C-reactive protein enhance IL-1 beta and IL-1ra production by human blood monocytes but inhibit IL-1 beta and IL-1ra production by alveolar macrophages. *J Immunol*, 156, 1594-600.
- PUNZI, L., CALO, L. & PLEBANI, M. 2002. Clinical significance of cytokine determination in synovial fluid. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 39, 63-88.
- PUNZI, L., OLIVIERO, F. & PLEBANI, M. 2005a. New biochemical insights into the pathogenesis of osteoarthritis and the role of laboratory investigations in clinical assessment. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 42, 279-309.
- PUNZI, L., OLIVIERO, F., RAMONDA, R., SFRISO, P. & TODESCO, S. 2005b. Laboratory findings in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 34, 58-61.
- PUNZI, L., RAMONDA, R., DEBERG, M., FRALLONARDO, P., CAMPANA, C., MUSACCHIO, E. & HENROTIN, Y. 2012. Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. *Osteoarthritis Cartilage*, 20, 557-61.
- PUNZI, L., RAMONDA, R., OLIVIERO, F., SFRISO, P., MUSSAP, M., PLEBANI, M., PODSWIADEK, M. & TODESCO, S. 2005c. Value of C reactive protein in the assessment of erosive osteoarthritis of the hand. *Ann Rheum Dis*, 64, 955-7.
- PUNZI, L., RAMONDA, R. & SFRISO, P. 2004. Erosive osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 18, 739-58.
- QU-PETERSEN, Z., DEASY, B., JANKOWSKI, R., IKEZAWA, M., CUMMINS, J., PRUCHNIC, R., MYTINGER, J., CAO, B., GATES, C., WERNIG, A. & HUARD, J. 2002. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol*, 157, 851-64.
- RADICE, F., YANEZ, R., GUTIERREZ, V., ROSALES, J., PINEDO, M. & CODA, S. 2010. Comparison of magnetic resonance imaging findings in anterior cruciate ligament grafts with and without autologous platelet-derived growth factors. *Arthroscopy*, 26, 50-7.
- RADULESCU, R. A., CIRSTOIU, C. F. & BADILA, A. E. 2010. Arthroscopical and histological study of cartilaginous lesions treated by mosaicplasty. *J Med Life*, 3, 407-11.
- RAFFAGHELLO, L., BIANCHI, G., BERTOLOTTI, M., MONTECUCCO, F., BUSCA, A., DALLEGRI, F., OTTONELLO, L. & PISTOIA, V. 2008. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*, 26, 151-62.
- RAFII, S. & LYDEN, D. 2003. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*, 9, 702-12.

- RAINES, E. W. & ROSS, R. 1982. Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem*, 257, 5154-60.
- RAISZ, L. G. 2005. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*, 115, 3318-25.
- RAMALLAL, M., MANEIRO, E., LOPEZ, E., FUENTES-BOQUETE, I., LOPEZ-ARMADA, M. J., FERNANDEZ-SUEIRO, J. L., GALDO, F., DE TORO, F. J. & BLANCO, F. J. 2004. Xeno-implantation of pig chondrocytes into rabbit to treat localized articular cartilage defects: an animal model. *Wound Repair Regen*, 12, 337-45.
- RAMIYA, V. K., MARAIST, M., ARFORS, K. E., SCHATZ, D. A., PECK, A. B. & CORNELIUS, J. G. 2000. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med*, 6, 278-82.
- RAMONDA, R., LORENZIN, M., MODESTI, V., CAMPANA, C., ORTOLAN, A., FRALLONARDO, P. & PUNZI, L. 2013. Serological markers of erosive hand osteoarthritis. *Eur J Intern Med*, 24, 11-5.
- RANDELLI, P. S., ARRIGONI, P., CABITZA, P., VOLPI, P. & MAFFULLI, N. 2008. Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. *Disabil Rehabil*, 30, 1584-9.
- RAPPOLEE, D. A., MARK, D., BANDA, M. J. & WERB, Z. 1988. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*, 241, 708-12.
- RASMUSSEN, I., LE BLANC, K., SUNDBERG, B. & RINGDEN, O. 2007. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol*, 65, 336-43.
- RATAJCZAK, M. Z., KUCIA, M., JADCZYK, T., GRECO, N. J., WOJAKOWSKI, W., TENDERA, M. & RATAJCZAK, J. 2012. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? *Leukemia*, 26, 1166-73.
- RATCLIFFE, A., BEAUVAIS, P. J. & SAED-NEJAD, F. 1994. Differential levels of synovial fluid aggrecan aggregate components in experimental osteoarthritis and joint disuse. *J Orthop Res*, 12, 464-73.
- RATCLIFFE, A., BILLINGHAM, M. E., SAED-NEJAD, F., MUIR, H. & HARDINGHAM, T. E. 1992. Increased release of matrix components from articular cartilage in experimental canine osteoarthritis. *J Orthop Res*, 10, 350-8.
- RAYEGANI, S. M., RAEISSADAT, S. A., TAHERI, M. S., BABAEE, M., BAHRAMI, M. H., ELIASPOUR, D. & GHORBANI, E. 2014. Does intra articular platelet rich plasma injection improve function, pain and quality of life in patients with osteoarthritis of the knee? A randomized clinical trial. *Orthop Rev (Pavia)*, 6, 5405.
- REED, G. 2007. Platelet secretion. In: MICHELSON, A. (ed.) *In Platelets*. 2^o ed. San Diego: Elsevier Science.
- REED, G. L. 2004. Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost*, 30, 441-50.
- REED, G. L., FITZGERALD, M. L. & POLGAR, J. 2000. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood*, 96, 3334-42.
- REICH, C. M., RAABE, O., WENISCH, S., BRIDGER, P. S., KRAMER, M. & ARNHOLD, S. 2012. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study. *Vet Res Commun*, 36, 139-48.
- REID, M. C., SHENGELIA, R. & PARKER, S. J. 2012. Pharmacologic Management of Osteoarthritis-Related Pain in Older Adults: A Review Shows that Many Drug Therapies Provide Small-to-Modest Pain Relief. *HSS J*, 8, 159-64.
- REN, G., ZHANG, L., ZHAO, X., XU, G., ZHANG, Y., ROBERTS, A. I., ZHAO, R. C. & SHI, Y. 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2, 141-50.
- RENDU, F. & BROHARD-BOHN, B. 2001. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12, 261-73.
- REVERTE-VINAIXA, M. M., JOSHI, N., DIAZ-FERREIRO, E. W., TEIXIDOR-SERRA, J. & DOMINGUEZ-ORONoz, R. 2013. Medium-term outcome of mosaicplasty for grade III-IV cartilage defects of the knee. *J Orthop Surg (Hong Kong)*, 21, 4-9.
- RIALLAND, P., BICHOT, S., MOREAU, M., GUILLOT, M., LUSSIER, B., GAUVIN, D., MARTEL-PELLETIER, J., PELLETIER, J. P. & TRONCY, E. 2012. Clinical validity of outcome pain measures in naturally occurring canine osteoarthritis. *BMC Vet Res*, 8, 162.
- RIBAULT, D., KHATIB, A. M., PANASYUK, A., BARBARA, A., BOUIZAR, Z. & MITROVIC, R. D. 1997. Mitogenic and metabolic actions of epidermal growth factor on rat articular chondrocytes: modulation by fetal calf serum, transforming growth factor-beta, and tyrphostin. *Arch Biochem Biophys*, 337, 149-58.
- RIKIHISA, Y., YAMAMOTO, S., KWAK, I., IQBAL, Z., KOCIBA, G., MOTT, J. & CHICHANASIRIWITHAYA, W. 1994. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with Ehrlichia canis. *J Clin Microbiol*, 32, 912-7.
- ROBERTS, A. B. 1998. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab*, 24, 111-9.
- ROBERTS, A. B., SPORN, M. B., ASSOIAN, R. K., SMITH, J. M., ROCHE, N. S., WAKEFIELD, L. M., HEINE, U. I., LIOTTA, L. A., FALANGA, V., KEHRL, J. H. & ET AL. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4167-71.
- ROBERTSSON, O., LEWOLD, S., KNUTSON, K. & LIDGREN, L. 2000. The Swedish Knee Arthroplasty Project. *Acta Orthop Scand*, 71, 7-18.
- ROBEY, F. A., JONES, K. D., TANAKA, T. & LIU, T. Y. 1984. Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein. *J Biol Chem*, 259, 7311-6.

- RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ F.J, VALDES-SÁNCHEZ T, CARRILLO J.M, RUBIO M, MONLEON-PRADES M, GARCÍA-CRUZ D.M, GARCÍA M, CUGAT, R. & MORENO-MANZANO V 2012. Platelet-Rich Plasma Favors Proliferation of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Methacrylate-Endcapped Caprolactone Porous Scaffold Niches. *Journal of Functional Biomaterials*, 3, 556-568.
- ROEMER, F. W., CREMA, M. D., TRATTNIG, S. & GUERMAZI, A. 2011a. Advances in imaging of osteoarthritis and cartilage. *Radiology*, 260, 332-54.
- ROEMER, F. W. & GUERMAZI, A. 2012. Osteoarthritis year 2012 in review: imaging. *Osteoarthritis Cartilage*, 20, 1440-6.
- ROEMER, F. W., GUERMAZI, A., FELSON, D. T., NIU, J., NEVITT, M. C., CREMA, M. D., LYNCH, J. A., LEWIS, C. E., TORNER, J. & ZHANG, Y. 2011b. Presence of MRI-detected joint effusion and synovitis increases the risk of cartilage loss in knees without osteoarthritis at 30-month follow-up: the MOST study. *Ann Rheum Dis*, 70, 1804-9.
- ROGERS, A. D., PAYNE, J. E. & YU, J. S. 2013. Cartilage imaging: a review of current concepts and emerging technologies. *Semin Roentgenol*, 48, 148-57.
- ROJEWSKI, M. T., WEBER, B. M. & SCHREZENMEIER, H. 2008. Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. *Transfus Med Hemother*, 35, 168-184.
- ROSENTHAL, N. 2003. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med*, 349, 267-74.
- ROSSLER, A., LASZLO, Z., KVAS, E. & HINGHOFER-SZALKAY, H. G. 1998. Plasma hyaluronan concentration: no circadian rhythm but large effect of food intake in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 78, 573-7.
- ROUBILLE, C., PELLETIER, J. P. & MARTEL-PELLETIER, J. 2013. New and emerging treatments for osteoarthritis management: will the dream come true with personalized medicine? *Expert Opin Pharmacother*, 14, 2059-77.
- ROUSSEAU, J. C. & DELMAS, P. D. 2007. Biological markers in osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 3, 346-56.
- RUAN, M. Z., EREZ, A., GUSE, K., DAWSON, B., BERTIN, T., CHEN, Y., JIANG, M. M., YUSTEIN, J., GANNON, F. & LEE, B. H. 2013. Proteoglycan 4 expression protects against the development of osteoarthritis. *Sci Transl Med*, 5, 176ra34.
- RYAN, A. E., LOHAN, P., O'FLYNN, L., TREACY, O., CHEN, X., COLEMAN, C., SHAW, G., MURPHY, M., BARRY, F., GRIFFIN, M. D. & RITTER, T. 2014. Chondrogenic differentiation increases antidonor immune response to allogeneic mesenchymal stem cell transplantation. *Mol Ther*, 22, 655-67.
- RYBARCZYK, B. J., LAWRENCE, S. O. & SIMPSON-HAIDARIS, P. J. 2003. Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. *Blood*, 102, 4035-43.
- RYCHEL, J. K. 2010. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Top Companion Anim Med*, 25, 20-5.
- SAFRAN, M. R. & SEIBER, K. 2010. The evidence for surgical repair of articular cartilage in the knee. *J Am Acad Orthop Surg*, 18, 259-66.
- SAHA, N., MOLDOVAN, F., TARDIF, G., PELLETIER, J. P., CLOUTIER, J. M. & MARTEL-PELLETIER, J. 1999. Interleukin-1beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. *Arthritis Rheum*, 42, 1577-87.
- SAITO, I., KOSHINO, T., NAKASHIMA, K., UESUGI, M. & SAITO, T. 2002. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 156-62.
- SAITO, M., TAKAHASHI, K. A., ARAI, Y., INOUE, A., SAKAO, K., TONOMURA, H., HONJO, K., NAKAGAWA, S., INOUE, H., TABATA, Y. & KUBO, T. 2009. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. *Clin Exp Rheumatol*, 27, 201-7.
- SALEH, H. & COX, F. 2004. Gravitational platelet separation. Accelerating the body's own healing process. *Br J Perioper Nurs*, 14, 175-9.
- SALEMI, S., RINALDI, C., MANNA, F., GUARNERI, G. F. & PARODI, P. C. 2008. Reconstruction of lower leg skin ulcer with autologous adipose tissue and platelet-rich plasma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 61, 1565-7.
- SAMPSON, S., GERHARDT, M. & MANDELBAUM, B. 2008. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 1, 165-74.
- SANCHEZ, M., ANITUA, E., AZOFRA, J., AGUIRRE, J. J. & ANDIA, I. 2008. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol*, 26, 910-3.
- SANCHEZ, M., AZOFRA, J., ANITUA, E., ANDIA, I., PADILLA, S., SANTISTEBAN, J. & MUJICA, I. 2003. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc*, 35, 1648-52.
- SANCHEZ, M., GUADILLA, J., FIZ, N. & ANDIA, I. 2012. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injections for the treatment of osteoarthritis of the hip. *Rheumatology (Oxford)*, 51, 144-50.
- SANTANGELO, K. S., JOHNSON, A. L., RUPPERT, A. S. & BERTONE, A. L. 2007. Effects of hyaluronan treatment on lipopolysaccharide-challenged fibroblast-like synovial cells. *Arthritis Res Ther*, 9, R1.
- SASAKI, E., TSUDA, E., YAMAMOTO, Y., IWASAKI, K., INOUE, R., TAKAHASHI, I., SAWADA, K., FUJITA, H., UMEDA, T., NAKAJI, S. & ISHIBASHI, Y. 2013. 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*, 37, 925-30.

- SAUTNER, J. & SCHUELLER-WEIDEKAMM, C. 2013. Radiological aspects of osteoarthritis. *Wien Med Wochenschr*, 163, 220-7.
- SAVAGE, C. R., JR., INAGAMI, T. & COHEN, S. 1972. The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 247, 7612-21.
- SCHAFFER, C., HEISS, A., SCHWARZ, A., WESTENFELD, R., KETTELER, M., FLOEGE, J., MULLER-ESTERL, W., SCHINKE, T. & JAHNEN-DECHENT, W. 2003. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest*, 112, 357-66.
- SCHAFFER, R. 2006. *Medicina clínica del perro y el gato*, Barcelona.
- SCHAFFLER, A. & BUCHLER, C. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, 25, 818-27.
- SCHEIN, J. R., KOSINSKI, M. R., JANAGAP-BENSON, C., GAJRIA, K., LIN, P. & FREEDMAN, J. D. 2008. Functionality and health-status benefits associated with reduction of osteoarthritis pain. *Curr Med Res Opin*, 24, 1255-65.
- SCHEPULL, T., KVIST, J., NORRMAN, H., TRINKS, M., BERLIN, G. & ASPENBERG, P. 2011. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med*, 39, 38-47.
- SCHIPHOF, D., BOERS, M. & BIERMA-ZEINSTR, S. M. 2008. Differences in descriptions of Kellgren and Lawrence grades of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 67, 1034-6.
- SCHWARZ, C., LEICHT, U., DROSSE, I., ULRICH, V., LUIBL, V., SCHIEKER, M. & ROCKEN, M. 2011. Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. *Vet Res Commun*, 35, 487-99.
- SCOTT, D., SMITH, C., LOHMANDER, S. & CHARD, J. 2003. Osteoarthritis. *Clin Evid*, 1402-30.
- SCOTT, D. L., WOLFE, F. & HUIZINGA, T. W. 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 376, 1094-108.
- SEIJAS, R. 2013. *Estudio de Evaluación de la Cicatrización en Ligamentoplastia de Cruzado Anterior de Rodilla*. Universidad Cardenal Herrera- CEU.
- SERRA, C. I. 2006. *Análisis Biomecánico e Histológico del Tejido de Reparación en Defectos Condrales de Espesor Completo tras la Aplicación de Plasma Rico en Plaquetas Autólogo. Estudio Experimental*. Universidad Cardenal Herrera- CEU.
- SERRA, C. I., SOLER, C., CARILLO, J. M., SOPENA, J. J., REDONDO, J. I. & CUGAT, R. 2012. Effect of autologous platelet-rich plasma on the repair of full-thickness articular defects in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*.
- SHANAMAN, R., FILSTEIN, M. R. & DANESH-MEYER, M. J. 2001. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 21, 345-55.
- SHARPLESS, N. E. & DEPINHO, R. A. 2007. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 703-13.
- SHEN, C. L., SMITH, B. J., LO, D. F., CHYU, M. C., DUNN, D. M., CHEN, C. H. & KWUN, I. S. 2012. Dietary polyphenols and mechanisms of osteoarthritis. *J Nutr Biochem*, 23, 1367-77.
- SHEN, J. & CHEN, D. 2014. Recent progress in osteoarthritis research. *J Am Acad Orthop Surg*, 22, 467-8.
- SHI, S., MERCER, S., ECKERT, G. J. & TRIPPEL, S. B. 2009. Growth factor regulation of growth factors in articular chondrocytes. *J Biol Chem*, 284, 6697-704.
- SHIBAYAMA, E. & KOIZUMI, H. 1996. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol*, 148, 1807-18.
- SHIBUYA, M. 2001. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*, 26, 25-35.
- SHIMPO, H., SAKAI, T., KONDO, S., MISHIMA, S., YODA, M., HIRAIWA, H. & ISHIGURO, N. 2009. Regulation of prostaglandin E(2) synthesis in cells derived from chondrocytes of patients with osteoarthritis. *J Orthop Sci*, 14, 611-7.
- SHIN, M. K., LEE, J. H., LEE, S. J. & KIM, N. I. 2012. Platelet-rich plasma combined with fractional laser therapy for skin rejuvenation. *Dermatol Surg*, 38, 623-30.
- SHIRASAWA, S., SEKIYA, I., SAKAGUCHI, Y., YAGISHITA, K., ICHINOSE, S. & MUNETA, T. 2006. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem*, 97, 84-97.
- SIEBUHR, A. S., PETERSEN, K. K., ARENDT-NIELSEN, L., EGSGAARD, L. L., ESKEHAVE, T., CHRISTIANSEN, C., SIMONSEN, O., HOECK, H. C., KARSDAL, M. A. & BAY-JENSEN, A. C. 2014. Identification and characterisation of osteoarthritis patients with inflammation derived tissue turnover. *Osteoarthritis Cartilage*, 22, 44-50.
- SILVA, R. F., CARMONA, J. U. & REZENDE, C. M. 2013. Intra-articular injections of autologous platelet concentrates in dogs with surgical reparation of cranial cruciate ligament rupture. A pilot study. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 26, 285-90.
- SIMON, L. S. 2013. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their risk: a story still in development. *Arthritis Res Ther*, 15 Suppl 3, S1.
- SINGH, J. A. 2012. Stem cells and other innovative intra-articular therapies for osteoarthritis: what does the future hold? *BMC Med*, 10, 44.
- SISSON, S., GROSSMAN, J. & GETTY, R. 1982. Sindesmología general (artrología). In: GETTY, R. (ed.) *Anatomía de los Animales Domésticos*. 5º ed. Barcelona, España: Elsevier España.

- SITARAS, N. M., SARIBAN, E., PANTAZIS, P., ZETTER, B. & ANTONIADES, H. N. 1987. Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and synthesize PDGF-like mitogen. *J Cell Physiol*, 132, 376-80.
- SKOWRONSKI, J., SKOWRONSKI, R. & RUTKA, M. 2012. Cartilage lesions of the knee treated with blood mesenchymal stem cells - results. *Ortop Traumatol Rehabil*, 14, 569-77.
- SMITH, G. K., MAYHEW, P. D., KAPATKIN, A. S., MCKELVIE, P. J., SHOFER, F. S. & GREGOR, T. P. 2001. Evaluation of risk factors for degenerative joint disease associated with hip dysplasia in German Shepherd Dogs, Golden Retrievers, Labrador Retrievers, and Rottweilers. *J Am Vet Med Assoc*, 219, 1719-24.
- SMITH, G. K., PASTER, E. R., POWERS, M. Y., LAWLER, D. F., BIERY, D. N., SHOFER, F. S., MCKELVIE, P. J. & KEALY, R. D. 2006. Lifelong diet restriction and radiographic evidence of osteoarthritis of the hip joint in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 229, 690-3.
- SMITH, R. L., CARTER, D. R. & SCHURMAN, D. J. 2004. Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: a review. *Clin Orthop Relat Res*, S89-95.
- SOLER, M. 2006. *Análisis Macroscópico, Histológico e Inmunohistoquímico del Efecto del Plasma Rico en Plaquetas Autólogo en la Reparación de Defectos Condrales en Conejo. Estudio Experimental*. Universidad Cardenal Herrera- CEU.
- SOLHEIM, E., OYEN, J., HEGNA, J., AUSTGULEN, O. K., HARLEM, T. & STRAND, T. 2010. Microfracture treatment of single or multiple articular cartilage defects of the knee: a 5-year median follow-up of 110 patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18, 504-8.
- SONCINI, M., VERTUA, E., GIBELLI, L., ZORZI, F., DENEGRI, M., ALBERTINI, A., WENGLER, G. S. & PAROLINI, O. 2007. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*, 1, 296-305.
- SONG, Y. S., LEE, H. J., DOO, S. H., LEE, S. J., LIM, I., CHANG, K. T. & KIM, S. U. 2012. Mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor (HGF) inhibit collagen deposit and improve bladder function in rat model of bladder outlet obstruction. *Cell Transplant*, 21, 1641-50.
- SPAGGIARI, G. M., ABDELRAZIK, H., BECCHETTI, F. & MORETTA, L. 2009. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*, 113, 6576-83.
- SPAGGIARI, G. M., CAPOBIANCO, A., BECCHETTI, S., MINGARI, M. C. & MORETTA, L. 2006. 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*, 107, 1484-90.
- SPITZ, A., MOORE, A. A., PAPALEONTIOU, M., GRANIERI, E., TURNER, B. J. & REID, M. C. 2011. Primary care providers' perspective on prescribing opioids to older adults with chronic non-cancer pain: a qualitative study. *BMC Geriatr*, 11, 35.
- STADTFELD, M., NAGAYA, M., UTIKAL, J., WEIR, G. & HOCHEDLINGER, K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 322, 945-9.
- STAIKOS, C., VERVERIDIS, A., DROSOS, G., MANOLOPOULOS, V. G., VERETTAS, D. A. & TAVRIDOU, A. 2013. The association of adipokine levels in plasma and synovial fluid with the severity of knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 52, 1077-83.
- STAN, G., ORBAN, H., ORBAN, C., PETCU, D. & GHEORGHE, P. 2013. The influence of total knee arthroplasty on postural control. *Chirurgia (Bucur)*, 108, 874-8.
- STEADMAN, J. R., RODKEY, W. G. & BRIGGS, K. K. 2006. The microfracture technique. *Basic Science, Clinical Repair and Reconstruction of Articular Cartilage Defects: Current Status and Prospects*. First Edition ed. Bologna, Italy: Timeo Editore- Bologna.
- STEENFOS, H. H. 1994. Growth factors and wound healing. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 28, 95-105.
- STEINBECK, M. J., NESTI, L. J., SHARKEY, P. F. & PARVIZI, J. 2007. Myeloperoxidase and chlorinated peptides in osteoarthritis: potential biomarkers of the disease. *J Orthop Res*, 25, 1128-35.
- STEPHAN, A., LAROCHE, S. & DAVIS, S. 2001. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci*, 21, 5703-14.
- STEPTOE, P. C. & EDWARDS, R. G. 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2, 366.
- STONE, D. K. 1998. Receptors: structure and function. *Am J Med*, 105, 244-50.
- SUN, L., WANG, D., LIANG, J., ZHANG, H., FENG, X., WANG, H., HUA, B., LIU, B., YE, S., HU, X., XU, W., ZENG, X., HOU, Y., GILKESON, G. S., SILVER, R. M., LU, L. & SHI, S. 2010. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 62, 2467-75.
- TABERA, S., PEREZ-SIMON, J. A., DIEZ-CAMPELO, M., SANCHEZ-ABARCA, L. I., BLANCO, B., LOPEZ, A., BENITO, A., OCIO, E., SANCHEZ-GUIJO, F. M., CANIZO, C. & SAN MIGUEL, J. F. 2008. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*, 93, 1301-9.
- TABLIN, F. 2000. Platelet structure and function. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G., JAIN, N. C. & AL, E. (eds.) *Schlam's veterinary haematology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.

- TAKIGAWA, M., OKAWA, T., PAN, H., AOKI, C., TAKAHASHI, K., ZUE, J., SUZUKI, F. & KINOSHITA, A. 1997. Insulin-like growth factors I and II are autocrine factors in stimulating proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective receptors on a clonal human chondrosarcoma-derived chondrocyte cell line, HCS-2/8. *Endocrinology*, 138, 4390-400.
- TARRONI, G., TESSARIN, C., DE SILVESTRO, L., CASOL, D., GIOZZET, M., CALOPRISCO, G. & DE PAOLI VITALI, E. 2002. [Local therapy with platelet-derived growth factors for chronic diabetic ulcers in haemodialysis patients]. *G Ital Nefrol*, 19, 630-3.
- TATEISHI, K., ANDO, W., HIGUCHI, C., HART, D. A., HASHIMOTO, J., NAKATA, K., YOSHIKAWA, H. & NAKAMURA, N. 2008. Comparison of human serum with fetal bovine serum for expansion and differentiation of human synovial MSC: potential feasibility for clinical applications. *Cell Transplant*, 17, 549-57.
- TAYAPONGSAK, P., O'BRIEN, D. A., MONTEIRO, C. B. & ARCEO-DIAZ, L. Y. 1994. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg*, 52, 161-5; discussion 166.
- THAKUR, M., RAHMAN, W., HOBBS, C., DICKENSON, A. H. & BENNETT, D. L. 2012. Characterisation of a peripheral neuropathic component of the rat monoiodoacetate model of osteoarthritis. *PLoS One*, 7, e33730.
- THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. & JONES, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-7.
- THONAR, E. J., MASUDA, K., LENZ, M. E., HAUSELMANN, H. J., KUETTNER, K. E. & MANICOURT, D. H. 1995. Serum markers of systemic disease processes in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*, 43, 68-70.
- TILL, J. E. & MC, C. E. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-22.
- TILLET, W. & FRANCIS, T. 1930. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*, 561-571.
- TIMMINS, N. E., KIEL, M., GUNTHER, M., HEAZLEWOOD, C., DORAN, M. R., BROOKE, G. & ATKINSON, K. 2012. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng*, 109, 1817-26.
- TINS, B. J., MCCALL, I. W., TAKAHASHI, T., CASSAR-PULLICINO, V., ROBERTS, S., ASHTON, B. & RICHARDSON, J. 2005. Autologous chondrocyte implantation in knee joint: MR imaging and histologic features at 1-year follow-up. *Radiology*, 234, 501-8.
- TODHUNTER, R. & JOHNSTON, S. 2006. Osteoarthritis. In: SLATTER, D. (ed.) *Tratado de Cirugía en Pequeños Animales*. 3ª ed. Buenos Aires, República Argentina: Inter-Médica.
- TODOROVIC, V., JURUKOVSKI, V., CHEN, Y., FONTANA, L., DABOVIC, B. & RIFKIN, D. B. 2005. Latent TGF-beta binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 38-41.
- TOGHRAIE, F., RAZMKHAH, M., GHOLIPOUR, M. A., FAGHIH, Z., CHENARI, N., TORABI NEZHAD, S., NAZHVANI DEGHANI, S. & GHADERI, A. 2012. Scaffold-free adipose-derived stem cells (ASCs) improve experimentally induced osteoarthritis in rabbits. *Arch Iran Med*, 15, 495-9.
- TOHYAMA, H., YOSHIKAWA, T., JU, Y. J. & YASUDA, K. 2009. Revascularization in the tendon graft following anterior cruciate ligament reconstruction of the knee: its mechanisms and regulation. *Chang Gung Med J*, 32, 133-9.
- TREJO, J. L., PIRIZ, J., LLORENS-MARTIN, M. V., FERNANDEZ, A. M., BOLOS, M., LEROITH, D., NUNEZ, A. & TORRES-ALEMAN, I. 2007. Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol Psychiatry*, 12, 1118-28.
- TREUTING, R. 2000. Minimally invasive orthopedic surgery: arthroscopy. *Ochsner J*, 2, 158-63.
- TRICHE, R. & MANDELBAUM, B. R. 2013. Overview of cartilage biology and new trends in cartilage stimulation. *Foot Ankle Clin*, 18, 1-12.
- TRIPPEL, S. B., GHIVIZZANI, S. C. & NIXON, A. J. 2004. Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene Ther*, 11, 351-9.
- TROWBRIDGE, C. C., STAMMERS, A. H., WOODS, E., YEN, B. R., KLAYMAN, M. & GILBERT, C. 2005. Use of platelet gel and its effects on infection in cardiac surgery. *J Extra Corpor Technol*, 37, 381-6.
- TROYER, D. L. & WEISS, M. L. 2008. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26, 591-9.
- TRZECIAK, T., KRUCZYNSKI, J., JAROSZEWSKI, J. & LUBIATOWSKI, P. 2006. Evaluation of cartilage reconstruction by means of autologous chondrocyte versus periosteal graft transplantation: an animal study. *Transplant Proc*, 38, 305-11.
- TSAI, K. J., TSAI, Y. C. & SHEN, C. K. 2007. G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease. *J Exp Med*, 204, 1273-80.
- TSAI, S. Y., HUANG, Y. C., CHUEH, L. L., YEH, L. S. & LIN, C. S. 2014. Intra-articular transplantation of porcine adipose-derived stem cells for the treatment of canine osteoarthritis: A pilot study. *World J Transplant*, 4, 196-205.
- TSUBOI, H., MATSUI, Y., HAYASHIDA, K., YAMANE, S., MAEDA-TANIMURA, M., NAMPEI, A., HASHIMOTO, J., SUZUKI, R., YOSHIKAWA, H. & OCHI, T. 2003. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Ann Rheum Dis*, 62, 196-203.
- TULI, R., LI, W. J. & TUAN, R. S. 2003. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther*, 5, 235-8.

- TURAN, Y., BAL, S., GURGAN, A., TOPAC, H. & KOSEOGLU, M. 2007. Serum hyaluronan levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol*, 26, 1293-8.
- TURGEMAN, G., ASLAN, H., GAZIT, Z. & GAZIT, D. 2002a. Cell-mediated gene therapy for bone formation and regeneration. *Curr Opin Mol Ther*, 4, 390-4.
- TURGEMAN, G., ZILBERMAN, Y., ZHOU, S., KELLY, P., MOUTSATSOS, I. K., KHARODE, Y. P., BORELLA, L. E., BEX, F. J., KOMM, B. S., BODINE, P. V. & GAZIT, D. 2002b. Systemically administered rhBMP-2 promotes MSC activity and reverses bone and cartilage loss in osteopenic mice. *J Cell Biochem*, 86, 461-74.
- UCHIDA, K., URABE, K., NARUSE, K., OGAWA, Z., MABUCHI, K. & ITOMAN, M. 2009. Hyperlipidemia and hyperinsulinemia in the spontaneous osteoarthritis mouse model, STR/Ort. *Exp Anim*, 58, 181-7.
- UHLIN-HANSEN, L., LANGVOLL, D., WIK, T. & KOLSET, S. O. 1992. Blood platelets stimulate the expression of chondroitin sulfate proteoglycan in human monocytes. *Blood*, 80, 1058-65.
- URISH, K. L., VELLA, J. B., OKADA, M., DEASY, B. M., TOBITA, K., KELLER, B. B., CAO, B., PIGANELLI, J. D. & HUARD, J. 2009. Antioxidant levels represent a major determinant in the regenerative capacity of muscle stem cells. *Mol Biol Cell*, 20, 509-20.
- VADALOUCA, A., SIAFAKA, I., ARGYRA, E., VRACHNOU, E. & MOKA, E. 2006. Therapeutic management of chronic neuropathic pain: an examination of pharmacologic treatment. *Ann N Y Acad Sci*, 1088, 164-86.
- VALBONESI, M., GIANNINI, G., MIGLIORI, F., DALLA COSTA, R. & GALLI, A. 2002. The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: a preliminary report. *Int J Artif Organs*, 25, 334-8.
- VAN BUUL, G. M., KOEVOET, W. L., KOPS, N., BOS, P. K., VERHAAR, J. A., WEINANS, H., BERNSEN, M. R. & VAN OSCH, G. J. 2011. Platelet-rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes. *Am J Sports Med*, 39, 2362-70.
- VAN DER KRAAN, P. M. 2012. Osteoarthritis year 2012 in review: biology. *Osteoarthritis Cartilage*, 20, 1447-50.
- VAN OSCH, G. J., VAN DEN BERG, W. B., HUNZIKER, E. B. & HAUSELMANN, H. J. 1998. Differential effects of IGF-1 and TGF beta-2 on the assembly of proteoglycans in pericellular and territorial matrix by cultured bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 6, 187-95.
- VAQUERIZO, V., PLASENCIA, M. A., ARRIBAS, I., SEIJAS, R., PADILLA, S., ORIVE, G. & ANITUA, E. 2013. Comparison of intra-articular injections of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus Durolane hyaluronic acid in the treatment of patients with symptomatic osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arthroscopy*, 29, 1635-43.
- VASCONCELOS, E., FIGUEIREDO, A. C. & SEGATCHIAN, J. 2003. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and Apheresis. *Transfus Apher Sci*, 29, 13-6.
- VEGA, J., GARCÍA-SUÁREZ, O. & MARTÍNEZ-ALMAGRO, A. 2000. Cartílago articular y factores de crecimiento. *Mapfre Medicina*, 212-225.
- VEIKKOLA, T., KARKKAINEN, M., CLAESSEON-WELSH, L. & ALITALO, K. 2000. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*, 60, 203-12.
- VELDHUIS, J. D., FARHY, L., WELTMAN, A. L., KUIPERS, J., WELTMAN, J. & WIDEMAN, L. 2005. Gender modulates sequential suppression and recovery of pulsatile growth hormone secretion by physiological feedback signals in young adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 2874-81.
- VELNAR, T., BAILEY, T. & SMRKOLJ, V. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*, 37, 1528-42.
- VERFAILLIE, C. M., PERA, M. F. & LANSDORP, P. M. 2002. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 369-91.
- VERONESI, F., MAGLIO, M., TSCHON, M., ALDINI, N. N. & FINI, M. 2013. Adipose-derived mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: State-of-the-art in in vivo studies. *J Biomed Mater Res A*.
- VERSCHURE, P. J., JOOSTEN, L. A., VAN DER KRAAN, P. M. & VAN DEN BERG, W. B. 1994a. Responsiveness of articular cartilage from normal and inflamed mouse knee joints to various growth factors. *Ann Rheum Dis*, 53, 455-60.
- VERSCHURE, P. J., VAN MARLE, J., JOOSTEN, L. A. & VAN DEN BERG, W. B. 1994b. Localization and quantification of the insulin-like growth factor-1 receptor in mouse articular cartilage by confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem*, 42, 765-73.
- VICKERS, A. J., CRONIN, A. M., MASCHINO, A. C., LEWIS, G., MACPHERSON, H., FOSTER, N. E., SHERMAN, K. J., WITT, C. M. & LINDE, K. 2012. Acupuncture for chronic pain: individual patient data meta-analysis. *Arch Intern Med*, 172, 1444-53.
- VIKJAER, D., BLOM, S., HUORTING-HANSEN, E. & PINHOLT, E. M. 1997. Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur J Oral Sci*, 105, 59-66.
- VILAR, J. M., BATISTA, M., MORALES, M., SANTANA, A., CUERVO, B., RUBIO, M., CUGAT, R., SOPENA, J. & CARRILLO, J. M. 2014. Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Vet Res*, 10, 143.
- VILAR, J. M., MORALES, M., SANTANA, A., SPINELLA, G., RUBIO, M., CUERVO, B., CUGAT, R. & CARRILLO, J. M. 2013. 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 Vet Res*, 9, 131.

- VILIM, V., OLEJAROVA, M., MACHACEK, S., GATTEROVA, J., KRAUS, V. B. & PAVELKA, K. 2002. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 707-13.
- WADDELL, D. D., KOLOMYTKIN, O. V., DUNN, S. & MARINO, A. A. 2007. Hyaluronan suppresses IL-1beta-induced metalloproteinase activity from synovial tissue. *Clin Orthop Relat Res*, 465, 241-8.
- WAGNER, W., WEIN, F., SECKINGER, A., FRANKHAUSER, M., WIRKNER, U., KRAUSE, U., BLAKE, J., SCHWAGER, C., ECKSTEIN, V., ANSORGE, W. & HO, A. D. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*, 33, 1402-16.
- WAKITANI, S., IMOTO, K., YAMAMOTO, T., SAITO, M., MURATA, N. & YONEDA, M. 2002. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 199-206.
- WALLACE, J. L., DICAY, M., MCKNIGHT, W. & DUDAR, G. K. 2006. Platelets accelerate gastric ulcer healing through presentation of vascular endothelial growth factor. *Br J Pharmacol*, 148, 274-8.
- WAN, Y. 2013. Bone marrow mesenchymal stem cells: fat on and blast off by FGF21. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 546-9.
- WANG, B. L., SUN, W., SHI, Z. C., ZHANG, N. F., YUE, D. B., GUO, W. S., XU, S. Q., LOU, J. N. & LI, Z. R. 2010. Treatment of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head with the implantation of core decompression and concentrated autologous bone marrow containing mononuclear cells. *Arch Orthop Trauma Surg*, 130, 859-65.
- WANG, C. J., WANG, F. S., HUANG, C. C., YANG, K. D., WENG, L. H. & HUANG, H. Y. 2005. Treatment for osteonecrosis of the femoral head: comparison of extracorporeal shock waves with core decompression and bone-grafting. *J Bone Joint Surg Am*, 87, 2380-7.
- WANG, Z., GOH, J., DAS DE, S., GE, Z., OUYANG, H., CHONG, J. S., LOW, S. L. & LEE, E. H. 2006. Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng*, 12, 1753-61.
- WANG, Z., ORON, E., NELSON, B., RAZIS, S. & IVANOVA, N. 2012. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 10, 440-54.
- WANG-SAEGUSA, A., CUGAT, R., ARES, O., SEIJAS, R., CUSCO, X. & GARCIA-BALLETBO, M. 2011. Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life. *Arch Orthop Trauma Surg*, 131, 311-7.
- WARREN, L., MANOS, P. D., AHFELDT, T., LOH, Y. H., LI, H., LAU, F., EBINA, W., MANDAL, P. K., SMITH, Z. D., MEISSNER, A., DALEY, G. Q., BRACK, A. S., COLLINS, J. J., COWAN, C., SCHLAEGER, T. M. & ROSSI, D. J. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7, 618-30.
- WASSENAAR, R. P., VERBURG, H., TACONIS, W. K. & VAN DER EIJKEN, J. W. 1996. Avascular osteonecrosis of the femoral head treated with a vascularized iliac bone graft: preliminary results and follow-up with radiography and MR imaging. *Radiographics*, 16, 585-94.
- WEIBRICH, G., HANSEN, T., KLEIS, W., BUCH, R. & HITZLER, W. E. 2004. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, 34, 665-71.
- WEIBRICH, G. & KLEIS, W. K. 2002. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res*, 13, 437-43.
- WEIBRICH, G., KLEIS, W. K., BUCH, R., HITZLER, W. E. & HAFNER, G. 2003. The Harvest Smart PRP system versus the Friudent-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res*, 14, 233-9.
- WEIBRICH, G., KLEIS, W. K. & HAFNER, G. 2002. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 17, 184-90.
- WEIBRICH, G., KLEIS, W. K., HITZLER, W. E. & HAFNER, G. 2005. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20, 118-23.
- WEISS, M. L., MEDICETTY, S., BLEDSOE, A. R., RACHAKATLA, R. S., CHOI, M., MERCHAV, S., LUO, Y., RAO, M. S., VELAGALETI, G. & TROYER, D. 2006. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*, 24, 781-92.
- WENHAM, C. Y. & CONAGHAN, P. G. 2013. New horizons in osteoarthritis. *Age Ageing*, 42, 272-8.
- WHITMAN, D. H., BERRY, R. L. & GREEN, D. M. 1997. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*, 55, 1294-9.
- WIELAND, H. A., MICHAELIS, M., KIRSCHBAUM, B. J. & RUDOLPHI, K. A. 2005. Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov*, 4, 331-44.
- WILLIAMS, E. L., EDWARDS, C. J., COOPER, C. & OREFFO, R. O. 2012. Impact of inflammation on the osteoarthritic niche: implications for regenerative medicine. *Regen Med*, 7, 551-70.
- WILLIAMS, F. M., ANDREW, T., SAXNE, T., HEINEGARD, D., SPECTOR, T. D. & MACGREGOR, A. J. 2006. The heritable determinants of cartilage oligomeric matrix protein. *Arthritis Rheum*, 54, 2147-51.
- WILLIAMS, F. M. & SPECTOR, T. D. 2008. Biomarkers in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 10, 101.

- WOGNUM, A. W., EAVES, A. C. & THOMAS, T. E. 2003. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*, 34, 461-75.
- WRIGHT, R. W. 2014. Osteoarthritis Classification Scales: Interobserver Reliability and Arthroscopic Correlation. *J Bone Joint Surg Am*, 96, 1145-1151.
- WU, J. P., KIRK, T. B. & ZHENG, M. H. 2008. Study of the collagen structure in the superficial zone and physiological state of articular cartilage using a 3D confocal imaging technique. *J Orthop Surg Res*, 3, 29.
- WU, L., CAI, X., ZHANG, S., KARPERIEN, M. & LIN, Y. 2013. Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *J Cell Physiol*, 228, 938-44.
- WU, W., CHEN, F., LIU, Y., MA, Q. & MAO, T. 2007. Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: experimental study in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg*, 65, 1951-7.
- XIE, X., ZHANG, C. & TUAN, R. S. 2014. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther*, 16, 204.
- YAMAMOTO, M., SOBUE, G., YAMAMOTO, K., TERAO, S. & MITSUMA, T. 1996. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res*, 21, 929-38.
- YAMAMOTO, S., SHIDA, T., HONDA, M., ASHIDA, Y., RIKIHISA, Y., ODAKURA, M., HAYASHI, S., NOMURA, M. & ISAYAMA, Y. 1994. Serum C-reactive protein and immune responses in dogs inoculated with *Bordetella bronchiseptica* (phase I cells). *Vet Res Commun*, 18, 347-57.
- YAMAMOTO, S., SHIDA, T., MIYAJI, S., SANTSUKA, H., FUJISE, H., MUKAWA, K., FURUKAWA, E., NAGAE, T. & NAIKI, M. 1993. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Vet Res Commun*, 17, 85-93.
- YAMASHITA, K., FUJINAGA, T., MIYAMOTO, T., HAGIO, M., IZUMISAWA, Y. & KOTANI, T. 1994. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J Vet Med Sci*, 56, 487-92.
- YAMASHITA, K., FUJINAGA, T., OKUMURA, M., TAKIGUCHI, M., TSUNODA, N. & MIZUNO, S. 1991. Serum C-reactive protein (CRP) in horses: the effect of aging, sex, delivery and inflammations on its concentration. *J Vet Med Sci*, 53, 1019-24.
- YAN, H. & YU, C. 2007. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy*, 23, 178-87.
- YAN, M., SUN, M., ZHOU, Y., WANG, W., HE, Z., TANG, D., LU, S., WANG, X., LI, S., WANG, W. & LI, H. 2013. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. *PLoS One*, 8, e64000.
- YANG, C. C., SHIH, Y. H., KO, M. H., HSU, S. Y., CHENG, H. & FU, Y. S. 2008. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS One*, 3, e3336.
- YANG, L., BRYDER, D., ADOLFSSON, J., NYGREN, J., MANSSON, R., SIGVARDSSON, M. & JACOBSEN, S. E. 2005. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*, 105, 2717-23.
- YANG, L., LI, S., HATCH, H., AHRENS, K., CORNELIUS, J. G., PETERSEN, B. E. & PECK, A. B. 2002. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8078-83.
- YANG, S., HUANG, S., FENG, C. & FU, X. 2012. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: strategies, challenges, and potential for cutaneous regeneration. *Front Med*, 6, 41-7.
- YANG, Z., ZHANG, F., MA, W., CHEN, B., ZHOU, F., XU, Z., ZHANG, Y., ZHANG, D., ZHU, T., WANG, L., WANG, H., DING, Z. & ZHANG, Y. 2010. A novel approach to transplanting bone marrow stem cells to repair human myocardial infarction: delivery via a noninfarct-related artery. *Cardiovasc Ther*, 28, 380-5.
- YAO, S., CHEN, S., CLARK, J., HAO, E., BEATTIE, G. M., HAYEK, A. & DING, S. 2006. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6907-12.
- YARAK, S. & OKAMOTO, O. K. 2010. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *An Bras Dermatol*, 85, 647-56.
- YARNITSKY, D., SPRECHER, E., ZASLANSKY, R. & HEMLI, J. A. 1996. Multiple session experimental pain measurement. *Pain*, 67, 327-33.
- YASUHARA, T. & DATE, I. 2007. Intracerebral transplantation of genetically engineered cells for Parkinson's disease: toward clinical application. *Cell Transplant*, 16, 125-32.
- YOKOI, H., MUKOYAMA, M., SUGAWARA, A., MORI, K., NAGAE, T., MAKINO, H., SUGANAMI, T., YAHATA, K., FUJINAGA, Y., TANAKA, I. & NAKAO, K. 2002. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282, F933-42.
- YOUNG, H. E. & BLACK, A. C., JR. 2004. Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 276, 75-102.

- YU, J., HU, K., SMUGA-OTTO, K., TIAN, S., STEWART, R., SLUKVIN, II & THOMSON, J. A. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324, 797-801.
- ZANASI, S., BRITTEBERG, M. & MARCACCI, M. 2006. *Basic Science, Clinical Repair and Reconstruction of Articular Cartilage Defects: Current Status and Prospects*, Bologna, Italy, Timeo Editore- Bologna.
- ZARRABI, M., MOUSAVI, S. H., ABROUN, S. & SADEGHI, B. 2014. Potential Uses for Cord Blood Mesenchymal Stem Cells. *Cell J*, 15, 274-281.
- ZEINALOO, A., ZANJANI, K. S., BAGHERI, M. M., MOHYEDDIN-BONAB, M., MONAJEMZADEH, M. & ARJMANDNIA, M. H. 2011. Intracoronary administration of autologous mesenchymal stem cells in a critically ill patient with dilated cardiomyopathy. *Pediatr Transplant*, 15, E183-6.
- ZHANG, S., GE, J., SUN, A., XU, D., QIAN, J., LIN, J., ZHAO, Y., HU, H., LI, Y., WANG, K. & ZOU, Y. 2006. Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *J Cell Biochem*, 99, 1132-47.
- ZHANG, W., GE, W., LI, C., YOU, S., LIAO, L., HAN, Q., DENG, W. & ZHAO, R. C. 2004a. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*, 13, 263-71.
- ZHANG, W., JONES, A. & DOHERTY, M. 2004b. Does paracetamol (acetaminophen) reduce the pain of osteoarthritis? A meta-analysis of randomised controlled trials. *Ann Rheum Dis*, 63, 901-7.
- ZHANG, W., NUKI, G., MOSKOWITZ, R. W., ABRAMSON, S., ALTMAN, R. D., ARDEN, N. K., BIERMA-ZEINSTRAS, S., BRANDT, K. D., CROFT, P., DOHERTY, M., DOUGADOS, M., HOCHBERG, M., HUNTER, D. J., KWONG, K., LOHMANDER, L. S. & TUGWELL, P. 2010. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage*, 18, 476-99.
- ZHAO, D., CUI, D., WANG, B., TIAN, F., GUO, L., YANG, L., LIU, B. & YU, X. 2012. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone*, 50, 325-30.
- ZHOU, B., YUAN, J., ZHOU, Y., GHAWJI, M., JR., DENG, Y. P., LEE, A. J., LEE, A. J., NAIR, U., KANG, A. H., BRAND, D. D. & YOO, T. J. 2011. Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis. *Clin Immunol*, 141, 328-37.
- ZHOU, Q., BROWN, J., KANAREK, A., RAJAGOPAL, J. & MELTON, D. A. 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*, 455, 627-32.
- ZHOU, S., ZILBERMAN, Y., WASSERMANN, K., BAIN, S. D., SADOVSKY, Y. & GAZIT, D. 2001. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem Suppl*, Suppl 36, 144-55.
- ZHU, S. F., ZHONG, Z. N., FU, X. F., PENG, D. X., LU, G. H., LI, W. H., XU, H. Y., HU, H. B., HE, J. M., SU, W. Y. & HE, Y. L. 2013a. Comparison of cell proliferation, apoptosis, cellular morphology and ultrastructure between human umbilical cord and placenta-derived mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett*, 541, 77-82.
- ZHU, X., RAINA, A. K., PERRY, G. & SMITH, M. A. 2006. Apoptosis in Alzheimer disease: a mathematical improbability. *Curr Alzheimer Res*, 3, 393-6.
- ZHU, Y., YANG, Y., ZHANG, Y., HAO, G., LIU, T., WANG, L., YANG, T., WANG, Q., ZHANG, G., WEI, J. & LI, Y. 2014. Placental mesenchymal stem cells of fetal and maternal origins demonstrate different therapeutic potentials. *Stem Cell Res Ther*, 5, 48.
- ZHU, Y., YUAN, M., MENG, H. Y., WANG, A. Y., GUO, Q. Y., WANG, Y. & PENG, J. 2013b. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*, 21, 1627-37.
- ZIMMERMANN, R., JAKUBIETZ, R., JAKUBIETZ, M., STRASSER, E., SCHLEGEL, A., WILTFANG, J. & ECKSTEIN, R. 2001. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion*, 41, 1217-24.
- ZOUKI, C., BEAUCHAMP, M., BARON, C. & FILEP, J. G. 1997. Prevention of In vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest*, 100, 522-9.